(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114650814 A
(43)申请公布日 2022.06.21

(21)申请号 202080072552.7

(22)申请日 2020.09.04

(30)优先权数据
62/895,737 2019.09.04 US
62/923,770 2019.10.21 US
62/924,359 2019.10.22 US
62/964,995 2020.01.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/049541 2020.09.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/046448 EN 2021.03.11

(71)申请人 路易斯安娜州立大学监测委员会，农业和机械学院
地址 美国路易斯安那州
申请人 里卡多·帕拉西奥斯·佩莱兹

(72)发明人 里卡多·帕拉西奥斯·佩莱兹 N·G·巴赞

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王思琪 王建秀

(51)Int.Cl.
A61K 31/191(2006.01)
A61K 31/202(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

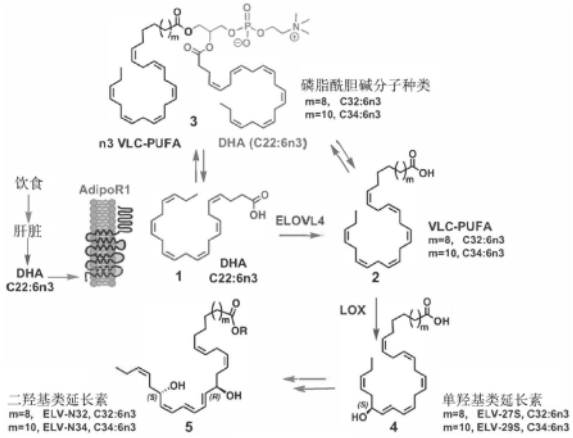
权利要求书2页 说明书78页 附图87页

(54)发明名称

极长链多不饱和脂肪酸、类延长素羟基化衍生物和使用方法

(57)摘要

本公开涉及与ω-3极长链多不饱和脂肪酸(n-3VLC-PUFA)及其羟基化衍生物(称被为类延长素)相关的使用方法，以减轻疾病的症状、治疗或预防所述疾病。此外，本发明涉及用于调节VLC-PUFA生物活性和可用性的组合物和方法。



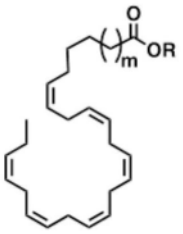
CN 114650814 A

1.一种减轻受试者的过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。

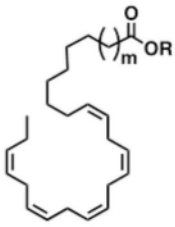
2.一种通过调节细胞衰老、铁死亡或细胞衰老和铁死亡来减轻疾病的症状、治疗或预防所述疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。

3.一种减轻受试者的代谢紊乱的症状、治疗或预防所述代谢紊乱的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。

4.根据权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法，其中所述VLC-PUFA化合物可能选自由式A或B组成的组：

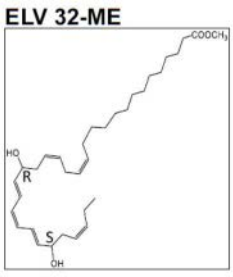


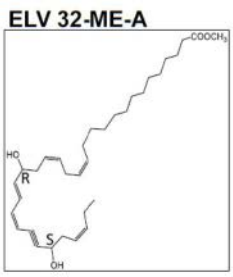
A

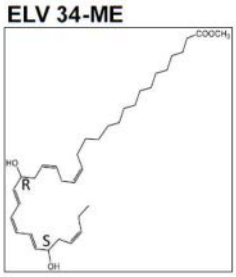


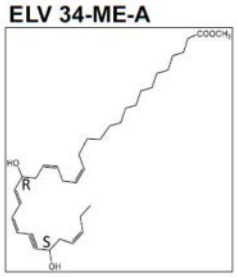
B

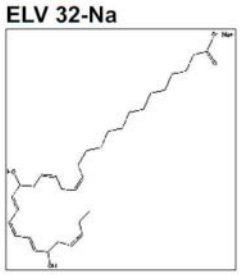
5.根据权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法，其中所述VLC-PUFA化合物可能选自由以下组成的组：

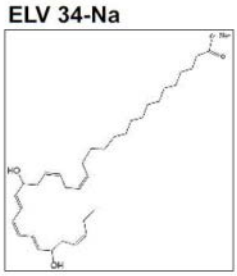












6.根据权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法，其中所述VLC-PUFA作为药物组合物提供。

7.根据权利要求6所述的方法，其中所述药物组合物包括用于局部施用的组合物、用于鼻内施用的组合物、用于口服施用的组合物或用于肠胃外施用的组合物。

8.根据权利要求7所述的方法，其中所述用于局部施用的组合物包括霜剂。

9.根据权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法，其中所述VLC-PUFA通过局部、口服、鼻内或肠胃外施用。

10.根据权利要求1、权利要求2或权利要求3所述的方法，其中所述治疗有效量包括约500nM浓度、大于约500nM浓度或小于约500nM浓度。

11.根据权利要求6所述的方法，其中所述药物组合物进一步包括一种或多种额外的活

性剂。

12.根据权利要求11所述的方法，其中所述一种或多种额外的活性剂包括至少一种抗氧化剂。

13.根据权利要求1所述的方法，其中所述过敏性炎性疾病由细胞产生的促炎细胞因子和趋化因子增加指示。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述促炎细胞因子和趋化因子包括IL-6、IL-1β、IL-8/CXCL8、CCL2/MCP-1、CXCL1/KC/GRO、VEGF、ICAM1(CD54)中的至少一种。

15.根据权利要求13所述的方法，其中所述VLC-PUFA消除促炎细胞因子和趋化因子的产生。

16.根据权利要求13所述的方法，其中所述细胞包括上皮细胞。

17.根据权利要求16所述的方法，其中所述上皮细胞包括人鼻上皮细胞。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述上皮细胞包括鼻上皮细胞、角膜上皮细胞、皮肤上皮细胞或呼吸道上皮细胞。

19.根据权利要求1所述的方法，其中所述VLC-PUFA在暴露于过敏原之前、与暴露于过敏原大约同时或在暴露于过敏原之后施用。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述过敏原在受试者中引起过敏性炎性疾病。

21.根据权利要求19所述的方法，其中所述过敏原导致由细胞产生的促炎细胞因子和趋化因子增加。

22.根据权利要求21所述的方法，其中所述细胞包括上皮细胞。

23.根据权利要求22所述的方法，其中所述上皮细胞包括人鼻上皮细胞。

24.根据权利要求21所述的方法，其中所述上皮细胞包括鼻上皮细胞、角膜上皮细胞、皮肤上皮细胞或呼吸道上皮细胞。

25.根据权利要求1或权利要求20所述的方法，其中所述过敏性炎性疾病包括过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎、哮喘。

26.根据权利要求2所述的方法，其中所述疾病包括神经退行性疾病。

27.根据权利要求2所述的方法，其中所述疾病包括Aβ相关疾病。

28.根据权利要求2所述的方法，其中所述疾病包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)或年龄相关性黄斑变性。

29.根据权利要求3所述的方法，其中所述代谢病状包括肥胖症或糖尿病。

极长链多不饱和脂肪酸、类延长素羟基化衍生物和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下申请的优先权：于2019年9月4日提交的美国临时申请第62/895,737号；于2019年10月21日提交的美国临时申请第62/923,770号；于2019年10月22日提交的美国临时申请第62/924,359号；以及于2020年1月23日提交的美国临时申请第62/964,995号，所述美国临时申请中的每一个申请的全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的合同EY005121、NS104117和NS109221在政府支持下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

技术领域

[0005] 本公开涉及与ω-3极长链多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA)及其羟基化衍生物(称被为类延长素)相关的使用方法，以减轻疾病的症状、治疗或预防所述疾病。此外，本发明涉及用于调节VLC-PUFA生物活性和可用性的组合物和方法。

背景技术

[0006] 长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)可以包含含有18-22个碳原子的ω-3(n-3)和ω-6(n6)多不饱和脂肪酸，所述多不饱和脂肪酸包含：花生四烯酸(ARA，C20:4n6，即20个碳，4个双键，ω-6)、二十碳五烯酸(EPA，C20:5n-3，20个碳，5个双键，ω-3)、二十二碳五烯酸(DPA，C22:5n-3，22个碳，5个双键，ω-3)和二十二碳六烯酸(DHA，C22:6n-3，22个碳，6个双键，ω-3)。LC-PUFA通过脂氧合酶类酶转化为具有生物活性的羟基化PUFA衍生物，其作为在炎症和相关病状中起重要作用的生物活性脂质介质发挥作用。其中最重要的是在某些炎症相关细胞中通过脂氧合酶(LO或LOX)酶(例如15-LO、12-LO)的作用产生的羟基化衍生物，并导致形成单羟基化、二羟基化或三羟基化的PUFA衍生物，这些衍生物具有强效作用，包含抗炎、促分解、神经保护或组织保护作用等。例如，通过15-脂氧合酶(15-LO)的酶促作用在细胞中形成的神经保护素D1(NPD1)，一种来自DHA的二羟基衍生物，被证明具有确定的R/S和Z/E立体化学结构(10R,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-六烯酸)和独特的生物学特征，所述独特的生物学特征包含立体选择性强效抗炎、恢复稳态、促分解、生物活性。NPD1已被证明可调节神经炎症信号传导和蛋白质稳态，并促进神经再生、神经保护和细胞存活。

发明内容

[0007] 本公开的方面涉及一种减轻受试者的过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。

[0008] 进一步地，本公开的方面涉及一种通过调节细胞衰老、铁死亡或细胞衰老和铁死亡来减轻疾病的症状、治疗或预防所述疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。在实施例中，所述疾病包括神经退行性疾病。在实施例中，所述疾病包括Aβ相关疾病。例如，所述疾病可以是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)或年龄相关性

黄斑变性。

[0009] 更进一步地，本公开的方面涉及一种减轻受试者的代谢紊乱的症状、治疗或预防所述代谢紊乱的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。例如，所述代谢病状包括肥胖症或糖尿病。

[0010] 本公开的方面涉及一种减轻受试者的过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病的方法。在实施例中，所述过敏性炎性疾病由细胞产生的促炎细胞因子和趋化因子增加指示。例如，所述过敏性炎性疾病包括过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎或哮喘。

[0011] 例如，所述促炎细胞因子和趋化因子包括IL-6、IL-1β、IL-8/CXCL8、CCL2/MCP-1、CXCL1/KC/GRO、VEGF、ICAM1(CD54)中的至少一种。

[0012] 例如，所述细胞包括上皮细胞。上皮细胞的非限制性实例包括呼吸道上皮细胞(如人鼻上皮细胞)、角膜上皮细胞或皮肤上皮细胞。

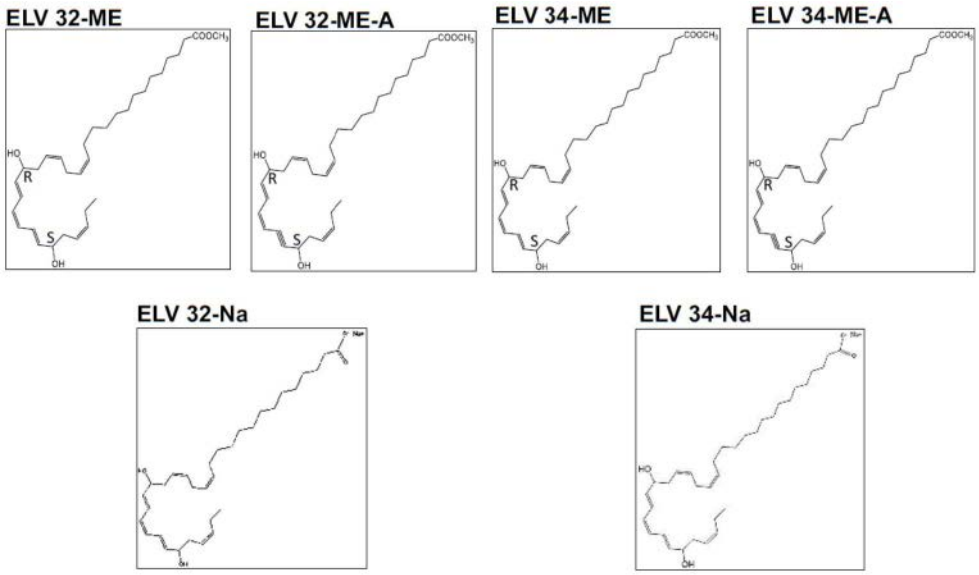
[0013] 在实施例中，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。在实施例中，所述VLC-PUFA消除促炎细胞因子和趋化因子的产生

[0014] 在实施例中，所述VLC-PUFA化合物可以选自由式A或B组成的组：

[0015] 

A B

[0016] 在实施例中，所述VLC-PUFA化合物可以选自由以下组成的组：

[0017] 

[0018] 在实施例中，所述VLC-PUFA作为药物组合物提供。例如，所述药物组合物包括用于局部施用的组合物、用于鼻内施用的组合物、用于口服施用的组合物或用于肠胃外施用的组合物。

[0019] 在实施例中，所述VLC-PUFA或药物组合物通过局部、口服、鼻内或肠胃外施用。

[0020] 在实施例中，所述治疗有效量包括约500nM浓度、大于约500nM浓度或小于约500nM浓度。

[0021] 在实施例中，所述VLC-PUFA在暴露于过敏原之前、与暴露于过敏原大约同时或在暴露于过敏原之后施用。

[0022] 在实施例中，所述过敏原在受试者中引起过敏性炎性疾病。例如，所述过敏原导致细胞产生的促炎细胞因子和趋化因子增加，抗炎细胞因子和趋化因子的产生减少，或两者兼而有之。

[0023] 本公开的方面还涉及一种治疗过敏性鼻炎的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。例如，所述VLC-PUFA是鼻内施用的。

[0024] 更进一步地，本公开的方面涉及一种治疗过敏性结膜炎的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。在实施例中，所述VLC-PUFA是局部施用的，如使用滴眼液施用于眼睛。

[0025] 进一步地，本公开的方面涉及一种治疗过敏性皮炎的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。在实施例中，所述VLC-PUFA是局部施用的，如霜剂、喷雾剂或凝胶。

[0026] 此外，本公开的方面涉及一种治疗哮喘的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的VLC-PUFA。在实施例中，所述VLC-PUFA是鼻内施用的。

[0027] 本公开的方面还涉及一种减轻、治疗或预防上皮组织的炎症反应的方法，所述方法包括使所述上皮组织与治疗有效量的VLC-PUFA接触。在实施例中，所述炎症反应由以下指示：细胞产生的促炎细胞因子和趋化因子增加，抗炎细胞因子和趋化因子的产生减少，或两者兼而有之。例如，所述促炎细胞因子和趋化因子包括IL-6、IL-1β、IL-8/CXCL8、CCL2/MCP-1、CXCL1/KC/GRO、VEGF、ICAM1(CD54)中的至少一种。例如，所述抗炎分子包括IL-10。

[0028] 在实施例中，所述VLC-PUFA消除促炎细胞因子和趋化因子的产生，增强抗炎分子的产生，或两者兼而有之。

[0029] 本文提供了化合物和药物组合物，其包括ω-3极长链多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA)和/或其内源性羟基化衍生物，被称为类延长素。本公开提供了用于减轻受试者的过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病的方法。

[0030] n-3 VLC-PUFA在体内转化为几种以前未知类型的VLC-PUFA羟基化衍生物，被称为类延长素(ELV)，这些衍生物能够保护和防止对组织和器官的进行性损伤，所述组织和器官的功能完整性已被破坏。不希望受理论束缚，所述ELV可以消除促炎细胞因子和趋化因子的产生，从而减轻受试者的过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病。

[0031] 可以通过提供与n-3 VLC-PUFA及其对应的类延长素(ELV)相关的某些化合物来有效地抑制促炎细胞因子和趋化因子的产生。因此，本公开涉及过敏性炎性疾病的预防和治疗。

[0032] 本公开提供了可以促进保护、预防和治疗由促炎细胞因子触发的许多器官中的干扰的化合物、组合物和方法。例如，本公开提供了化合物、组合物和方法，其可以消除从如鼻上皮细胞等上皮细胞产生促炎细胞因子和趋化因子，从而减轻过敏性炎性疾病的症状、治疗或预防所述过敏性炎性疾病。

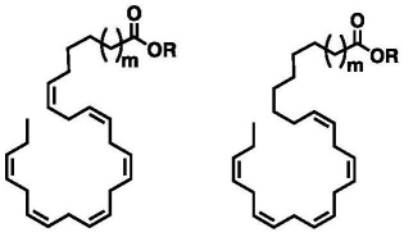
[0033] 因此，本公开的一个方面涵盖组合物的实施例，所述组合物包括至少一种在其碳

链中具有至少23个碳原子的ω-3极长链多不饱和脂肪酸。

[0034] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物包括至少一种在其碳链中具有至少23个碳原子的n-3 VLC-PUFA，其中所述n-3 VLC-PUFA可以呈以下形式：羧酸、羧酸酯、羧酸盐或磷脂衍生物。

[0035] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述n-3 VLC-PUFA化合物可以选自由式A或B组成的组：

[0036]

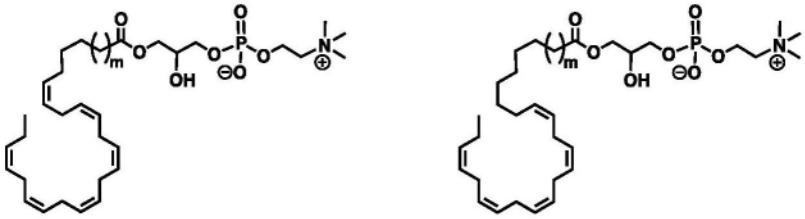


A B

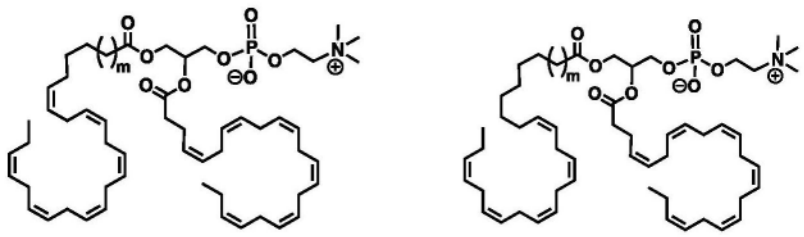
[0037] 其中：m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，并且其中：如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物A或B可以是其盐，则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子，并且如果-CO-OR可以是酯，则R可以是烷基。

[0038] 在本公开的一些其它实施例中，所述n-3 VLC-PUFA化合物可以呈选自由式C、D、E或F组成的组的磷脂的形式，其中m可以是0到19：

[0039]



C D



E F

[0040] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括药学上可接受的载体并且被配制用于递送一定量的至少一种ω-3极长链多不饱和脂肪酸，所述量有效减少受体受试者组织的病理状况或受体受试者组织的病理状况的发作。

[0041] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以是所述受体受试者的过敏性炎性疾病。例如，所述过敏性炎性疾病可以是过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎或哮喘。

[0042] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长链多不饱和脂肪酸局部递送至受体受试者的皮肤或受体受试者的眼睛，如在滴眼液中。

[0043] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长

链多不饱和脂肪酸鼻内递送至受体受试者的鼻组织。

[0044] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长链多不饱和脂肪酸口服递送或肠胃外递送至受体受试者。

[0045] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种ω-3极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有约26到约42个碳原子。

[0046] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种ω-3极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有32或34个碳原子。

[0047] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述ω-3极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有五个或六个具有顺式几何形状的交替双键。

[0048] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述ω-3极长链多不饱和脂肪酸是14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-三十二碳-14,17,20,23,26,29-六烯酸或(16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-三十四碳-16,19,22,25,28,31-六烯酸。

[0049] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种ω-3极长链多不饱和脂肪酸可以是14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-三十二碳-14,17,20,23,26,29-六烯酸或(16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-三十四碳-16,19,22,25,28,31-六烯酸。

[0050] 本公开的另一方面涵盖组合物的实施例，所述组合物包括至少一种在其碳链中具有至少23个碳原子的类延长素。

[0051] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括药学上可接受的载体并且可以被配制用于递送一定量的至少一种类延长素，所述量有效减轻受体受试者组织的病理状况的症状、预防或减少所述病理状况。

[0052] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以是所述受体受试者的过敏性炎性疾病，如过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎或哮喘。

[0053] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种类延长素局部递送至受体受试者的皮肤或受体受试者的眼睛，如通过滴眼液。

[0054] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种类延长素鼻内递送至受体受试者的鼻组织。

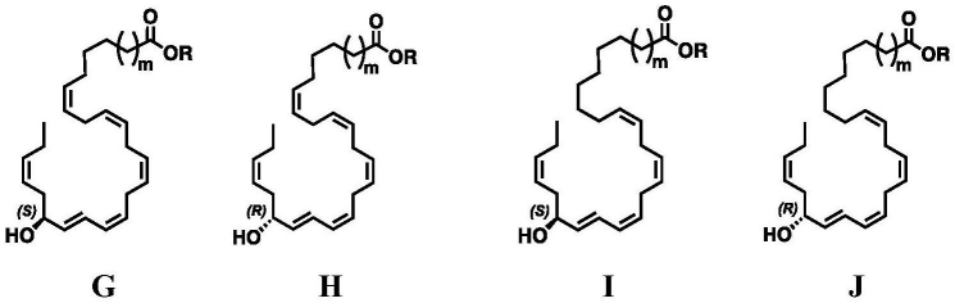
[0055] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种类延长素口服递送或肠胃外递送至受体受试者。

[0056] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种类延长素可以选自由以下组成的组：单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素、炔基单羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素，或其任何组合。

[0057] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种类延长素可以是类延长素的组合，其中所述组合选自由以下组成的组：单羟基化的类延长素和二羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；二羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；以及单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素炔基二羟基化的类延长素，其中每种类延长素独立地是外消旋混合物、分离的对映异构体或对映异构体的组合，在所述

组合中，一种对映异构体的量大于另一种对映异构体的量；并且其中每种类延长素独立地是非对映异构体混合物、分离的非对映异构体或非对映异构体的组合，在所述组合中，一种非对映异构体的量大于另一种非对映异构体的量。

[0058] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述单羟基化的类延长素可以选自由式G、H、I或J组成的组：

[0059] 

G H I J

[0060] 其中：m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，并且其中：如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物G、H、I或J可以是其盐，则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子，并且如果-CO-OR可以是酯，则R可以是烷基。

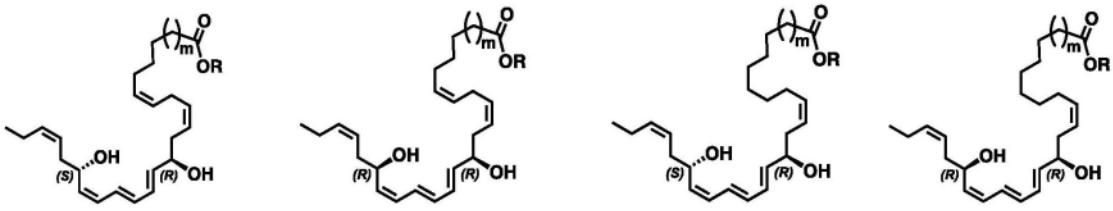
[0061] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体G和H，其中所述对映异构体在带有羟基的n-6碳处具有(S)或(R)手性。

[0062] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括一定量的对映异构体I和J，其中所述对映异构体在带有羟基的n-6碳处具有(S)或(R)手性。

[0063] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括G或H的对映异构体之一，其量超过G或H的另一种对映异构体的量。

[0064] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括I或J的对映异构体之一，其量超过I或J的另一种对映异构体的量。

[0065] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述二羟基化的类延长素可以选自由式K、L、M和N组成的组：

[0066] 

K L M N

[0067] 其中：m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，并且其中：如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物K、L、M或N可以是其盐，则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子，并且如果-CO-OR可以是酯，则R可以是烷基，并且其中：化合物K和L各自在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-7、n-15和n-18处开始的4个顺式碳-碳双键以及从位置n-9和n-11处开始的2个反式碳-碳双键；并且化合物M和N各自在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-7和n-15处开始的3个顺式碳-碳双键；以及从位置n-9和n-11处开始的2个反式碳-碳双键。

[0068] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体K和L，其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性，并且在位置n-13处具有

(R)手性。

[0069] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的一种或多种非对映异构体K和L,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(S)或(R)手性。

[0070] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括K或L的非对映异构体之一,其量超过K或L的另一种非对映异构体的量。

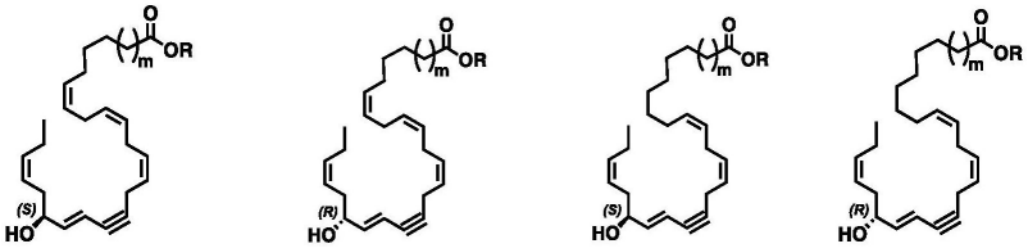
[0071] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体M和N,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(R)手性。

[0072] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的一种或多种非对映异构体M和N,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(S)或(R)手性。

[0073] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括M或N的非对映异构体之一,其量超过M或N的另一种非对映异构体的量。

[0074] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述炔基单羟基化的类延长素可以选自由式O、P、Q或R组成的组:

[0075]



[0076] 其中:m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团,或其盐或酯,并且其中:如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物O、P、Q或R可以是其盐,则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子,并且如果-CO-OR可以是酯,则R可以是烷基,并且其中:化合物O和P各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有定位在从n-3、n-12、n-15和n-18开始的位置处的4个顺式碳-碳双键;位于从n-7开始的位置处的反式碳-碳双键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键;并且化合物Q和R各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有从位置n-3、n-12和n-15处开始的3个顺式碳-碳双键、位于从n-7开始的位置处的反式碳-碳双键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键。

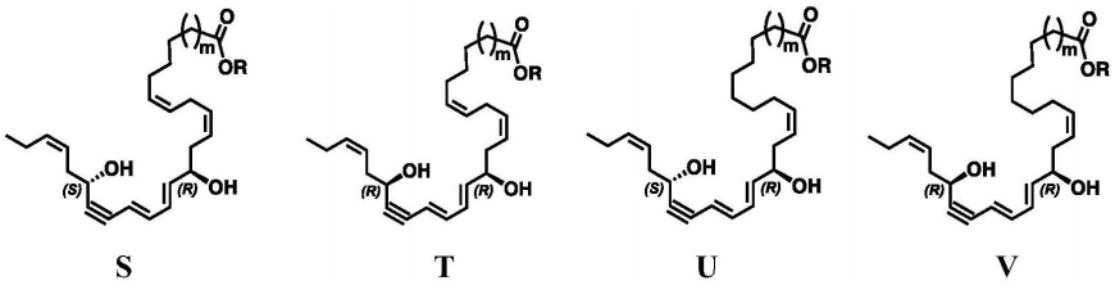
[0077] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体O和P,其中所述对映异构体在带有羟基的n-6碳处具有(S)或(R)手性。

[0078] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体Q和R,其中所述对映异构体在带有羟基的n-6碳处具有(S)或(R)手性。

[0079] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括O或P的对映异构体之一,其量超过O或P的另一种对映异构体的量。

[0080] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括Q或R的对映异构体之一,其量超过Q或R的另一种对映异构体的量。

[0081] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述类延长素可以是选自由式S、T、U或V组成的组的炔基二羟基化的类延长素：

[0082] 

[0083] 其中：m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，并且其中：如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物S、T、U或V可以是其盐，则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子，并且如果-CO-OR可以是酯，则R可以是烷基，并且其中：化合物S和T各自在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有定位在从n-3、n-15和n-18开始的位置处的3个顺式碳-碳双键、定位在从n-9和n-11开始的位置处的2个反式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的碳-碳三键；并且化合物U和V各自在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3和n-15处开始的2个顺式碳-碳双键、定位在从n-9、n-11开始的位置处的2个反式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的碳-碳三键。

[0084] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体S和T，其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性，并且在位置n-13处具有(R)手性。

[0085] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的一种或多种非对映异构体S和T，其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性，并且在位置n-13处具有(S)或(R)手性。

[0086] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括S或T的非对映异构体之一，其量超过S或T的另一种非对映异构体的量。

[0087] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体U和V，其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性，并且在位置n-13处具有(R)手性。

[0088] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的一种或多种非对映异构体U和V，其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性，并且在位置n-13处具有(S)或(R)手性。

[0089] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括U或V的非对映异构体之一，其量超过U或V的另一种非对映异构体的量。

[0090] 本发明的方面进一步涉及一种与本文包含的表中的分子靶标的表位结合的肽类似物。

[0091] 在实施例中，所述肽类似物调节细胞衰老、铁死亡或细胞衰老和铁死亡。

[0092] 更进一步地，本发明的方面涉及一种通过向受试者施用本文所述的肽类似物来治疗疾病的方法。例如，实施例涉及一种通过调节细胞衰老、铁死亡或细胞衰老和铁死亡来治疗疾病的方法。在实施例中，所述方法包括向患有疾病或处于疾病风险中的受试者施用类延长素或其肽类似物的步骤。在实施例中，所述类延长素或其肽类似物与本文所述的分子

靶标的表位结合。

[0093] 本发明的方面进一步涉及一种治疗与细胞衰老、铁死亡或细胞衰老和铁死亡相关的疾病的方法。例如，所述方法包括用类延长素或其肽类似物靶向至少一个分子靶标。

附图说明

[0094] 本公开聚焦于用于在受试者中缓解疾病的症状、预防或治疗所述疾病的化合物、组合物和方法。例如，所述疾病是炎性疾病，如过敏性炎性疾病。在另一个实例中，所述疾病是与细胞衰老、铁死亡或两者相关的疾病，如与Aβ相关的疾病，包含年龄相关性黄斑变性或阿尔茨海默病。作为又一个实例，所述疾病是代谢紊乱，如糖尿病、肥胖症或两者。

[0095] 当结合附图阅读下文描述的其各个实施例的详细描述时，将容易理解本公开的另外的方面。

[0096] 图1是展示由ω-3(n-3或n-3)极长链多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA)生物合成类延长素(ELV)的示意图。

[0097] 图2是展示n-3 VLC-PUFA的生物合成的示意图。

[0098] 图3A-3K展示了来自经培养的原代人视网膜色素上皮细胞(RPE)的类延长素ELV-N-32和ELV-N-34的产生和结构表征。

[0099] 图3A是展示由中间体(1、2和3)合成ELV-N-32和ELV-N-34的示意图，所述中间体中的每一种都以立体化学纯的形式制备。中间体2和3的立体化学是通过使用对映体纯的环氧化物起始材料预先定义的。最终的ELV(4)通过中间体1、2和3的迭代偶联进行组装，并以甲酯(Me)或钠盐(Na)的形式分离。

[0100] 图3B展示了与ELV-N-32标准品一起显示的C32:6n-3、内源性单羟基-C32:6n-3和ELV-N-32的洗脱曲线。ELV-N-32的MRM示出了比标准品ELV-N-32洗脱时的峰更早洗脱的两个大峰，其显示相同的碎裂模式(显示在插入光谱中)，这表明它们是异构体。

[0101] 图3C展示了ELV-N-32和ELV-N-34的全子扫描的色谱图。

[0102] 图3D展示了ELV-N-32的碎裂模式。

[0103] 图3E展示了C34:6n-3和ELV-N-34的洗脱曲线。

[0104] 图3F展示了内源性ELV-N-34的UV光谱，其显示出类似于NPD1的三烯特征，其中λmax在275nm处，并且肩峰在268和285nm处。

[0105] 图3G展示了ELV-N-32的碎裂模式。

[0106] 图3H展示了内源性ELV-N-32的完全碎裂光谱。

[0107] 图3I展示了ELV-N-32标准品，其显示标准品的所有主要峰都与内源峰相匹配。然而，内源性ELV-N-32具有更多未出现在标准品中的片段，这表明其可以包含不同的异构体。

[0108] 图3J展示了与标准品ELV-N-34匹配的内源性ELV-N-34峰的完全碎裂光谱。

[0109] 图3K展示比率ELV-N-34异构体的存在。

[0110] 图4A-4K展示了来自神经元细胞培养物的类延长素ELV-N-32和ELV-N-34的结构表征。在OGD条件下，将大脑皮质混合神经元细胞与32:6n-3和34:6n-3(各10μM)一起孵育。

[0111] 图4A是展示由中间体(a、b和c)合成ELV-N-32和ELV-N-34的示意图，所述中间体中的每一种都以立体化学纯的形式制备。中间体b和c的立体化学是通过使用对映体纯的环氧化物起始材料预先定义的。最终的ELV(d)通过中间体a、b和c的迭代偶联进行组装，并以甲

酯(Me)或钠盐(Na)的形式分离。

[0112] 图4B展示了插入物中的32:6n-3、内源性单羟基-32:6、ELV-N-32和ELV-N-32标准品。ELV-N-32的MRM示出了比标准品ELV-N-32洗脱时的峰更早洗脱的两个大峰，但它们显示相同的碎裂模式，这表明它们是异构体。

[0113] 图4C展示了与图4A相同的特征，在34:6n-3和ELV-N-34中示出。

[0114] 图4D展示了内源性ELV-N-32的UV光谱显示三烯特征，但这些在该浓度下是不确定的。

[0115] 图4E展示了内源性ELV-N-32的完全碎裂光谱。

[0116] 图4F展示了内源性ELV-N-34的UV光谱，其显示出类似于NPD1的三烯特征，其中λ_{max}在275nm处，并且肩峰在268和285nm处。

[0117] 图4G展示了内源性ELV-N-34的碎裂模式。

[0118] 图4H展示了内源性ELV-N-32的完全碎裂模式。

[0119] 图4I展示了ELV-N-34标准品，其显示标准品的所有主要峰都与内源峰相匹配，但并非完全匹配；内源性ELV-N-34具有更多未出现在标准品中的片段。不希望受理论束缚，这表明其可以含有异构体。

[0120] 图4J展示了ELV-N-34的完全碎裂光谱；内源性ELV-N-34峰与标准品ELV-N-34匹配

[0121] 图4K展示比率ELV-N-34异构体的存在。

[0122] 图5A和5B展示了在神经元细胞培养物中检测ELV-N-32和ELV-N-34。在OGD条件下，将细胞与C32:6n-3和C34:6n-3(各5μM)一起孵育。

[0123] 图5A展示了VLC-PUFA C32:6n-3、内源性27-羟基-32:6n-3、内源性27,33-二羟基-32:6n-3(ELV-N-32)和通过立体控制的全有机合成以立体化学纯形式制备的合成ELV-N-32。内源性ELV-N-32的MRM与合成ELV-N-32标准品的MRM非常匹配。

[0124] 图5B展示了与图5A相同的特征，在C34:6n-3和ELV-N-34中示出，在ELV-N-34MRM中具有更多峰，这指示异构体。

[0125] 图6展示了单羟基化的类延长素G、H、I、J、O、P、Q、R的全合成方案1。试剂和条件：(a)邻苯二酚硼烷，加热；(b)N-碘代琥珀酰亚胺、MeCN；(c)4-氯丁-2-炔-1-醇、Cs_2CO_3、NaI、CuI、DMF；(d)CBr_4、PPh_3、CH_2Cl_2，0℃；(e)乙炔基-三甲基硅烷、CuI、NaI、K_2CO_3、DMF；(f)林德拉催化剂(Lindlar cat.)、H_2、EtOAc；(g)Na_2CO_3、MeOH；(h)$Pd(PPh_3)_4$、CuI、Et_3N:(i)$^tBu_4NF$、THF；(j)林德拉催化剂、H_2、EtOAc或Zn(Cu/Ag)、MeOH；(k)NaOH、THF、H_2O，然后用HCl/H_2O纯化；(l)NaOH、KOH等，或胺、亚胺等。

[0126] 图7展示了二羟基化的类延长素K、L、S和T的全合成方案2。试剂和条件：(a)CuI、NaI、K_2CO_3、DMF；(b)樟脑磺酸(CSA)、CH_2Cl_2、MeOH，室温；(c)林德拉催化剂、H_2、EtOAc；(d)DMSO、$(COCl)_2$、Et_3N，-78℃；(e)Ph_3P=CHCHO、PhMe，回流；(f)CHI_3、$CrCl_2$、THF，0℃；(g)催化剂$Pd(Ph_3)_4$、CuI、PhH，室温；(h)$^tBu_4NF$、THF，室温；(i)Zn(Cu/Ag)、MeOH，40℃；(j)NaOH、THF、H_2O，然后用HCl/H_2O纯化；(k)NaOH、KOH等，或胺、亚胺等。

[0127] 图8展示了二羟基化的类延长素M、N、U和V的全合成方案3。试剂和条件：(a)三聚氯氰、Et_3N、丙酮，室温；(b)(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)甲醇、吡啶、CH_2Cl_2，0℃；(c)$BF_3.OEt_2$、CH_2Cl_2；(d)^nBuLi、$BF_3.OEt_2$、THF，-78℃，然后进行1；(e)$^tBuPh_2SiCl$、咪唑、DMAP、CH_2Cl_2，室温；(f)樟脑磺酸、CH_2Cl_2、ROH，室温；(g)林德拉催化剂、H_2、EtOAc；(h)DMSO、$(COCl)_2$、Et_3N，-

78℃；(i)Ph_3P=CHCHO、PhMe，回流；(j)CHI_3、$CrCl_2$、THF，0℃；(k)催化剂$Pd(Ph_3)_4$、CuI、PhH，室温；(l)$^tBu_4NF$、THF，室温；(m)Zn(Cu/Ag)、MeOH，40℃；(n)NaOH、THF、H_2O，然后用HCl/H_2O纯化；(o)NaOH、KOH等，或胺、亚胺等。

[0128] 图9展示了32-碳二羟基化的类延长素的全合成方案4。

[0129] 图10展示了34-碳二羟基化的类延长素的全合成方案5。

[0130] 图11示出了显示HNEpC-10x和20x形态的明场图像。

[0131] 图12示出了屋尘螨致敏性。HDM的各种组分及其相关的粪便颗粒和灰尘会激活免疫系统。参见，《免疫学趋势(Trends in Immunology)》，2011年9月，第32卷，第9期.Gregory，2011。

[0132] 图13示出了LPS和Poly(I:C)的结构。

[0133] 图14示出了使用多种应激物(气源性过敏原)的具有挑战性的HNEpC的实验设计

[0134] 图15示出了在500nM浓度下用于验证针对不同气源性过敏原应激的HNEpC的脂质特异性的不同类延长素(ELV)。

[0135] 图16示出了使用CyQuant LDH测定的细胞毒性测定。质膜的损伤会将LDH释放到周围的细胞培养基中。培养基中的细胞外LDH可以通过偶联的酶促反应进行量化，其中LDH通过NAD+还原为NADH而催化乳酸转化为丙酮酸。心肌黄酶对NADH的氧化导致四唑鎓盐(INT)还原为红色甲臜产物，该产物可在490nm分光光度计下进行测量。甲臜形成的水平与释放到培养基中的LDH的量成正比，这指示细胞毒性。

[0136] 图17A和图17B示出了使用CyQuant LDH测定的细胞毒性测定。

[0137] 图18A和图18B示出了使用Presto Blue HS试剂的细胞活力测定。

[0138] 图19A和图19B示出了ELISA(IL-6)。

[0139] 图20A和图20B示出了ELISA(IL-1β)。

[0140] 图21A和图21B示出了ELISA(IL-8)。

[0141] 图22A和图22B示出了ELISA(CCL2)。

[0142] 图23A和图23B示出了ELISA(CXCL1)。

[0143] 图24A和图24B示出了ELISA(VEGF)。

[0144] 图25A和图25B示出了ELISA(ICAM1)。

[0145] 图26A和图26B示出了ELISA(IL-10)

[0146] 图27示出了来自以下文献的代表图：《分子医学趋势(Trends in Molecular Medicine)》；2011年10月；第17卷，第10期.Jacquet，2011。

[0147] 图28示出了调节衰老以开发新的合成非脂质类似物以模拟脂质介质的生物活性的收敛机制。

[0148] 图29示出了在人RPE细胞中被NPD1和ELV-32:6抵消的氧化应激和爱拉斯汀(Erastin)诱导的细胞死亡。

[0149] 图30显示类延长素减弱爱拉斯汀介导的PEBP-1磷酸化(改编自Wenzel等人，2017，《细胞(Cell)》，171:628-641)。

[0150] 图31示出了类延长素对铁死亡和衰老的上游调节。

[0151] 图32显示MFRP(膜卷曲相关蛋白)的缺失导致进行性PRC退化。

[0152] 图33示出了$AdipoR1^{-/-}$和$MFRP^{rd6}$中PC44:12和56:12的选择性丧失。

[0153] 图34示出了患有AMD的人视网膜中的靶标。

[0154] 图35示出了AMD,其显示PC在富含锥体的黄斑和富含杆的外围中的选择性差异;MALDI MS分子成像显示出明显的分层。

[0155] 图36示出了通过PathHunterβ-抑制蛋白酶片段互补/β-半乳糖苷酶针对orphanMAX板(加利福尼亚州弗里蒙斯特市欧陆基团(Eurofins,Fremonst,CA)的DiscoverX)筛选的168个GPCR靶标和73个孤儿GPRC(拮抗剂或部分激动剂)的热图。不希望受理论束缚,GPCR靶标(蓝色箭头)显示出高于阈值的活性。使用NPD1、ELV-N-32或ELV-N-34(5μM)或媒剂进行测定,与表达GPCR板的细胞一起孵育,37℃,90分钟。使用PerkinElmer EnVision多模式化学发光读取微孔板。使用CBIS数据套件(加利福尼亚州ChemInnovation)分析活性。进行两次盲筛;结果两次都是一样的。使用活性百分比(激动剂)和抑制百分比(拮抗剂)值,用GraphPad Prism 8.2生成彩虹色热图。使用具有最小值0和最大值60的统一图例完成的颜色映射。只有具有高截止值(绿色到红色)颜色强度的GPCR被视为候选者(蓝色箭头)。

[0156] 图37显示诱导特定AdipoR1分子的表达和激活将在5xFAD小鼠视网膜病理学早期发展过程中补偿神经保护介质的缺陷(1)脂质介质通路和ELOVL-4的前体和中间体的缺乏。(A)来自其PC 54-12和PC56-12前体的NPD1、32:6n-3和34:6n-3类延长素的生物合成通路。对于质谱检测,使用VLC-PUFA的稳定单羟基产物。(B)视网膜(顶部)和RPE层(底部)中游离32:6n-3和34:6n-3 VLC-PUFA、27-单羟基32:6n-3和29-单羟基34:6n-3 VLC-PUFA、游离DHA以及NPD1的条形图。(C-D)RPE和视网膜中15-脂氧合酶-1表达的蛋白质印迹和定量。在RPE中,5xFAD中15-脂氧合酶-1的表达低于WT RPE。在视网膜中,两组之间没有差异。这解释了为什么NPD1水平在5xFAD中较低,但视网膜没有变化。ELOVL4仅在视网膜中表达,并且在5xFAD中表达较低。因此,游离的32:6n-3和34:6n-3较少,单羟基分子也较少。(NS:不显着,*P<0.05,使用学生t检验比较)。

[0157] 图38示出了NPD1、ELV32和ELV34与通过Path Hunterβ-抑制蛋白互补进行阳性筛选的GPCR之间的相互作用。描绘了脂质显示出拮抗作用(红色)和激动剂活性(蓝色)的受体。带圆圈的GPCR显示活性超过阈值,而其余为临界值。因为path-hunter是一个异源系统,作为一种替代方法,我们也可以测试没有达到极限活动但接近极限活动的GPCR。

[0158] 图39显示UOS上调促炎转录组并下调RPE单细胞中的促稳态通路。NPD1和ELV32-6抑制了这些变化。箱形图中的点代表单个RPEC的基因表达(每个样品总共96个)。P<0.001(***),P<0.01(**),单因素Anova,利用事后Tukey HSD检验进行多重比较。

[0159] 图40示出了基于人谷胱甘肽还原酶的X射线结构的谷胱甘肽还原酶的结构。

[0160] 图41示出了对靶候选蛋白TXNRD1的分析。所示结构基于人NADP(H)硫氧还蛋白还原酶I的X射线结构。

[0161] 图42示出了调节衰老以开发新的合成非脂质类似物以模拟脂质介质的生物活性的收敛机制。

[0162] 图43显示使用MEA系统从不同的下丘脑神经元记录群体水平的电活动。

[0163] 图44示出了类延长素对成年肥胖糖尿病小鼠(db/db)中下丘脑神经元细胞死亡的保护(通过Fluoro-Jade B染色)。

[0164] 图45示出了在暴露于寡聚淀粉样蛋白β(Oaβ)(10μM)的人神经元-神经胶质(HNG)

细胞中测量的衰老相关的β-半乳糖苷酶活性。(A-G)用Oaβ(10μM)和不同的类延长素(ELV)或浓度为500nM的神经保护素D1(NPD1)处理的HNG细胞中的SA-β-Gal活性。用明场显微镜获得显微照片。(H)(A-G)中所示的SA-β-Gal+细胞的定量。在至少150个总细胞的3个随机区域中对SA-β-Gal+细胞进行评分。结果表示为染色的SA-β-Gal+细胞的百分比(平均值±SEM)。使用Graphpad Prism软件8.3进行统计分析。将结果与单因素ANOVA相比,然后进行Holm's Sidak事后检验,并且p<0.05被认为具有统计学意义。

[0165] 图46示出了在暴露于爱拉斯汀(10μM)的人神经元-神经胶质(HNG)细胞中测量的衰老相关的β-半乳糖苷酶活性。(A-G)用爱拉斯汀(10μM)和不同的类延长素(ELV)或浓度为500nM的神经保护素D1(NPD1)处理的HNG细胞中的SA-β-Gal活性。用明场显微镜获得显微照片。(H)(A-G)中所示的SA-β-Gal+细胞的定量。在至少150个总细胞的3个随机区域中对SA-β-Gal+细胞进行评分。结果表示为染色的SA-β-Gal+细胞的百分比(平均值±SEM)。使用Graphpad Prism软件8.3进行统计分析。将结果与单因素ANOVA相比,然后进行Holm's Sidak事后检验,并且p<0.05被认为具有统计学意义。

[0166] 图47示出了实验设计:使用Oaβ或爱拉斯汀攻击人神经元神经胶质(HNG)细胞。

[0167] 图48显示ELV34恢复IL1β在人糖尿病脂肪细胞中的作用。A)实验设计。B)通过Taqman实时PCR方法,TP53和IL8在人糖尿病和非糖尿病脂肪细胞中的表达水平。

[0168] 图49显示ELV34降低了糖尿病db/db小鼠下丘脑中IL1β诱导的IL6(SASP标志物)的水平,这表明下丘脑神经元和星形胶质细胞经历SP。在雌性和雄性小鼠中观察到不同的效果。

[0169] 图50示出了db/db小鼠相对于WT的特性。

[0170] 图51显示ELV34处理增加了脂联素的水平,脂联素是一种由脂肪细胞和促进胰岛素敏感性的其它组织(下丘脑)分泌的抗糖尿病全身激素。A)用ELV34处理的糖尿病下丘脑在女性和男性中显示出脂联素增加的趋势。B)ELV34在皮下脂肪组织(SAT)和内脏脂肪组织(VAT)中的不同作用。SAT和VAT具有不同的褐变能力19。

[0171] 图52显示在5xFAD的视网膜中磷脂酰胆碱分子种类中缺乏VLC-PUFA。(A)6个月大的5xFAD(n=6)和野生型(n=6)的PC热图分析。两个主要的PC集群具有不同的特征。第1组描绘了5xFAD中丰富的PC,而第2组示出了WT中普遍存在的PC,其中大多数PC含有VLC-PUFA。(B)PC的PCA分析说明两个群体(WT-黑和5xFAD-红)跨主要组分1散布。因此,主要组分1的负载评分对于鉴定不同的PC以区分WT和5xFAD至关重要。(C)PC对主要组分1的负载评分(绝对值)。负载评分越高,PC对主要组分区分WT和5xFAD的贡献越大(SI附录,图S1A)。PC中含有的十个短链PUFA(<48C)被发现于负载评分最高的12个PC中(C),而PC中含有的VLCPUFA贡献了两个(58:1和58:12)。(D)针对WT和5xFAD的PC的随机森林分类中使用的时间。使用的时间越长,WT和5xFAD差异中的PC越有价值(SI附录,图S1B)。PC中含有的VLC-PUFA贡献了该分类中使用的12个最高时间中的七个(D)。(E-G)含有VLC-PUFA(E)、DHA(F)和AA(G)的PC的箱形图。WT具有更多含有VLC-PUFA和DHA的PC,而5xFAD具有更多含有AA的PC。(*P<0.05,学生t检验)

[0172] 图53显示在5xFAD的RPE的磷脂酰胆碱分子种类中缺乏VLC-PUFA。(A)6个月大的5xFAD(n=6)和WT(n=6)的PC的热图分析。PC中含有的VLC-PUFA在5xFAD中较少。(B)5xFAD和WT的RPE中PC的PCA。有两个群体跨主要组分1散布。然而,它不像在视网膜中的分布那样清楚(图52)。出于这个原因,主要组分1的负载评分对于鉴定不同的PC以区分WT和5xFAD至

关重要。(C)PC对主要组分1的负载评分(绝对值)。负载评分越高,PC对主要组分1区分WT和5xFAD的贡献越大(图59,图片C)。PC中含有的六个短链PUFA(<48C)被发现于负载评分最高的12个PC中(C),而PC中含有的VLC-PUFA贡献了六个(50:8、50:12、52:8、54:12、56:12和58:12)。(D)针对WT和5xFAD的PC的随机森林分类中使用的时间。使用的时间越长,WT和5xFAD差异中的PC越有价值(图59,图片D)。PC中含有的VLC-PUFA贡献了该分类中使用的12个最高时间中的九个(D)。(E)WT和5xFAD视网膜(上)和眼杯(RPE,下)中PC38-6、PC40-6和PC44-12百分比的小提琴图。令人惊讶的是,眼杯PC显示,与WT相比,5xFAD的PC38:6更多,PC44-12更少,并且PC40-6相等。(NS:不显着,*P<0.05,学生t检验)。

[0173] 图54示出了在5xFAD中在视网膜病理学的早期发展过程中脂质介质通路和ELOVL-4的前体和中间体的缺乏。(A)NPD1的生物合成通路以及来自PC 54-12和PC56-12的32:6n-3和34:6n-3 ELV的生物合成通路。(B)游离的32:6n-3和34:6n-3。(C)27-单羟基32:6n-3和29-单羟基34:6n-3,二者分别是ELV N-32和ELV N-34的过氧羟基前体的稳定衍生物。(D)游离的DHA。(E)NPD1。在B-E中,视网膜(上)和RPE(下)(n=6/组)。(F和H)RPE和视网膜中的15LOX1和ELOVL4蛋白质印迹以及定量(n=6/组)。在RPE中,5xFAD中的15-脂氧合酶-1少于WT。在视网膜中,两组之间没有差异。这与5xFAD中较低的NPD1池大小一致,但视网膜中没有变化(E)。ELOVL4仅在视网膜中表达,并且在5xFAD中较低。因此,游离的32:6n-3和34:6n-3较少,单羟基稳定前体衍生物也较少。(NS:不显着,*P<0.05,学生t检验)。

[0174] 图55示出了5xFAD视网膜的形态和功能。(A)V log I绘图示出了0到0.075cd·s/m2的闪光的最大ERG b波振幅。5xFAD达到约100μV的最大振幅,约为针对WT记录的一半(n=6/组)。(B)6个月大的5xFAD视网膜的电子显微镜,其展示了与WT的相似之处。(Bi)5xFAD RPE细胞的基底侧,其示出了沿布鲁赫膜(Br)的膜折叠。(Bii)杆外段基部的圆盘合成区域(箭头),其示出了来自连接纤毛(CC)膜(WT)的新形成的圆盘。(Biii)5xFAD中的类似区域,其显示新的磁盘形成(箭头)。(Biv)5xFAD中细胞体层(N,光感受器核)的巩膜边缘处的外界膜(OLM,箭头)。Müller细胞(M)的细胞质比PRC的细胞质轻。(Bv)5xFAD RPE细胞和杆状PRC尖端(PR)之间的接口。RPE细胞质内的两个吞噬体(Ph);较低的Ph保持在RPE心尖突内,而上部较暗的Ph更老,并且刚刚进入RPE细胞体,这展示了正常的吞噬功能。(Bvi)5xFAD的内段线粒体(M)保留了非常细长的PRC。(C)五个月大的WT和5xFAD视网膜切片,其展示了5xFAD视网膜内的正常PRC轮廓。(D)对来自WT和5xFAD的视网膜的荧光染色。蓝色(DAPI)是5xFAD中6个月大时RPE层中的细胞核和红色Aβ。(*P<0.05,学生t检验)。

[0175] 图56显示在WT小鼠中视网膜下注射OAβ后,ELV可恢复RPE形态并降低基因表达。(A)体内实验设计:将6个月大的C57BL/6J WT小鼠分为7组(n=12/组):未注射、PBS、仅OAβ、OAβ+ELV-N-32、OAβ+ELV-N-34、仅ELV-N-32和仅ELV-N-34。在第3天,分离mRNA用于实时PCR。在第7天,对小鼠进行OCT,然后对眼睛进行去核并加工用于整体RPE染色和蛋白质印迹。(B)带有紧密连接标志物、紧密连接蛋白(Zonula occludens)-1(ZO-1)抗体的RPE的全平面安装。OAβ破坏了RPE形态。(C)OCT对视网膜和RPE的OAβ影响。(D)OAβ注射组中PRC层的厚度较薄。(E)Oaβ(1-42)注射和用ELV处理后的RPE基因表达。(E-G)绘制相同功能组中的基因表达。衰老相关和AMD相关基因(E),以及胶原酶、明胶酶、间质溶解素和其它基质金属蛋白酶(MMP)(F)以及自噬(G)。(H)p16INK4a,一种衰老的关键标志物,RPE的蛋白质印迹。(I)OAβ(1-42)注射和用ELV处理后的视网膜凋亡基因表达。(*P<0.05,学生t检验)。

[0176] 图57显示OA-β介导的衰老相关分泌表型(β-半乳糖苷酶,SA-β-Gal)的激活和原代培养物中人RPE细胞中基因表达的激活被ELV抵消。(A)体外实验设计:用10μM OAβ+/-ELV处理原代人RPE细胞。3天后,分离RNA并进行qPCR分析。7天后,对细胞进行β-半乳糖苷酶染色。(B)7天后明场显微镜下的活细胞图像。(C)β-Gal染色+/-ELV。β-Gal阳性细胞百分比的定量。ELV减少了阳性衰老细胞。(D)OAβ(1-42)暴露+/-ELV后,衰老、AMD相关和自噬基因的基因转录。(*P<0.05,学生t检验)。

[0177] 图58示出了ELV对OAβ诱导的RPE和PRC损伤的影响的总结。(A)OAβ诱导衰老程序并破坏RPE紧密连接。不希望受理论束缚,OAβ穿透视网膜,从而在我们的体内WT小鼠研究中导致PRC细胞死亡,这反映在较少的细胞体层(CBL)细胞核中。ELV可恢复RPE形态和PRC完整性。(B)OAβ诱导RPE中衰老、自噬、基质金属蛋白酶和AMD相关基因的表达以及视网膜中凋亡基因的表达。ELV下调OAβ-基因诱导。描绘了ELV合成的通路。

[0178] 图59示出了用于视网膜和RPE中所有PC种类的主要组分分析负载评分和随机森林时间。(A)视网膜中所有PC对主要组分1的完全负载评分(绝对值)。负载评分越高,PC对主要组分1区分来自野生型和5xFAD的视网膜的贡献越大。(B)针对野生型和5xFAD小鼠的所有视网膜PC的随机森林分类中使用的时间。使用的时间越长,野生型和5xFAD差异中的PC越有价值。(C)RPE中所有PC对主要组分1的负载评分(绝对值)。负载评分越高,PC对主要组分1区分来自野生型和5xFAD的RPE的贡献越大。(D)针对野生型和5xFAD小鼠的所有RPE的PC的随机森林分类中使用的时间。使用的时间越长,野生型和5xFAD差异中的PC越有价值。

[0179] 图60显示PC的脂肪酸组成是通过完全碎裂获得的。负离子模式用于LC/MS/MS数据采集。描绘了含有VLC-PUFA的PC;(A)PC54:12(m/z 1076(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 1018(M+H+))由FA32:6(m/z 467)和FA22:6(m/z 327)构成。(B)PC56:12(m/z1104(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 1046(M+H+))由FA34:6(m/z 495)和FA22:6(m/z 327)构成。(C)PC58:12(m/z 1132(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 1074(M+H+))由FA36:6(m/z 523)和FA22:6(m/z 327)构成。含有DHA的PC位于第二行;(D)PC38:6(m/z 864(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 806(M+H+))由FA16:0(m/z 255)和FA22:6(m/z 327)构成。(E)PC40:6(m/z 892(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 834(M+H+))由FA18:0(m/z 283)和FA22:6(m/z 327.0)构成。(F)PC44:12(m/z 936(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 878(M+H+))由两个FA22:6(m/z 327.0)构成。含有AA的PC位于第三行;(G)PC36:4(m/z 840(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 782(M+H+))由FA16:0(m/z 255)和FA20:4(m/z 303)构成。(H)PC38:4(m/z 868(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 810(M+H+))由FA18:0(m/z 283)和FA20:4(m/z 303)构成。(I)PC38:5(m/z 866(M+CH3COO-)对应于正模式下的m/z 808(M+H+))由FA18:1(m/z 281)和FA20:4(m/z303)构成。该峰也来自PC38:6同位素(两个碳被天然C13标记)。这将产生FA16:0(m/z 255)和FA22:6(当两个碳是C13时,m/z 329),或FA16:0(当一个碳是C13时,m/z 256)和FA22:6(当一个碳是C13时,m/z 328)。

[0180] 图61示出了ELV和前体分子以及NPD1的完全碎裂光谱。(A)类延长素前体、游离脂肪酸FA32:6n-3和FA34:6-n-3的完全碎裂光谱示出了分子结构和碎裂模式。(B)类延长素的稳定前体、内源性27-单羟基32:6和29-单羟基34:6显示出与结构中所示的理论碎裂模式的良好匹配。(C)类延长素、ELV32和ELV34的完全碎裂。标准品表现出结构和碎裂模式中显示的所有峰。(D)NPD1碎裂光谱用理论值进行描述。

[0181] 图62示出了眼底和OCT分析。(A)野生型(WT)和5xFAD小鼠的眼底和光学相干断层扫描(OCT)图像。小鼠约6个月大。(B)光感受器层的厚度分析。WT和5xFAD之间没有区别。

[0182] 图63显示炎症信号被5xFAD激活。(A)WT和5xFAD中RPE的AMD相关基因的相对归一化表达。分离来自WT和5xFAD(6个月大)的眼杯/脉络膜的RNA,并将其逆转录为cDNA,并用AMD相关基因进行RT-PCR。简而言之,在5xFAD中存在与AMD相关的不同基因的激活。(B)视网膜中炎症基因的相对归一化表达。分离来自WT和5xFAD(6个月大)的视网膜的RNA,并将其逆转录为cDNA,并用不同的炎症基因进行RT-PCR。简而言之,在5xFAD中存在炎症信号传导的激活。

[0183] 图64示出了寡聚体Aβ的蛋白质印迹。寡聚化24小时后,将2μl的Aβ原液负载到tricine凝胶中,无需变性。

[0184] 图65示出了未折叠蛋白反应(UPR)基因。注射3天后,分离来自RPE和视网膜的RNA并将其逆转录为cDNA,并用UPR引物进行RT-PCR。这些基因的RPE(A)和视网膜(B)均没有变化。

[0185] 图66示出了如本文所用的抗体。

[0186] 图67示出了如本文所用的基因引物序列。

具体实施方式

[0187] 在更详细地描述本公开之前,本公开不限于所描述的特定实施例,并且因此当然可以变化。本文使用的术语仅出于描述特定实施例的目的,而并不旨在是限制性的,因为本公开的范围将仅由所附权利要求书限定。

[0188] 在提供值的范围的情况下,介于所述范围的上限与下限之间的每个中间值(除非上下文另外清晰地指示,否则到下限的单位的十分之一)以及在所陈述的范围内的任何其它陈述值或中间值均被涵盖在本公开之内。这些较小范围的上限和下限可以被独立地包含在所述较小的范围内,并且也被涵盖在本公开之内,受所陈述范围内任何特别排除的限值的限制。在所陈述范围可以包含一个或两个限值的情况下,排除了那些被包含的限值中的任一个或两个限值的范围也被包含在本公开之内。

[0189] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员所理解的含义相同的含义。虽然与本文所描述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以用于本公开的实践或测试中,但是现在描述有利的方法和材料。

[0190] 在本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物或专利被确切且单独地指示为通过引用并入一样,并且通过引用并入本文以结合所引用的出版物来公开和描述所述方法和/或材料。对任何出版物的引用是针对其在提交日之前的公开内容,并且不能理解为承认本公开因先前的公开而无权先于此类出版物。进一步地,所提供的公开日期可能与实际的公开日期不同,实际的公开日期可能需要单独确认。

[0191] 如对于本领域技术人员将显而易见的是,在阅读本公开时,本文描述和说明的单独实施例中的每一个均具有离散的组成部分和特征,所述组成部分和特征可以在不偏离本公开的范围或精神的情况下易于与任何其它一些实施例的特征分离或组合。任何所叙述的方法都可以按所叙述的事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序执行。

[0192] 除非另有说明，否则本公开的实施例将采用在本领域技术范围内的医学、有机化学、生物化学、分子生物学、药理学、毒理学等技术。此类技术在文献中有充分解释。

[0193] 必须注意，如在说明书和所附权利要求书中所使用的，除非上下文另外清楚地指示，否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”可以包含复数指示物。因此，例如，对“支撑物”的引用可以包含多种支撑物。在本说明书和以下权利要求书中，将参考大量术语，这些术语可以具有以下含义，除非具有明显的相反意图。

[0194] 如本文所使用的，除非另有说明，否则以下术语具有赋予其的含义。在本公开中，“包括(comprise/comprising)”、“含有(containing)”和“具有(having)”等可以具有美国专利法赋予其的含义并且可以意指“可以包含(can include)”、“包含(including)”等；当应用于本公开所涵盖的方法和组合物时，“基本上由……组成(consisting essentially of/consists essentially)”等可以指类似于本文所公开的组合物的组合物，但是所述组合物可以含有另外的结构基团、组合物组分或方法步骤(或如本文所讨论的类似物或其衍生物)。然而，与本文所公开的对应组合物或方法的另外的结构基团、组合物组分或方法步骤相比，此类另外的结构基团、组合物组分或方法步骤等不会实质性地影响组合物或方法的一个或多个特性。

[0195] 无论本文何处使用了“例如”、“如”、“包含”等短语，除非另有明确说明，否则应理解为短语“和但不限于”跟随其后。类似地，“实例”、“示例性”等应理解为非限制性的。

[0196] 术语“基本上”允许与对预期目的不产生负面影响的描述符的偏离。即使“基本上”一词没有明确地列举出来，描述性术语也应理解为由术语“基本上”修饰。

[0197] 如本文所使用的，本文中使用术语“约”意指大约、大致、左右或在其区域中。当结合数值范围使用术语“约”时，所述术语通过扩展所阐述的数值以上和以下的界限来修改所述范围。通常，本文中使用术语“约”按向上或向下(更高或更低)例如20％的变化来修饰所述值以上和以下的数值。

[0198] 在描述各个实施例之前，提供以下示例性描述。

[0199] 如本文所使用的，术语烷基、烷氧基、羰基等如化学领域技术人员所理解的那样使用。如本说明书中所使用的，烷基可以包含直链、支链和环状烷基，其含有至多约20个碳，或1到16个碳，并且是直链或支链的。本文的烷基可以包含但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、叔戊基和异己基。

[0200] 如本文所使用的，低级烷基可以指具有约1个或约2个碳直至约6个碳的碳链。合适的烷基可以是饱和的或不饱和的。进一步地，烷基也可以在一个或多个碳上被选自由以下组成的组的取代基取代一次或多次：C1-C15烷基、烯丙基、二烯基、烯基、C3-C7杂环、芳基、卤基、羟基、氨基、氰基、氧代、硫代、烷氧基、甲酰基、羧基、甲酰胺基、磷酰基、膦酸酯、膦酰胺基、磺酰基、烷基磺酸酯、芳基磺酸酯和磺酰胺。此外，烷基可以包含有至多10个杂原子，在某些实施例中，1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个杂原子取代基。合适的杂原子可以包含氮、氧、硫和磷。

[0201] 如本文所使用的，“环烷基”可以指单环或多环系统，在某些实施例中为3到10个碳原子，在其它实施例中为3到6个碳原子。环烷基的环系统可以由一个环或两个或更多个可以以稠合、桥接或螺连接方式连接在一起的环构成。

[0202] 如本文所使用的，“芳基”可以指含有3到16个碳原子的芳香族单环或多环基团。如

在本说明书中所使用的，芳基是芳基，其可以含有至多10个杂原子，在某些实施例中，1个、2个、3个或4个杂原子。芳基也可以被芳基或低级烷基取代一次或多次，在某些实施例中，1到3或4次，并且它还可以稠合到其它芳基或环烷基环上。合适的芳基可以包含例如苯基、萘基、甲苯基、咪唑基、吡啶基、吡咯基、噻吩基、嘧啶基、噻唑基和呋喃基。

[0203] 如在本说明书中所使用的，环可以具有至多20个原子，其可以包含一个或多个氮、氧、硫或磷原子，条件是该环可以具有一个或多个选自由以下组成的组的取代基：氢、烷基、烯丙基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、氯、碘、溴、氟、羟基、烷氧基、芳氧基、羧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、酰氨基、甲酰氨基、氰基、氧代、硫代、烷硫基、芳硫基、酰硫基、烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、磷酰基、膦酸盐、膦酰胺基和磺酰基，并且进一步地，条件是该环还可以含有一个或多个稠环，包含碳环、杂环、芳基或杂芳基环。

[0204] 如本文所使用的，如果未指定，则烯基和炔基碳链含有2到20个碳，或2到16个碳，并且是直链或支链的。在某些实施例中，2到20个碳的烯基碳链含有1到8个双键，并且在某些实施例中，2到16个碳的烯基碳链含有1到5个双键。在某些实施例中，2到20个碳的炔基碳链含有1到8个三键，并且在某些实施例中，2到16个碳的炔基碳链含有1到5个三键。

[0205] 如本文所使用的，“杂芳基”可以指单环或多环芳香族环系统，在某些实施例中，其具有约5到约15个成员，其中所述环系统中的一个或多个(在一个实施例中，1到3个)原子是杂原子，即除碳以外的元素，包含但不限于氮、氧或硫。杂芳基可以稠合到苯环上。杂芳基可以包含但不限于呋喃基、咪唑基、吡咯烷基、嘧啶基、四唑基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-甲基吡咯基、喹啉基和异喹啉基。

[0206] 如本文所使用的，“杂环基”可以指单环或多环非芳香族环系统，在一个实施例中，其具有3到10个成员，在另一个实施例中，具有4到7个成员，在另外的实施例中，具有5到6个成员，其中所述环系统中的一个或多个(在某些实施例中，1到3个)原子是杂原子，即除碳以外的元素，包含但不限于氮、氧或硫。在其中杂原子是氮的实施例中，氮被烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基、杂环基、环烷基烷基、杂环基烷基、酰基、胍基取代，或者氮可以被季铵化以形成铵基，其中如本文所述选择取代基。

[0207] 如本文所使用的，“芳烷基”可以指其中烷基的一个氢原子被芳基替换的烷基。

[0208] 如本文所使用的，术语“卤基”、“卤素”或“卤化物”可以指F、Cl、Br或I。

[0209] 如本文所使用的，“卤代烷基”可以指其中一个或多个氢原子被卤素替换的烷基。此类基团可以包含但不限于氯甲基和三氟甲基。

[0210] 如本文所使用的，“芳氧基”可以指RO-，其中R是芳基，包含低级芳基，如苯基。

[0211] 如本文所使用的，“酰基”可以指-COR基团，包含例如烷基羰基、环烷基羰基、芳基羰基或杂芳基羰基，所有这些都可以被取代。

[0212] 如本文所使用的，“n-3”或“n-3”、“n-6”或“n6”等可以指多不饱和脂肪酸或其衍生物的惯用命名法，其中双键(C=C)位于从脂肪酸或脂肪酸衍生物的碳链末端(甲基末端)计数的碳原子处。例如，“n-3”意指从脂肪酸或脂肪酸衍生物的碳链末端计数的第三个碳原子。类似地，“n-3”或“n-3”、“n-6”或“n6”等也可以指如羟基(OH)等定位在脂肪酸或脂肪酸衍生物的碳原子上的取代基的位置，其中数字(例如3、6等)是从脂肪酸或脂肪酸衍生物的碳链末端开始算起的。

[0213] 如本文所使用的，除非另外指示，否则任何保护性基团和其它化合物的缩写根据

其常见用途或IUPAC-IUB生物化学命名委员会(Commission on Biochemical Nomenclature)均为公认的缩写(参见,(1972)《生物化学(Biochem.)》11:942-944)。

[0214] 如本文所使用的,其中在本公开的化合物的化学结构中被显示为具有末端羧基"-COOR","R"可以表示与羧基共价键合的基团,如烷基。在替代方案中,羧基可以进一步具有负电荷"-COO-",并且R为阳离子,包含金属阳离子、铵阳离子等。

[0215] 术语"受试者"或"患者"可以指可以向其施用本发明的方面的任何生物体,例如,用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。术语"受试者"可以包含哺乳动物,例如患有病理学的任何年龄的人。在另一个实施例中,该术语涵盖处于患病理学风险中的受试者。可以被施用本公开的化合物的受试者将是动物,例如哺乳动物,如灵长类动物,尤其是人类。对于兽医应用,多种受试者将是合适的,例如家畜,如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;家禽,如鸡、鸭、鹅、火鸡等;以及家养动物,例如宠物,如狗和猫。对于诊断或研究应用,多种哺乳动物将是合适的受试者,包含啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物和猪(如近交系猪)等。术语"活的受试者"可以指本文中提到的受试者或另一种活的生物体。术语"活的受试者"可以指整个受试者或生物体,而不仅仅是从活的受试者中切除的部分(例如,肝脏或其它器官)。

[0216] "患有病状的受试者(subject afflicted with a condition或a subject having a condition)"可以指患有现有病状或已知或疑似有患病状的倾向的受试者。在实施例中,所述病状可以是炎性疾病,如过敏性炎性疾病。在另一个实施例中,所述病状可以是与细胞衰老、铁死亡或两者相关的疾病,如与Aβ相关的疾病,包含年龄相关性黄斑变性或阿尔茨海默病。作为又一个实施例,所述疾病可以是代谢紊乱,如糖尿病、肥胖症或两者。

[0217] 作为一个实例,"患有过敏性病状的受试者"可以指患有现有过敏性病状或已知或疑似有患过敏性病状的倾向的受试者。因此,受试者可能患有活动性过敏性病状或潜在过敏性病状。没有必要知道过敏原。然而,某些过敏性病状与季节性或地理环境因素有关,这些因素对受试者来说可能但不一定是显而易见的。在一个实施例中,出于实验目的,有意在受试者中诱发过敏性病状。

[0218] 如本文所使用的,化合物的"药学上可接受的衍生物"可以包含其盐、酯、烯醇醚、烯醇酯、缩醛、缩酮、原酸酯、半缩醛、半缩酮、酸、碱、溶剂化物、水合物或前药。本领域技术人员可以使用用于这种衍生化的已知方法容易地制备这种衍生物。所产生的化合物可以施用于动物或人,而没有实质的毒性作用,并且具有药学活性或是前药。

[0219] 药学上可接受的盐可以包含但不限于胺盐,如但不限于N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、氨、二乙醇胺和其它羟烷基胺、乙二胺、N-甲基葡糖胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙胺、1-对氯苄基-2-吡咯烷-1'-基甲基苯并咪唑、二乙胺和其它烷基胺、哌嗪和三(羟甲基)氨基甲烷;碱金属盐,如但不限于锂、钾和钠;碱土金属盐,如但不限于钡、钙和镁;过渡金属盐,如但不限于锌;和其它金属盐,如但不限于磷酸氢钠和磷酸二钠;并且还包含但不限于无机酸的盐,如但不限于盐酸盐和硫酸盐;和有机酸的盐,如但不限于乙酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、丁酸盐、戊酸盐和富马酸盐。

[0220] 药学上可接受的酯可以包含但不限于酸性基团(包含但不限于羧酸、磷酸、次膦酸、磺酸、亚磺酸和硼酸)的烷基酯、烯基酯、炔基酯、芳基酯、杂芳基酯、芳烷基酯、杂芳烷基酯、环烷基酯和杂环基酯。

[0221] 药学上可接受的烯醇醚可以包含但不限于式C=C(OR)的衍生物,其中R是氢、烷

基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基或杂环基。药学上可接受的烯醇醚可以包含但不限于式C＝C(OC(O)R)的衍生物，其中R是氢、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基或杂环基。

[0222] 药学上可接受的溶剂化物和水合物是化合物与一个或多个溶剂或水分子(或1到约100、或1到约10、或1到约2、3或4个溶剂化物或水分子)的复合物。

[0223] 如本文所使用的，“调配物”可以指被选择以提供用于特定最终用途的最佳性质(包含产品规格和/或使用条件)的化合物、混合物或溶液的任何组分的集合。术语调配物可以包含液体、半液体、胶体溶液、分散体、乳液、微乳液和纳米乳液，包含水包油乳液和油包水乳液、糊剂、粉末和悬浮液。本发明的调配物还可以包含或包装有其它无毒化合物，如化妆品载体、赋形剂、粘合剂和填充剂等。具体而言，用于实践本发明的可接受的化妆品载体、赋形剂、粘合剂和填充剂是使化合物易于口服递送和/或提供稳定性从而使得本发明的调配物表现出商业上可接受的储存保质期的那些化妆品载体、赋形剂、粘合剂和填充剂。

[0224] 如本文所使用的，术语“施用”可以指将如VLC-PUFA等物质引入受试者。可以使用任何施用途径，包含例如鼻内、局部、口服、肠胃外、玻璃体内、眼内、眼部、视网膜下、鞘内、静脉内、皮下、经皮、皮内、颅内等施用。在实施例中，“施用”还可以指向受试者提供治疗有效量的调配物或药物组合物。本发明的调配物或药物化合物可以单独施用，但可以与基于所选施用途径和标准制药实践选择的其它化合物、赋形剂、填充剂、粘合剂、载体或其它媒剂一起施用。施用可以通过载体或媒剂进行，如可注射溶液，包含无菌水溶液或非水溶液，或盐溶液；霜剂；洗剂；胶囊剂；片剂；颗粒；丸粒；粉末；悬浮液、乳液或微乳液；贴剂；胶束；脂质体；囊泡；植入物，包含微型植入物；眼药水；其它蛋白质和肽；合成聚合物；微球；纳米颗粒；等。

[0225] 调配物或药物组合物还可以包含或包装有其它无毒化合物，如药学上可接受的载体、赋形剂、粘合剂和填充剂，包含但不限于葡萄糖、乳糖、阿拉伯树胶、明胶、甘露醇、黄原胶、刺槐豆胶、半乳糖、低聚糖和/或多糖、淀粉糊、三硅酸镁、滑石粉、玉米淀粉、淀粉碎片、角蛋白、胶体二氧化硅、马铃薯淀粉、尿素、葡聚糖、糊精等。具体而言，用于实践本发明的药学上可接受的载体、赋形剂、粘合剂和填充剂是使本发明的化合物能够经受鼻内递送、口服递送、肠胃外递送、玻璃体内递送、眼内递送、眼递送、视网膜下递送、鞘内递送、静脉内递送、皮下递送、经皮递送、皮内递送、颅内递送、局部递送等的那些载体、赋形剂、粘合剂和填充剂。此外，包装材料可以是生物惰性的或缺乏生物活性，如塑料聚合物或硅树脂，并且可以由受试者内部加工而不影响与其一起包装和/或递送的组合物/调配物的有效性。

[0226] 可以校准本发明调配物的不同形式以适应不同个体和单个个体的不同需要。然而，本调配物不需要对抗每个人的每个原因。相反，通过对抗必要的原因，本调配物将使身体和大脑恢复其正常功能。然后身体和大脑自己会纠正剩余的不足。

[0227] 如本文所使用的，术语“治疗有效量”可以指所施用的组合物或药物组合物的实施例的量，所述量将在一定程度上缓解正在治疗的疾病或病状的一种或多种症状，和/或将在一定程度上预防正在治疗的受试者患有或有风险患上的病状或疾病的一种或多种症状。如本文可互换使用的，“受试者”、“个体”或“患者”可以指脊椎动物，例如哺乳动物，如人。哺乳动物可以包含但不限于鼠类、猴类、人类、农场动物、竞技动物和宠物。术语“宠物”可以包含狗、猫、豚鼠、小鼠、大鼠、兔子、雪貂等。术语农场动物可以包含马、绵羊、山羊、鸡、猪、牛、

驴、美洲驼、羊驼、火鸡等。

[0228] “药学上可接受的赋形剂”、“药学上可接受的稀释剂”、“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的佐剂”可以指可用于制备药物组合物的赋形剂、稀释剂、载体和/或佐剂，其安全、无毒且在生物学上或其它方面均无不良影响，并且可以包含兽医使用和/或人类药物使用可接受的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。如本文所使用的，“药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和/或佐剂”可以包含一种和多种此类赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。

[0229] 短语“药物组合物”或“药物调配物”可以指适合施用于受试者(如哺乳动物，尤其是人)的组合物或药物组合物，并且可以指一种或多种活性剂或成分与药学上可接受的载体或赋形剂的组合，使得所述组合物适用于体外、体内或离体的诊断、治疗或预防用途。在“药物组合物”中，可以指该组合物是无菌的，并且不含可在受试者体内引起不期望反应的污染物(例如，药物组合物中的化合物是药物级的)。药物组合物可以被设计用于通过多种不同的施用途径向有需要的受试者或患者施用，所述施用途径包含口服、鼻内、局部、静脉内、口腔、直肠、肠胃外、腹膜内、皮内、管内、肌肉内、皮下、通过支架洗脱装置、导管洗脱装置、血管内球囊、吸入装置等。

[0230] 在实施例中，药物组合物可以包括治疗有效量的类延长素和治疗有效量的一种或多种另外的活性剂(如一种或多种抗氧化剂、抗过敏剂、抗炎剂或止疼药)。例如，一种或多种抗氧化剂可以是合成抗氧化剂、天然抗氧化剂或其组合。在实施例中，抗氧化剂可以保护类延长素的双键。

[0231] 术语“施用”可以指将本公开的组合物引入受试者中。组合物的有利施用途径是局部施用、口服施用或鼻内施用。然而，可以使用任何施用途径，如静脉内、皮下、腹膜、动脉内、吸入、阴道、直肠、引入脑脊液、血管内静脉或动脉，或滴入身体隔室。

[0232] 如本文所使用的，“治疗(treatment和treating)”可以指以改善或以其它方式有益地改变疾病或病症的一种或多种症状的任何方式，以对抗病状、疾病或病症为目的对受试者进行管理和护理。该术语可以包含针对患者所患有的给定病状的全方位治疗，如出于以下目的施用活性化合物：减轻或缓解症状或并发症；缓解病状、疾病或病症的进展；治愈或消除病状、疾病或病症；和/或预防病状、疾病或病症，其中“预防(preventing或prevention)”可以指出于阻碍病状、疾病或病症的发展而对患者进行管理和护理，并且可以包含施用活性化合物以预防或降低症状或并发症发作的风险。熟练的技术人员将理解，可以使用多种方法和测定来评估病理学的发展，并且类似地，可以使用多种方法和测定来减少病理学、车道或退化。

[0233] 如本文所使用的，术语“预防”可以指防止疾病、病症或病状发生在可能处于疾病风险但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中。预防(和有效预防剂量)可以在群体研究中得到证明。例如，有效预防给定疾病或病状的量是与未经治疗的对照群体相比，有效降低治疗群体中的发病率的量。

[0234] 短语“减轻症状”可以指改善、减少或消除与过敏性炎性疾病相关的任何病状或症状。例如，过敏性炎症的症状可以包含口腔刺痛或瘙痒；荨麻疹、瘙痒或湿疹；嘴唇、面部、舌头和喉咙或身体其它部位肿胀；喘息鼻塞或呼吸困难；腹痛、腹泻、恶心或呕吐；头晕、头晕目眩或昏厥。

[0235] 待治疗的患者可以是哺乳动物，如人。治疗还涵盖本文组合物的任何药物用途，如

用于治疗本文提供的疾病的用途。

[0236] 在实施例中，组合物可以进一步包括一种或多种“营养组分”。如本文所使用的，术语“营养组分”可以指如蛋白质、碳水化合物、维生素、矿物质和其它有益营养素，包含本公开的功能性成分，即可以对食用食物的人产生特定益处的成分。碳水化合物可以是但不限于葡萄糖、蔗糖、果糖、右旋糖、塔格糖、乳糖、麦芽糖、半乳糖、木糖、木糖醇、右旋糖、聚右旋糖、环糊精、海藻糖、棉子糖、水苏糖、低聚果糖、麦芽糖糊精、淀粉、果胶、树胶、角叉菜胶、菊粉、纤维素基化合物、糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、乳糖醇、异麦芽糖醇、赤藓糖醇、果胶、树胶、角叉菜胶、菊粉、氢化的难消化糊精、氢化的淀粉水解物、高度支化的麦芽糖糊精、淀粉和纤维素。

[0237] 市售的营养蛋白质、碳水化合物等来源及其规格是加工食物调配物领域的普通技术人员已知的或可以容易地确定。

[0238] 本文所述的可以包含营养组分的组合物可以是食物制品，所述食物制品可以是但不限于“零食大小”或“一口大小”的组合物，即比通常被认为是食物棒的东西小。例如，食物棒可以是锯齿状的或穿孔的，以允许消费者折断更小的部分来吃，或者食物“棒”可以是小块，而不是长条形产品。较小的部分可以单独涂层或包覆。它们可以单独或成组包装。

[0239] 食物可以包含未研磨成均质块的固体材料，如但不限于。食物可以涂上或包覆(如但不限于)巧克力，包含黑巧克力、淡巧克力、牛奶巧克力或白巧克力、角豆、酸奶、其它糖果、坚果或谷物。包衣可以是复合糖果包衣或非糖果(例如，无糖)包衣。包衣可以是光滑的或可以含有固体颗粒或碎片。

[0240] 过敏是当一个人的免疫系统对被称为过敏原的外来物质作出反应时。例如，过敏原可以被食用、吸入肺部、注射到受试者体内或触摸。这种过敏反应可能导致咳嗽、打喷嚏、眼睛发痒、流鼻涕和喉咙发痒。在严重的情况下，它会导致皮疹、荨麻疹、低血压、呼吸困难、哮喘发作甚至死亡。即使过敏是该国最常见的疾病之一，但也无法治愈过敏。

[0241] 使用抗过敏药物治疗过敏反应，如溴苯那敏(Dimetane)、西替利嗪(Zyrtec)、氯苯那敏(Chlor-Trimeton)、氯马斯汀(Tavist)、苯海拉明(Benadryl)和非索非那定(Allegra)。许多此类抗过敏药物与不良副作用有关，如嗜睡、头晕、口干/鼻子/喉咙干燥、头痛、胃部不适、便秘或睡眠困难。本文提供的包括VLC-PUFA的药物组合物不会引起这种不期望的副作用，因此是对已知抗过敏药物的改进。

[0242] 本发明的方面涉及用于减轻过敏性炎性疾病的症状、预防或治疗所述过敏性炎性疾病的组合物和方法。参考本文包含的实例，细胞毒性测定(LDH)的结果表明，在向鼻上皮细胞培养物中添加应激物后，红色甲臜的形成显著增加，这指示细胞毒性，通过添加ELV可降低细胞毒性。(图17A和图17B)。此外，使用PrestoBlue HS试剂的细胞活力测定还显示，与用不同应激物攻击的细胞相比，对照细胞中产生更多试卤灵，并且添加ELV可提高细胞活力并为HNEpC提供保护(图18A和图18B)。更进一步地，当HNEpC受到不同应激物的攻击时，与对照相比，促炎细胞因子和趋化因子的产生显著，而抗炎细胞因子的释放显著减少。通过在用相应的应激物攻击后30分钟时添加浓度为500nM的ELV来消除这种增加的促炎细胞因子和趋化因子的产生(图19A和图19B)，而抗炎细胞因子产生的减少则被逆转(图26A和图26B)。

[0243] 本发明的方面还涉及用于减轻与细胞衰老、铁死亡或两者相关的疾病的症状、预防或治疗所述疾病的组合物和方法。例如，所述疾病是与Aβ相关的疾病。此类疾病的非限制

性实例包含年龄相关性黄斑变性或阿尔茨海默病。

[0244] 本发明的方面还进一步涉及用于减轻代谢紊乱的症状、预防或治疗所述过代谢紊乱的组合物和方法。代谢紊乱的非限制性实例包含糖尿病和肥胖症。

[0245] 本公开涵盖用于缓解疾病的症状、预防和治疗疾病的化合物、组合物和方法的实施例。

[0246] 这是基于本文描述的关于某些极长链多不饱和脂肪酸(VLC-PUFA)及其相关羟基化衍生物的令人惊讶的生物活性的新发现。例如,此类生物活性包含某些VLC-PUFA的抗炎作用等。

[0247] 长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)可以包含含有18-22个碳原子的ω-3(n-3)和ω-6(n6)多不饱和脂肪酸,所述多不饱和脂肪酸包含:花生四烯酸(ARA,C20:4n6,即20个碳,4个双键,ω-6)、二十碳五烯酸(EPA,C20:5n-3,20个碳,5个双键,ω-3)、二十二碳五烯酸(DPA,C22:5n-3,22个碳,5个双键,ω-3)和二十二碳六烯酸(DHA,C22:6n-3,22个碳,6个双键,ω-3)。LC-PUFA通过脂氧合酶类酶转化为具有生物活性的羟基化PUFA衍生物,其作为在炎症和相关病状中起重要作用的生物活性脂质介质发挥作用。其中最重要的是在某些炎症相关细胞中通过脂氧合酶(LO或LOX)酶(例如15-LO、12-LO)的作用产生的羟基化衍生物,并导致形成单羟基化、二羟基化或三羟基化的PUFA衍生物,这些衍生物具有强效作用,包含抗炎、促分解、神经保护或组织保护作用等。例如,通过15-脂氧合酶(15-LO)的酶促作用在细胞中形成的神经保护素D1(NPD1),一种来自DHA的二羟基衍生物,被证明具有确定的R/S和Z/E立体化学结构(10R,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-六烯酸)和独特的生物学特征,所述独特的生物学特征包含立体选择性强效抗炎、恢复稳态、促分解、生物活性。NPD1已被证明可调节神经炎症信号传导和蛋白质稳态,并促进神经再生、神经保护和细胞存活。

[0248] 其它重要类型的脂肪酸是n-3和n6极长链多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA、n6 VLC-PUFA),它们在含有延长酶的细胞中产生,所述延长酶将n-3和n6 LC-PUFA延长为含有24到42个碳(C24-C42)的n-3和n6 VLC-PUFA。其中最重要的似乎是具有28-38个碳(C28-C38)的VLC-PUFA。VLC-PUFA的代表性类型可以包含C32:6n-3(32个碳,6个双键,ω-3)、C34:6n-3、C32:5n-3和C34:5n-3。这些VLC-PUFA是通过延长酶(如ELOVL4(极长链脂肪酸4的延长)的作用从生物来源获得的。VLC-PUFA在复合物脂质(包含鞘脂和磷脂)中也被酰化,如在某些分子种类的磷脂酰胆碱中。

[0249] ELOVL4的生物合成作用和VLC-PUFA的生物学功能已成为近期研究的主题。参见例如PCT/US2016/017112、PCT/US2018/023082和US 16/576,456,所述文献中的每一个均可以通过引用整体包含在本文中。这些VLC-PUFA在膜组织中显示功能,并且其对健康的重要性日益得到认可。

[0250] 本公开的实施例所涵盖的化合物、组合物和方法涉及使用n-3 VLC-PUFA来减轻疾病的症状、预防或治疗疾病。

[0251] n-3 VLC-PUFA的生物合成通路:n-3 VLC-PUFA的生物合成起始于在碳链中仅含有偶数个碳的低碳PUFA,如含有22个碳和6个交替的C=C键的二十二碳六烯酸(DHA)(C22:6n-3),以及含有22个碳和5个交替的C=C键的二十二碳五烯酸(DPA)(C22:5n-3)。n-3 VLC-PUFA的生物合成需要DHA或其它短链PUFA作为底物,以及某些延长酶(例如ELOVL4)的存在和作用。如图1和2中所总结的,这些22个碳的ω-3长链脂肪酸(n-3LC-PUFA)是延长酶(如

ELOVL4)的底物,所述延长酶每次在羧基末端添加2个碳的CH_2CH_2基团,从而形成含有碳链的n-3 VLC-PUFA,所述碳链具有至少24个碳到至少42个碳。

[0252] 二十二碳六烯酸(DHA,C22:6n-3,1)在磷脂酰胆碱分子种类(3)的2-位并入,并通过延长酶转化为更长链的n-3 VLC-PUFA。延长酶ELOVL4(极长链脂肪酸-4的延长)的延长导致极长链ω-3多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA,2,包含C32:6n-3和C34:6n-3)的形成,其然后在磷脂酰胆碱分子种类(3)的1-位并入。DHA在2-位的存在以及n-3 VLC-PUFA在1-位的存在可以提供冗余、互补和协同的细胞保护和神经保护作用,当受到病理状况攻击时,所述细胞保护和神经保护作用会放大神经元和其它关键细胞类型的存活率。

[0253] n-3-VLC-PUFA(3)的脂氧合导致形成n-3-VLC-PUFA的酶促羟基化衍生物,其被称为类延长素,所述衍生物可以包含单羟基化合物(例如ELV-27S和ELV-29S,4)以及二羟基衍生物(例如ELV-N-32和ELV-N-34,5)。类延长素ELV-N-32是20R,27S-二羟基32:6衍生物(32个碳、6个双键的类延长素与神经保护素样20(R),27(S)-二羟基模式)。类延长素ELV-N-34是22R,29S-二羟基34:6衍生物(34个碳、6个双键的类延长素与22(R),29(S)-二羟基模式)。

[0254] 图2展示了二十二碳六烯酸(DHA,C22:6n-3)向光感受器的递送、光感受器外段膜的更新和类延长素的合成。DHA或前体C18:3n-3通过饮食获得,DHA本身也是如此(图1)。体循环(主要是门静脉系统)将它们带到肝脏。一旦进入肝脏,肝细胞会将DHA并入到DHA-磷脂(DHA-PL)中,然后将其作为脂蛋白运输到脉络膜毛细血管、神经血管单元和其它组织的毛细血管。

[0255] DHA从脉络膜毛细血管跨过布鲁赫膜(图2),并被视网膜后部的视网膜色素上皮(RPE)细胞吸收,然后被送到光感受器的内段。这种从肝脏到视网膜的靶向递送途径被称为DHA长循环。

[0256] DHA然后通过光感受器细胞外基质(IPM)并到达光感受器内段,在那里它被并入到用于光感受器外段、细胞膜和细胞器的磷脂中。大多数用于圆盘膜生物发生(外段)。随着新的富含DHA的圆盘在光感受器外段的基部合成,旧的圆盘被推向RPE细胞的顶端。光感受器尖端每天被RPE细胞吞噬,从而去除最旧的圆盘。产生的吞噬体在RPE细胞内被降解,并且DHA被再循环回光感受器内段,用于新的圆盘膜生物发生。这种本地再循环被称为22:6短循环。

[0257] 类延长素由ω-3极长链多不饱和脂肪酸(n-3 VLC-PUFA)形成,所述脂肪酸由ELOVL4(极长链脂肪酸-4的延长)在光感受器内段生物合成。因此,在C1处含有VLCω-3FA(描绘了C34:6n-3)并在C2处含有DHA(C22:6n-3)的内段中的磷脂酰胆碱分子种类用于光感受器膜生物发生。已发现这种磷脂与视紫红质紧密相关。作为日常生理过程,一旦圆盘在RPE细胞中被吞噬,在稳态干扰时,磷脂酶A1(PLA1)会在sn-1处切割酰基链,从而释放C34:6n-3并导致形成类延长素(例如类延长素-34,ELV-N-34)。不用于类延长素合成的VLCω-3脂肪酸通过短循环进行再循环。

[0258] 因此,出于生物合成的原因,天然存在和生物遗传衍生的n-3 VLC-PUFA仅含有偶数个碳,范围唯至少24个碳到至少42个碳(即24个、26个、28个、30个、32个、34个、36个、38个、40个、42个碳)。因此,仅含有奇数个碳,范围为至少23个碳到至少41个碳(即23个、25个、27个、29个、31个、33个、35个、37个、39个、41个碳)的n-3 VLC-PUFA不是天然存在的,但可以使用合成化学方法和策略合成和制造。

[0259] 视网膜和大脑中的类延长素ELV-N-32和ELV-N-34的立体控制全合成和结构表征：如图3和图4中所总结的，ELV-N-32(27S-和ELV-N-34是由三个关键中间体(1、2和3)合成的，所述中间体中的每一种都是立体化学纯的形式。中间体2和3的立体化学是通过使用对映体纯的环氧化物起始材料预先定义的。中间体1、2和3的迭代偶联产生ELV-N-32和ELV-N-34(4)，它们被分离为甲酯(Me)或钠盐(Na)。合成材料ELV-N-32和ELV-N-34与在碳链上具有相同碳数的内源性类延长素相匹配，所述内源性类延长素是从经培养的人视网膜色素上皮细胞(RPE)(图3)和神经元细胞培养物(图4)中获得的。

[0260] 类延长素的实验检测和表征：实验证据证明了类延长素的生物合成形成，所述类延长素是单羟基和二羟基n-3 VLC-PUFA衍生物，其分子结构类似于DHA衍生的17-羟基-DHA和二羟基化合物NPD1(10R,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-六烯酸)。类延长素是酶促生成的32-碳(ELV-N-32)和34-碳(ELV-N-34)n-3 VLC-PUFA的羟基化衍生物，因为它们首次在原代人视网膜色素上皮细胞(RPE)的培养物(图3A-3K)和神经元细胞培养物(图4A-4K)中被鉴定出。

[0261] 本公开提供了具有与n-3 VLC-PUFA相关的碳链的化合物，除了具有6个或5个C＝C键之外，它们还含有一个、两个或更多个羟基。考虑到这种类型的化合物可能负责n-3 VLC-PUFA的保护和神经保护作用，我们试图利用添加的32:6n-3和34:6n-3 VLC-PUFA脂肪酸来鉴定所述化合物在培养物中的人视网膜色素上皮细胞中的存在。我们的结果表明了来自32:6n-3和34:6n-3 VLC-PUFA脂肪酸的单羟基和二羟基类延长素衍生物。将这些类延长素(ELV-N-32,ELV-N-34)的结构与通过立体控制的全有机合成以立体化学纯的形式制备的标准品进行比较(图5A和图5B)。

[0262] n-3 VLC-PUFA作为治疗剂的有益作用：本文描述的数据为所提供的n-3 VLC-PUFA和/或类延长素化合物作为预防和治疗疾病的治疗剂的有益用途提供了支持。

[0263] 短语“过敏性疾病”或“过敏性炎性疾病”可以指具有过敏反应的疾病。更具体地说，“过敏性疾病”的特征可以在于暴露于过敏原与病理变化的发展之间的强相关性，以及病理变化具有免疫机制(即过敏性炎性疾病)。例如，免疫机制可以指白细胞对过敏原刺激表现出免疫反应。例如，免疫反应可以指促炎细胞因子和趋化因子的产生增加。过敏原的实例可以包含螨抗原和花粉抗原。代表性的过敏性疾病可以包含支气管哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎或过敏性皮炎、过敏性结膜炎以及花粉和昆虫过敏。过敏体质是一种遗传因素，其可由过敏体质的父母子女遗传。家族性过敏性疾病也被称为特应性疾病，并且致病遗传因素是特应性体质。“特应性皮炎”是特应性疾病的总称，如与皮肤炎症相关的疾病。非限制性实例可以包含选自由以下组成的组的过敏性病状：湿疹、过敏性鼻炎、花粉热、荨麻疹和食物过敏。过敏性病状可以包含湿疹、过敏性鼻炎或鼻感冒、花粉热、支气管哮喘、荨麻疹(荨麻疹(风疹)和食物过敏，以及其它特应性病状。

[0264] “哮喘”可以指以炎症、气道变窄和气道对吸入物质或过敏原的反应性增加为特征的呼吸系统疾病。哮喘通常但不完全与特应性或过敏性症状有关。哮喘的症状被广泛认为包含呼吸困难、咳嗽和喘息；虽然所有三种症状共存，但它们的共存并不是哮喘诊断所必需的。

[0265] 术语“过敏性哮喘”可以指哮喘症状中哮喘的过敏方面，并且可以包含例如混合型哮喘和特应性哮喘。过敏性哮喘与非过敏性哮喘(如阿司匹林哮喘)不同。例如，“哮喘治疗

剂”可以通过对哮喘过敏反应的作用而发挥治疗效果。此外,哮喘治疗剂例如对慢性支气管炎或气道过敏症发挥作用。例如,哮喘治疗剂对慢性支气管炎和气道过敏症有效果。哮喘治疗剂对过敏反应的晚期反应、延迟型反应或晚期和延迟型反应发挥作用。例如,除了即刻型反应外,哮喘的治疗剂还对晚期反应、延迟型反应或晚期和延迟型反应发挥作用。

[0266] “过敏性鼻炎”可以指鼻粘膜的任何过敏反应,其可以包含花粉热(季节性过敏性鼻炎)和常年性鼻炎(非季节性过敏性鼻炎)。过敏性鼻炎的症状可以是打喷嚏、流鼻涕、鼻塞、瘙痒、眼睛发痒、发红和流泪。

[0267] 短语“皮肤病”可以包含荨麻疹和血管性水肿的皮肤反应。这些皮肤病可能因接触某些食物、药物或病毒感染而引发。荨麻疹(被称为风疹或疥疮)是皮肤上不同形状和大小的红色、发痒、凸起的区域。荨麻疹是肥大细胞释放组胺和其它化合物的结果,这些化合物会导致血清从局部血管中渗出,从而导致皮肤肿胀。血管性水肿是一种类似于荨麻疹的组织肿胀形式,但涉及更深的皮肤组织(即“深层荨麻疹”)并且持续时间比荨麻疹长

[0268] 术语“过敏性皮炎”可以指与过敏反应相关的皮炎,并且可以包含例如特应性皮炎。过敏性皮炎与非过敏性皮炎(如因损伤或伤口引起的皮炎)不同。作为“特应性皮炎的治疗剂”,通过作用于特应性皮炎中发生的过敏反应而显示治疗效果的那些是有用的。此外,特应性皮炎的治疗剂对过敏反应的晚期反应、延迟型反应或晚期和延迟型反应有效果。例如,除了即刻型反应外,特应性皮炎的治疗剂还对晚期反应、延迟型反应或晚期反应和延迟型反应有效果。

[0269] 短语“过敏性结膜炎”可以指过敏原对覆盖眼球和眼睑内侧的被称为结膜的透明薄膜的刺激。症状可以包含眼睛肿胀、眼睛发痒/灼热、流泪和眼睛发红。一些过敏原可以包含来自树木、草和豚草的花粉、动物皮肤和如唾液等分泌物、香水和化妆品、皮肤药物、空气污染和烟雾。

[0270] “过敏原”可以指可在受试者中诱发过敏性炎性疾病的物质。过敏原种类繁多,并且可以包含花粉、昆虫毒液、动物皮屑、屋尘螨、灰尘、真菌孢子、乳胶和药物(例如,青霉素)。天然、动物和植物过敏原的实例可以包含以下属所特有的蛋白质:犬属(Canis)(家犬(Canis familiaris));尘螨属(Dermatophagoides)(例如,粉尘螨(Dermatophagoides farinae));猫属(Felis)(家猫(Felis domesticus));豚草属(Ambrosia)(豚草(Ambrosia artemiisfolia));黑麦草属(例如,多年生黑麦草(Lolium perenne)或多花黑麦草(Lolium multiflorum));柳杉属(Cryptomeria)(日本柳杉(Cryptomeria japonica));链格抱属(Alternaria)(链格抱(Alternaria alternata));赤杨木(Alder);梢木属(Alnus)(欧洲梢木(Alnus gultinoasa));桦木属(Betula)(垂枝桦(Betula verrucosa));栎属(Quercus)(美洲白栎(Quercus alba));木犀榄属(Olea)(橄榄(Olea europa));蒿属(Artemisia)(北艾(Artemisia vulgaris));车前属(Plantago)(例如,长叶(Parietaria judaica));墙草属(Parietaria)(例如,药用墙草(Parietaria officinalis)或欧蓄草(Parietaria judaica));小臟(Blattella)(例如,德国小臟(Blattella germanica));蜜蜂(Apis)(例如,多花蜜蜂(Apis multif lorum));柏木属(Cupressus)(例如,地中海柏木(Cupressus sempervirens)、绿干柏(Cupressus arizonica)和大果柏木(Cupressus macrocarpa));刺柏属(Juniperus)(例如,山雪松(Juniperus sabinoides)、北美圆柏(Juniperus virginiana)、欧洲刺柏(Juniperus communis)和美国雪松(Juniperus ashei));崖柏属

(Thuya)(例如,侧柏(Thuya orientalis));扁柏属(Chamaecyparis)(例如,日本扁柏(Chamaecyparis obtusa));大蠊(Periplaneta)(例如,美洲大蠊(Periplaneta americana));冰草属(Agropyron)(例如,匍匐冰草(Agropyron repens));黑麦属(Secale)(例如,黑麦(Secale cereale));小麦属(Triticum)(例如,普通小麦(Triticum aestivum));鸭茅属(Dactylis)(例如,鸭茅(Dactylis glomerata));羊茅属(Festuca)(例如,欧洲羊茅(Festuca elatior));早熟禾属(Poa)(例如,草地早熟禾(Poa pratensis)或加拿大早熟禾(Poa compressa));燕麦属(Avena)(例如,燕麦(Avena sativa));绒毛草属(Holcus)(例如,绒毛草(Holcus lanatus));黄花茅属(Anthoxanthum)(例如,黄花茅(Anthoxanthum odoratum));燕麦草属(Arrhenatherum)(例如,燕麦草(Arrhenatherum elatius));剪股颖属(Agrostis)(例如,小糠草(Agrostis alba));梯牧草属(Phleum)(例如,梯牧草(Phleum pratense));鹅草属(Phalaris)(例如,鹅草(Phalaris arundinacea));雀稗属(Paspalum)(例如,百喜草(Paspalum notatum));高粱属(Sorghum)(例如,石茅(Sorghum halepensis));和雀麦属(Bromus)(例如,无芒雀麦(Bromus inermis))。过敏原还可以包含肽和多肽,如用于过敏和哮喘的实验动物模型的肽和多肽,包含卵清蛋白(OVA)和曼氏血吸虫卵抗原。

[0271] “代谢紊乱”可以指由于新陈代谢(合成代谢和/或分解代谢)的变化而导致稳态的正常生理状态被破坏所引起的病症或疾病。代谢变化不能降解(分解代谢)待降解的物质(例如,苯丙氨酸),从而导致该物质和/或中间物质的水平升高,或者某些必需物质(例如,胰岛素)不能产生(合成代谢)。

[0272] “代谢综合征”可以指一组代谢危险因素的概念,这些因素聚集在一个个体中并导致患糖尿病和/或心血管疾病的高风险。代谢综合征的主要特征包含胰岛素抵抗、高血压(高血压)、胆固醇异常、血脂异常、甘油三酯异常、凝血风险增加,尤其是在腹部和超重或肥胖。代谢综合征也被称为X综合征、胰岛素抵抗综合征、肥胖综合征、异常代谢综合征和雷文氏综合征(Reaven's Syndrome)。代谢综合征的各种危险因素的相互关系如图所示。单个个体中存在三个或更多风险因素表明代谢综合征。美国心脏协会指出,代谢综合征是通过以下三个或更多因素的存在来诊断的:(1)腰围增加(男性,40英寸(102cm))或更大;女性,35英寸(88cm或更多),(2)甘油三酯升高(150mg/dL或以上),(3)高密度脂质或HDL降低(男性,小于40mg/dL;女性,小于50mg/dL);(4)血压升高(130/85mmHg或更高);和(5)空腹血糖升高(100mg/dL或更高)。

[0273] “代谢综合征相关代谢紊乱”可以指代谢综合征和肥胖症、胰岛素抵抗、2型糖尿病、动脉粥样硬化和心肌病。

[0274] “糖尿病”可以指一组代谢紊乱,其特征在于由于缺乏胰岛素分泌或作用或两者而导致的高血糖(葡萄糖)水平。

[0275] “2型糖尿病”是两种主要类型的糖尿病之一,至少在疾病的早期阶段,因为胰腺的β细胞产生胰岛素,但身体的细胞对胰岛素的作用有抵抗力。在疾病后期,β细胞可能会停止产生胰岛素。2型糖尿病也被称为胰岛素抵抗性糖尿病、非胰岛素依赖型糖尿病和成人型糖尿病。

[0276] “前驱糖尿病”可以指一种或多种早期糖尿病病状,包含葡萄糖利用受损、空腹血糖异常或受损、葡萄糖耐量受损、胰岛素敏感性受损和胰岛素抵抗。

[0277] “胰岛素抵抗”意指细胞对胰岛素(一种调节细胞吸收葡萄糖的激素)的作用产生抵抗力,或者产生的胰岛素量维持正常的葡萄糖水平。细胞在促进糖葡萄糖从血液到肌肉和其它组织的运输中对胰岛素的作用的反应能力可能降低(即,对胰岛素的敏感性丧失)。最终,胰腺产生比正常更多的胰岛素,而细胞仍然具有抵抗力。只要产生足够的胰岛素来克服这种阻力,血糖水平就会保持正常。当胰腺不能再维持时,血糖开始上升,从而导致糖尿病。胰岛素抵抗从正常(胰岛素敏感性)到胰岛素抵抗(IR)变化。

[0278] “A-β相关疾病”可以指以A-β蛋白聚集体为特征的那些疾病或病状。A-β相关疾病的淀粉样斑块特性的主要组分是β-淀粉样肽(A-β),其是一种长度为39-43个氨基酸(aa)的高度不溶的肽,具有采用β折叠结构、寡聚化和形成蛋白质聚集体的强烈倾向。A-β相关疾病的非限制性实例包含神经退行性疾病或病症、阿尔茨海默病、阿尔茨海默型痴呆、脑淀粉样血管病(CAA)、21三体(唐氏综合征)、成人唐氏综合征、遗传性脑出血伴淀粉样变性荷兰型(HCHWA-D)、路易体痴呆、额颞叶变性、青光眼、年龄相关性黄斑变性、肌萎缩侧索硬化、散发性包涵体肌炎和老年人受试者的焦虑症,

[0279] 本公开的化合物的来源:所提供的化合物不是从自然界中天然存在的组织中分离出来的,而是从组合人类细胞和化学合成的n-3-VLC-PUFA的人工实验的结果中分离出来的。使用HPLC和质谱法将我们合成的类延长素化合物的一般结构与在人视网膜色素上皮细胞中生物合成或在神经元细胞培养物中检测到的化合物相匹配。然而,目前尚不清楚所提供的具有明确定义的立体化学的单羟基化和二羟基化的类延长素的自然发生。此外,所提供的化合物不是从天然来源获得的,而是通过采用本领域已知的立体控制合成方法从市售材料开始制备的。所提供的制备方法被设计为适合n-3 VLC-PUFA独特的疏水特性,这与总碳数为22个或更少的化合物显著不同。

[0280] 本公开涵盖具有立体化学纯的结构并且经化学合成和修饰以具有允许它们发挥药理活性的额外结构特征和性质的化合物。所提供的化合物是羧酸酯或盐形式的经化学修饰的药学上可接受的衍生物,所述形式增强了它们的化学和生物稳定性并允许它们在涉及各种形式的药物递送的治疗应用中使用。

[0281] 本公开还提供了所提供化合物的药理学有效组合物,其增强了它们以能够到达靶细胞和组织的方式递送至受试者的能力。

[0282] 本文所述的数据还支持将所提供的n-3 VLC-PUFA和/或类延长素化合物用作通过消除细胞(如上皮细胞)产生促炎细胞因子和趋化因子来预防和治疗疾病(如与过敏或过敏反应相关的疾病)的治疗剂。

[0283] 上皮在身体的外部(皮肤)和内部腔体和腔内排列。上皮组织呈鳞片状,紧密排列并形成连续片状。它几乎没有细胞间隙。上皮细胞通过细胞外纤维基底膜与下层组织分离。口腔内壁、肺泡和肾小管均由上皮组织构成。血液和淋巴管的内层是一种特殊形式的上皮,被称为内皮。

[0284] 术语“上皮细胞”可以指排列在身体外部(皮肤)、黏膜以及内部腔体和腔内的细胞。大多数上皮细胞表现出细胞组分的顶端-基底极化。上皮细胞按形状和特化分类。

[0285] 表皮(即,皮肤)由角化的复层鳞状上皮组成。存在四种细胞类型:角质形成细胞(keratinocyte)产生角蛋白,其是一种使皮肤硬化和防水的蛋白质。皮肤表面的成熟角质形成细胞已经死亡并且几乎完全被角质填充。黑色素细胞(Melanocyte)产生黑色素,其实

一种保护细胞免受紫外线辐射的色素。来自黑色素细胞的黑色素被转移到角质形成细胞。朗格汉斯细胞(Langerhans cell)是在免疫反应过程中与白细胞相互作用的吞噬巨噬细胞。默克尔细胞(Merkel cell)出现在表皮深处的表皮-真皮边界处。它们形成默克尔圆盘，与神经末梢一起发挥感觉功能。

[0286] 有几层构成表皮。在手掌和脚底上发现的“厚皮”由五层组成，而“薄皮”仅由四层组成。这五层可以包含角质层(stratum corneum)含有许多层完全充满角蛋白的死亡无核角质形成细胞。最外层不断脱落。透明层(stratum lucidum)含有两到三层无核细胞。该层仅存在于“厚皮”中，如手掌和脚底。颗粒层(stratum granulosum)含有通过桥粒连接在一起的两到四层细胞。这些细胞含有透明角质颗粒，其有助于在表皮上层形成角蛋白。棘层(stratum spinosum)含有通过桥粒连接的八到十层细胞。这些细胞在有丝分裂中适度活跃。基底层(stratum basale)(生发层(stratum germinativum))含有单层柱状细胞，其通过有丝分裂活跃地分裂以产生迁移到上表皮层并最终迁移到皮肤表面的细胞。

[0287] 例如，鼻上皮细胞形成抵御环境因素的最外层保护层。它们清洁、加湿和温暖吸入的空气。它们产生粘液，粘液结合随后通过上皮细胞上的纤毛运输到咽部的颗粒。

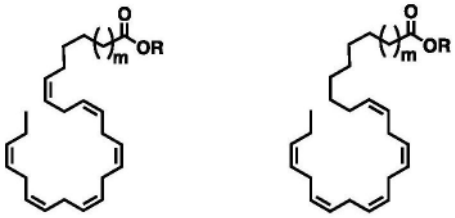
[0288] 例如，角膜上皮由上皮组织组成并覆盖角膜的前部。其充当保护角膜的屏障，阻止液体从眼泪中自由流动，并防止细菌进入上皮细胞和角膜基质。

[0289] 呼吸道上皮，或气道上皮，是一种纤毛柱状上皮，其被发现沿呼吸道的大部分排列成行作为呼吸道粘膜。呼吸上皮中的细胞有四种主要类型：a)纤毛细胞，b)杯状细胞，和c)棒状细胞，和d)基底细胞。呼吸道上皮具有润湿和保护气道的功能。其充当病原体和异物的物理屏障，以及在粘膜纤毛清除机制中清除病原体，从而通过粘液分泌和粘膜纤毛清除作用防止感染和组织损伤。

[0290] 化合物

[0291] 本文描述了化合物，所述化合物基于ω-3极长链多不饱和脂肪酸及其羟基化衍生物，所述羟基化衍生物被称为“类延长素”。

[0292] ω-3极长链多不饱和脂肪酸具有A或B或其衍生物的结构：

[0293] 

A B

[0294] 其中：A在碳链中含有总共23到42个碳原子，并且具有从位置n-3、n-6、n-9、n-12、n-15和n-18处开始的6个交替的顺式碳-碳双键，并且其中B在碳链中含有总共23到42个碳原子，并且具有从位置n-3、n-6、n-9、n-12和n-15处开始的5个交替的顺式碳-碳双键。R可以是氢、甲基、乙基、烷基或阳离子，如铵阳离子、亚胺阳离子或金属阳离子，包含但不限于钠、钾、镁、锌或钙阳离子，并且其中m是0到19的数字。

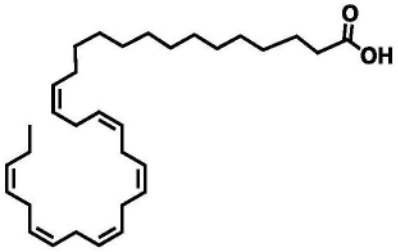
[0295] 本公开的ω-3极长链多不饱和脂肪酸可以具有末端羧基“-COOR”，其中“R”可以表示与羧基共价键合的基团，如烷基。在替代方案中，羧基可以进一步具有负电荷“-COO-”，并且R为阳离子，包含金属阳离子、铵阳离子等。

[0296] 在一些ω-3极长链多不饱和脂肪酸中，m是选自由0到15组成的组的数字。因此，m可以是选自1、3、5、7、9、11、13或15的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共24个、26个、28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它ω-3极长链多不饱和脂肪酸中，m是选自由0、2、4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共23个、25个、27个、19个、31个、33个、35个或37个碳原子。在一些ω-3极长链多不饱和脂肪酸中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在一些ω-3极长链多不饱和脂肪酸中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

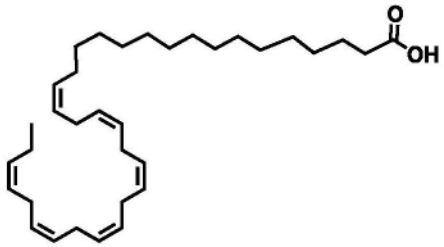
[0297] 在一些实施例中，ω-3极长链多不饱和脂肪酸是羧酸，即R是氢。在其它实施例中，ω-3极长链多不饱和脂肪酸是羧酸酯，其中R是甲基、乙基或烷基。当ω-3极长链多不饱和脂肪酸是羧酸酯时，R可以是但不限于甲基或乙基。在一些实施例中，ω-3极长链多不饱和脂肪酸是羧酸酯，其中R是甲基。

[0298] 在一些实施例中，ω-3超长链多不饱和脂肪酸可以是羧酸盐，其中R是铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子。在一些有利的实施例中，R是铵阳离子或亚胺阳离子。R可以是钠阳离子或钾阳离子。在一些实施例中，R是钠阳离子。

[0299] 本公开的ω-3超长链多不饱和脂肪酸或衍生物在其碳链中可以具有32个或34个碳和从n-3位置处开始的6个交替的顺式双键，并且具有式A1((14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-三十二碳-14,17,20,23,26,29-六烯酸)或式A2((16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-三十四碳-16,19,22,25,28,31-六烯酸)：

[0300] 

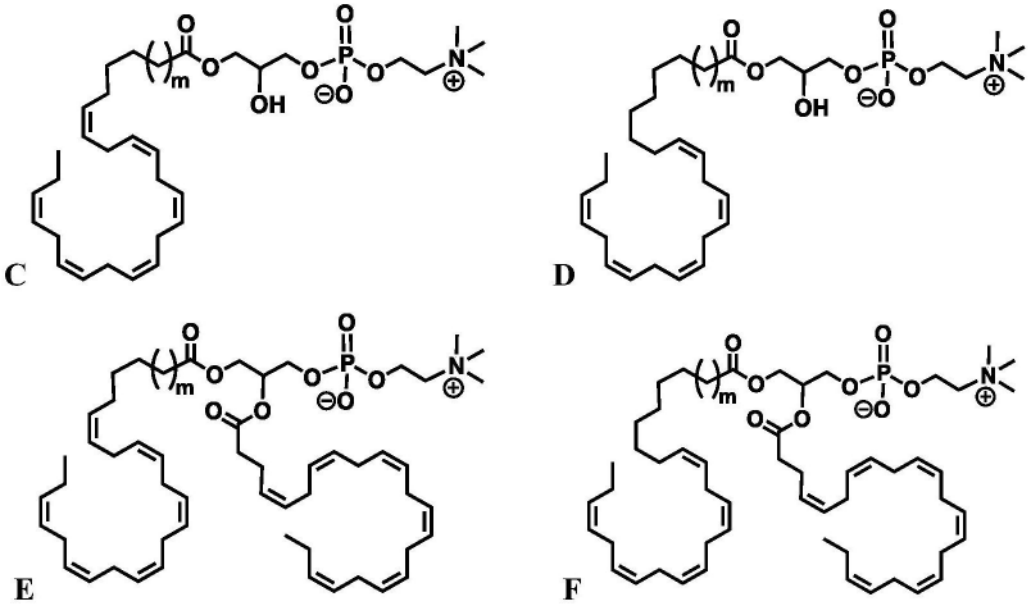
A1



A2

[0301] 在ω-3超长链多不饱和脂肪酸的一些实施例中，羧基衍生物是甘油衍生的磷脂的一部分，其可以容易地通过利用本领域已知的方法从结构A或B的n-3 VLC-PUFA的羧酸形式开始制备，并由结构C、D、E或F表示：

[0302]

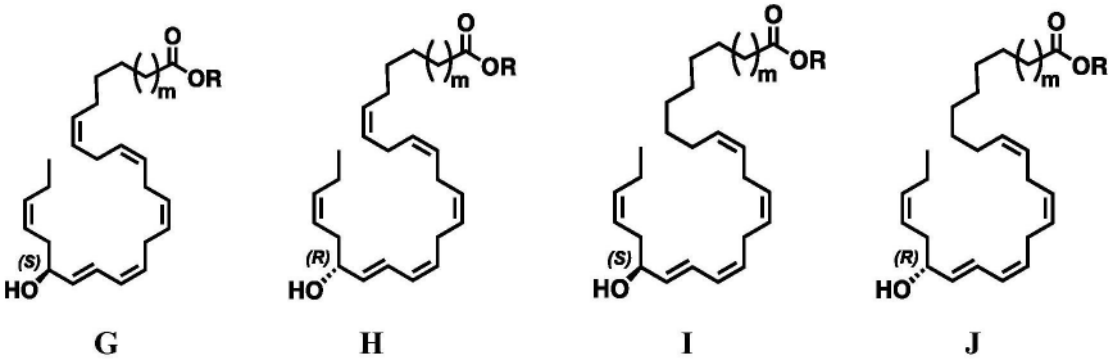


[0303] 其中C或E在碳链中含有总共23到42个碳原子，并且具有从位置n-3、n-6、n-9、n-12、n-15和n-18处开始的6个交替的顺式碳-碳双键，并且其中D或E在碳链中含有总共23到42个碳原子，并且具有从位置n-3、n-6、n-9、n-12和n-15处开始的5个交替的顺式碳-碳双键。在有利的实施例中，m是选自由0到15组成的组的数字。在其它实施例中，m是选自1、3、5、7、9、11、13或15的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共24个、26个、28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在另外的有利的实施例中，m是选自由0、2、4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共23个、25个、27个、19个、31个、33个、35个或37个碳原子。

[0304] 在一些实施例中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在一些实施例中，m是选自由5、7、9、11、13或15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共27个、29个、31个、33个、35个或37个碳原子。在有利的实施例中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

[0305] 本公开的单羟基化的类延长素可以具有G、H、I或J的结构：

[0306]



[0307] 其中化合物G和H在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-9、n-12、n-15和n-18处开始的5个顺式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的反式碳-碳双键；并且其中

化合物I和J在碳链中具有总共23到42个碳原子，并且具有从位置n-3、n-9、n-12和n-15处开始的4个顺式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的反式碳-碳双键；其中R是氢、甲基、乙基、烷基或选自由以下组成的组的阳离子：铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子，并且其中m是选自由0到19组成的组的数字；其中化合物G和H可以作为等摩尔混合物存在；其中化合物I和J可以作为等摩尔混合物存在；其中，所提供的化合物G和H主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性；并且其中，化合物G和H主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性。

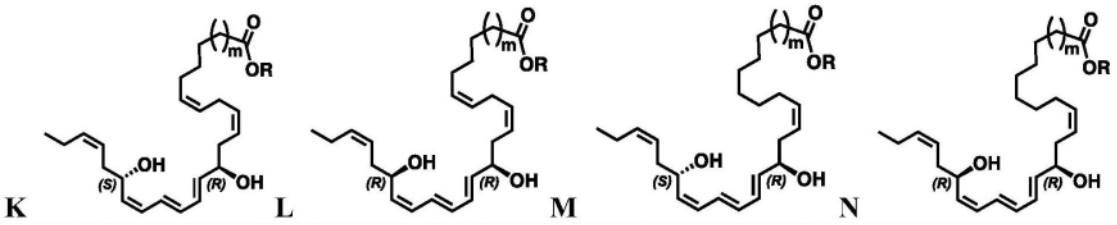
[0308] 如本文和本公开的其它结构中所使用的，本公开的化合物被显示为具有末端羧基“-COOR”，“R”可以表示与羧基共价键合的基团，如烷基。在替代方案中，羧基可以进一步具有负电荷“-COO-”，并且R为阳离子，包含金属阳离子、铵阳离子等。

[0309] 在本公开的单羟基化的类延长素的一些实施例中，m是选自由0到15组成的组的数字。在其它有利的实施例中，m是选自1、3、5、7、9、11、13或15的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共24个、26个、28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由0、2、4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共23个、25个、27个、19个、31个、33个、35个或37个碳原子。

[0310] 在一些实施例中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在一些实施例中，m是选自由5、7、9、11、13或15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共27个、29个、31个、33个、35个或37个碳原子。在有利的实施例中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

[0311] 在一些实施例中，本公开的单羟基化的类延长素是羧酸，即R是氢。在其它实施例中，化合物是羧酸酯，其中R是甲基、乙基或烷基。在有利的实施例中，化合物是羧酸酯，其中R是甲基或乙基。在有利的实施例中，化合物是羧酸酯，其中R是甲基。在其它有利的实施例中，化合物是羧酸盐，其中R是铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子。在一些有利的实施例中，R是铵阳离子或亚胺阳离子。在其它有利的实施例中，R是钠阳离子或钾阳离子。在有利的实施例中，R是钠阳离子。

[0312] 本公开的二羟基化的类延长素可以具有结构K、L、M或N

[0313] 

[0314] 其中化合物K和L在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-7、n-15和n-18处开始的4个顺式碳-碳双键以及从位置n-9、n-11处开始的2个反式碳-碳键；并且其中化合物M和N在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-7、n-12和n-15处开始的3个顺式碳-碳双键以及从位置n-9、n-11处开始的2个反式碳-碳键，其中R是氢、甲基、乙基、烷基或选自由以下组成的组的阳离子：铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳

离子组成的组的金属阳离子，并且其中m是选自由0到19组成的组的数字；其中化合物K和L可以作为等摩尔混合物存在；其中化合物M和N可以作为等摩尔混合物存在，其中化合物K和L主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性；并且其中，所提供的化合物M和N主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性。

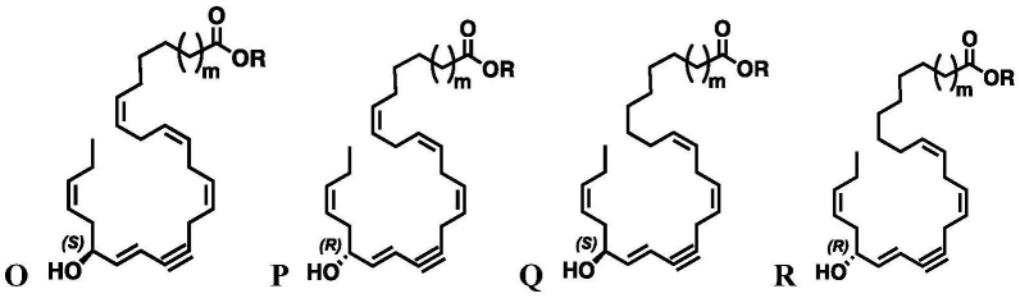
[0315] 如本文和本公开的其它结构中所使用的，本公开的化合物被显示为具有末端羧基“-COOR”，“R”可以表示与羧基共价键合的基团，如烷基。在替代方案中，羧基可以进一步具有负电荷“-COO-”，并且R为阳离子，包含金属阳离子、铵阳离子等。

[0316] 在本公开的二羟基化的类延长素的一些实施例中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在有用的实施例中，m是选自由5、7、9、11、13或15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共27个、29个、31个、33个、35个或37个碳原子。在有用的实施例中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

[0317] 本公开的一些二羟基化的类延长素是羧酸，即R是氢。在其它实施例中，本公开的二羟基化的类延长素是羧酸酯，其中R是甲基、乙基或烷基。在有用的实施例中，化合物是羧酸酯，其中R是甲基或乙基。在有用的实施例中，化合物是羧酸酯，其中R是甲基。

[0318] 在其它实施例中，本公开的二羟基化的类延长素是羧酸盐，其中R是铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子。在一些有用的实施例中，R是铵阳离子或亚胺阳离子。在其它有用的实施例中，R是钠阳离子或钾阳离子。在有用的实施例中，R是钠阳离子。

[0319] 本公开的炔基单羟基化的类延长素可以具有O、P、Q或R的结构：

[0320] 

[0321] 其中化合物O和P在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-12、n-15和n-18处开始的4个顺式碳-碳双键、从位置n-7处开始的反式碳-碳键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键；并且其中化合物I和J在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-12和n-15处开始的3个顺式碳-碳双键，从位置n-7处开始的反式碳-碳键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键；其中R是氢、甲基、乙基、烷基或选自由以下组成的组的阳离子：铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子，并且其中m是选自由0到19组成的组的数字；其中化合物O和P可以作为等摩尔混合物存在；其中化合物Q和R可以作为等摩尔混合物存在；其中，所提供的化合物O和P主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性；并且其中，所提供的化合物O和P主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性。

[0322] 如本文和本发明的其它结构中所使用的，本公开的炔基单羟基化的类延长素被显示为具有末端羧基“-COOR”，“R”可以表示与羧基共价键合的基团，如烷基。在替代方案中，羧基可以进一步具有负电荷“-COO-”，并且R为阳离子，包含金属阳离子、铵阳离子等。

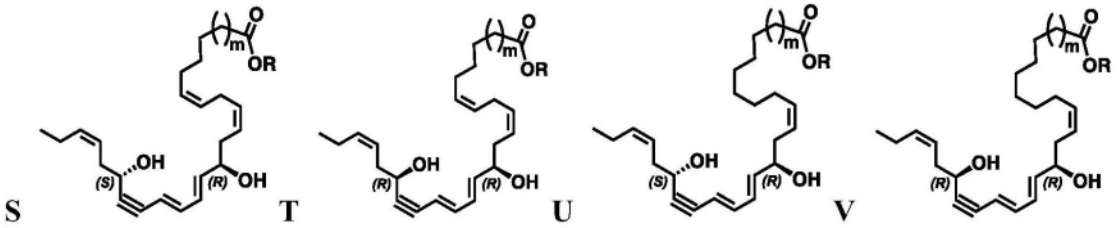
[0323] 在一些实施例中，m是选自由0到15组成的组的数字。在其它实施例中，m是选自1、3、5、7、9、11、13或15的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共24个、26个、28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。

[0324] 在另外的实施例中，m是选自由0、2、4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共23个、25个、27个、19个、31个、33个、35个或37个碳原子。在一些实施例中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在实施例中，m是选自由5、7、9、11、13或15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共27个、29个、31个、33个、35个或37个碳原子。在一些实施例中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

[0325] 在一些实施例中，本公开的炔基单羟基化的类延长素是羧酸，即R是氢。在其它实施例中，本公开的炔基单羟基化的类延长素是羧酸酯，其中R是甲基、乙基或烷基。在实施例中，本公开的炔基单羟基化的类延长素是羧酸酯，其中R是甲基或乙基。

[0326] 在一些实施例中，R是甲基。在其它实施例中，本公开的炔基单羟基化的类延长素可以是羧酸盐，其中R是铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子。在一些实施例中，R是铵阳离子或亚胺阳离子。在其它实施例中，R是钠阳离子或钾阳离子。在实施例中，R是钠阳离子。

[0327] 炔基二羟基化的类延长素可以具有S、T、U或V的结构：

[0328] 

[0329] 其中化合物S和T在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3、n-12、n-15和n-18处开始的3个顺式碳-碳双键、从位置n-9和n-11处开始的2个反式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的碳-碳三键；并且其中化合物U和V在碳链中具有总共23到42个碳原子，具有从位置n-3和n-15处开始的2个顺式碳-碳双键、从位置n-9和n-11处开始的2个反式碳-碳双键以及从位置n-7处开始的碳-碳三键；其中R是氢、甲基、乙基、烷基或选自由以下组成的组的阳离子：铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子，并且其中m是选自由0到19组成的组的数字；其中化合物S和T可以作为等摩尔混合物存在；其中化合物U和V可以作为等摩尔混合物存在。

[0330] 在一些实施例中，所提供的化合物S和T主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性；并且其中，所提供的化合物U和V主要是一种对映异构体，其在带有羟基的碳上具有确定的(S)或(R)手性。

[0331] 如本文和本发明的其它结构中所使用的，本发明的化合物被显示为具有末端羧基“-COOR”，“R”可以表示与羧基共价键合的基团，如烷基。在替代方案中，羧基可以进一步具有负电荷“-COO-”，并且R为阳离子，包含金属阳离子、铵阳离子等。

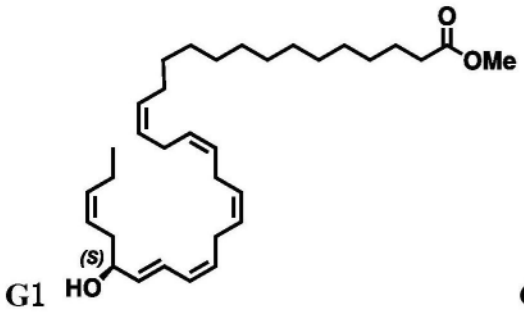
[0332] 在一些实施例中，m是选自由5到15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个或38个碳原子。在实施例中，m是选自由5、7、9、11、13或15组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共28个、30个、32个、34个、36个或38个碳原子。在其它实施例中，m是选自由4、6、8、10、12或14组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共27个、29个、31个、33个、35个或37个碳原子。在实施例中，m是选自由9到11组成的组的数字，其中脂肪酸组分在其碳链中含有总共32个或34个碳原子。

[0333] 在一些实施例中，所提供的化合物是羧酸，即R是氢。

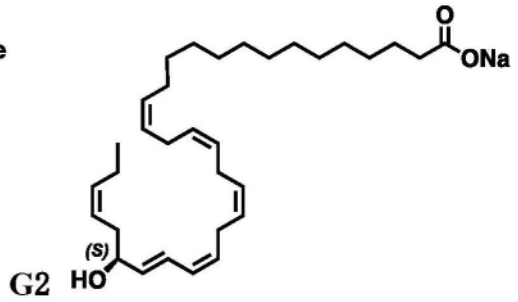
[0334] 在其它实施例中，所提供的化合物是羧酸酯，其中R是甲基、乙基或烷基。在实施例中，所提供的化合物是羧酸酯，其中R是甲基或乙基。在实施例中，所提供的化合物是羧酸酯，其中R是甲基。在其它实施例中，所提供的化合物是羧酸盐，其中R是铵阳离子、亚胺阳离子或选自由钠、钾、镁、锌或钙阳离子组成的组的金属阳离子。在一些实施例中，R是铵阳离子或亚胺阳离子。在其它实施例中，R是钠阳离子或钾阳离子。在实施例中，R是钠阳离子。

[0335] 在实施例中，本公开提供了式G1的单羟基化32-碳甲基酯，其具有名称：(S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,23,25,29-六烯酸甲酯；式G2的单羟基化32-碳钠盐，其具有名称：(S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,23,25,29-六烯酸钠；式G3的单羟基化34-碳甲基酯，其具有名称：(S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,25,27,31-六烯酸甲酯；或式G4的单羟基化34-碳钠盐，其具有名称(S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,25,27,31-六烯酸钠：

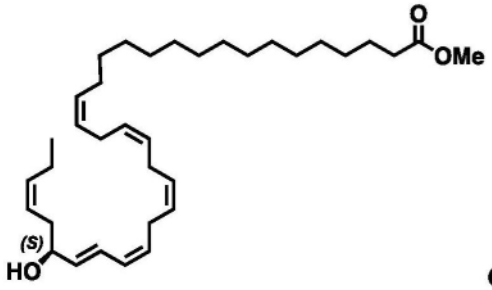
[0336]



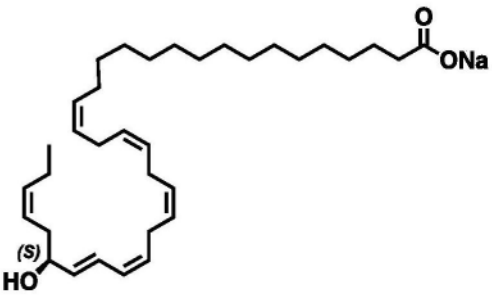
G1



G2



G3

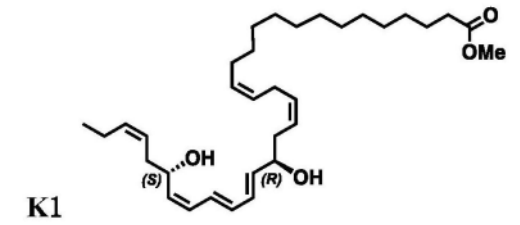


G4

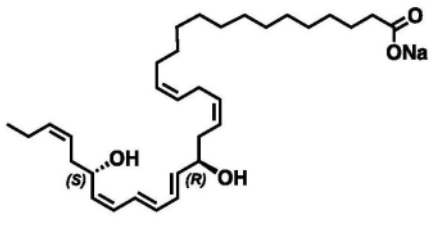
[0337] 在其它实施例中，本公开提供了式K1的二羟基化32-碳甲基酯，其具有名称：(14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,25,29-六烯酸甲

酯;式K2的二羟基化32-碳钠盐,其具有名称:(14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,25,29-六烯酸钠;或式K3的二羟基化34-碳甲基酯,其具有名称:(16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,27,31-六烯酸甲酯;或式K4的二羟基化34-碳钠盐,其具有名称:(16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,27,31-六烯酸钠:

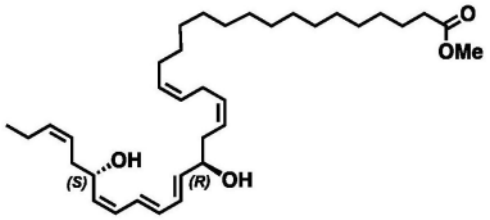
[0338]



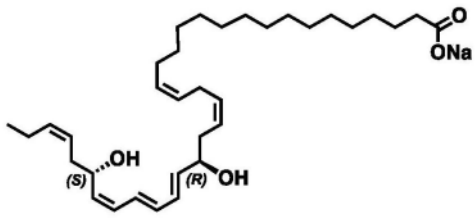
K1



K2



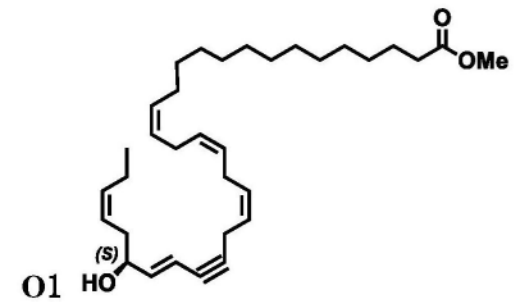
K3



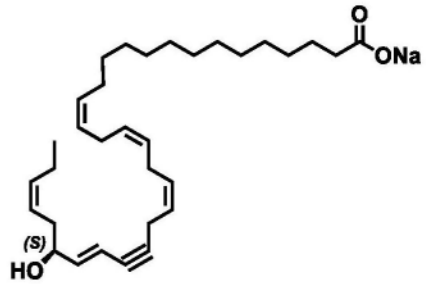
K4

[0339] 在其它实施例中,本发明提供了式O1的炔基单羟基化32-碳甲基酯,其具有名称:(S,14Z,17Z,20Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,25,29-五烯-23-炔酸甲酯;式O2的炔基单羟基化32-碳钠盐,其具有名称:(S,17Z,20Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-17,20,25,29-四烯-23-炔酸钠;式O3的炔基单羟基化34-碳甲基酯,其具有名称:(S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,27,31-五烯-25-炔酸甲酯;式O4的炔基单羟基化34-碳钠盐,其具有名称:(S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,27,31-五烯-25-炔酸钠:

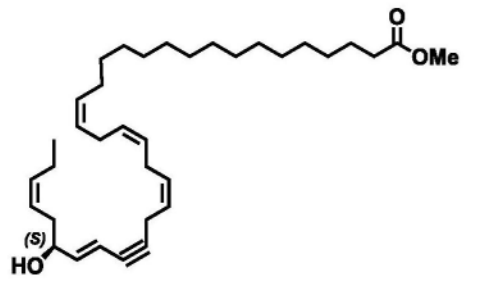
[0340]



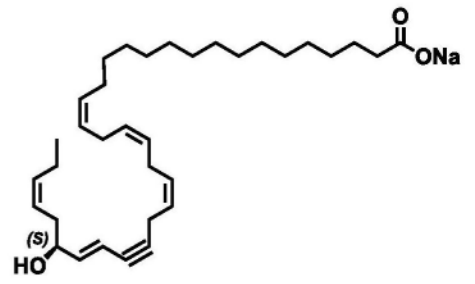
O1



O2



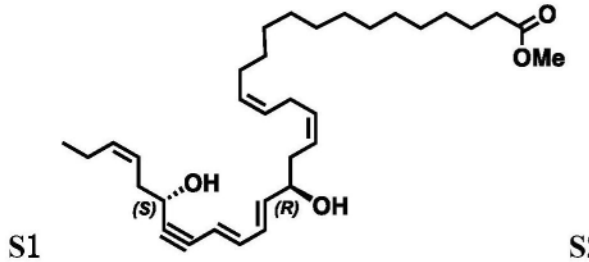
O3



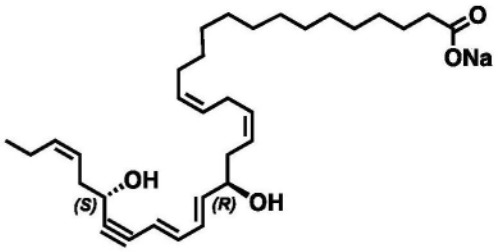
O4

[0341] 在其它有利的实施例中,本发明提供了式S1的炔基二羟基化32-碳甲基酯,其具有名称:(14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,29-五烯-25-炔酸甲酯;式S2的炔基二羟基化32-碳钠盐,其具有名称:(14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,29-五烯-25-炔酸钠;或式S3的炔基二羟基化

34-碳甲基酯，其具有名称：(16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,31-五烯-27-炔酸甲酯；或式S4的炔基二羟基化34-碳钠盐，其具有名称：(16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,31-五烯-27-炔酸钠。

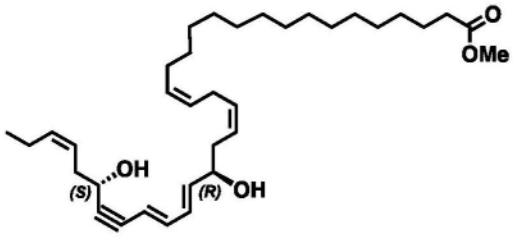


S1

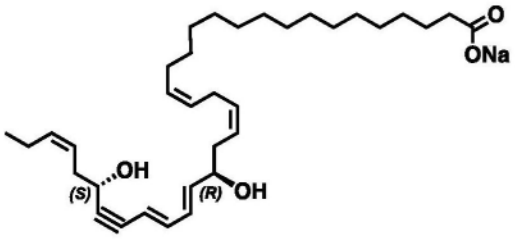


S2

[0342]



S3



S4

[0343] 所提供的化合物的制备和制造方法：本公开的所提供的化合物可以通过采用本领域已知的方法从市售材料开始容易地制备，如图6-10所示的方案1-5中所概括的。

[0344] 方案1(图6)示出了O型化合物的立体控制全合成的详细方法，其中n是9，并且脂肪酸链含有总共32个碳原子，并且R基团是甲基或钠阳离子。例如，方案1示出了从十五烷-14-炔酸甲酯(S1)开始的化合物ELV-N-32-Me和ELV-N-32-Na的合成。通过从十五烷-16-炔酸甲酯(T1)开始，该过程提供化合物ELV-N-34-Me和ELV-N-34-Na。ELV-N-32-Me和ELV-N-32-Na的炔基前体，即13a、13b、15a和15b，也在本公开中所提供的化合物X和Z中。方案1通过采用此类反应的典型反应条件，提供了用于制备所提供的化合物的试剂和条件。

[0345] 方案2(图7)描述了从方案1中也使用的中间体2、5和7开始，二羟基化的类延长素K和L及其炔烃前体S和T的全合成。可根据文献程序将受保护的(R)环氧化物4转化为中间体15，并将7和15偶联，然后转化为中间体17(《四面体通讯(Tetrahedron Lett.)》2012;53(14):1695-8)。

[0346] 中间体2或17之间或中间体5或17之间的催化交叉偶联，以及之后的脱保护，导致形成炔基化合物S和T，然后选择性地还原所述炔基化合物以形成二羟基化的类延长素K和L。水解和酸化得到相应的羧酸，加入等量的相应碱可将其转化为羧酸盐。在其碳链中具有至少23个碳和至多42个碳的K、L、S和T型的二羟基化类延长素可以类似地通过改变炔烃起始材料7中的碳数来制备。

[0347] 方案3(图8)描述了通过利用方案1中也使用的相同的炔基中间体2和5，具有五个M和N型不饱和双键的二羟基化的类延长素以及它们的炔烃前体U和V的全合成。(《四面体通

讯》2012;53(14):1695-8)。

[0348] 中间体22的合成从羧酸18开始,使用已知的方法将所述羧酸转化为原酸酯19(《四面体通讯》1983,24(50),5571-4)。锂化炔烃与环氧化物1的反应得到中间体21,其被转化为碘化物中间体22,类似于将16转化为17。中间体2或5与22之间的催化交叉偶联,以及之后的脱保护,导致形成炔基二羟基类延长素U和V,然后将其选择性地还原以形成二羟基化的类延长素M和N。

[0349] 水解和酸化得到相应的羧酸,通过加入等量的相应碱,可以将其转化为羧酸盐。在其碳链中具有至少23个碳和至多42个碳的M、N、U和V型的二羟基化类延长素可以类似地通过改变炔烃羧酸18中的碳数来制备。

[0350] 方案4(图9)示出了从炔烃甲酯23、中间体15和炔烃中间体2开始的32-碳二羟基化的类延长素的立体控制全合成。例如,该方案示出了32-碳炔基类延长素化合物ELV-N-32-Me-乙炔的全合成,及其转化为类延长素甲酯ELV-N-32-Me、类延长素羧酸ELV-N-32-H和类延长素钠盐ELV-N-32-Na。

[0351] 方案5(图10)示出了从炔烃甲酯30开始并通过采用与方案4中相同的反应顺序的34-碳二羟基化的类延长素的立体控制全合成。

[0352] 例如,该方案示出了34-碳炔基类延长素化合物ELV-N-34-Me-乙炔的全合成,及其转化为类延长素甲酯ELV-N-34-Me、类延长素羧酸ELV-N-34-H和类延长素钠盐ELV-N-34-Na。

[0353] 方案1-5(图6-10)中提出的化学方法也可适用于额外的单羟基化和二羟基化的类延长素的全合成,所述类延长素在它们的碳链中具有至少23个碳和至多42个碳。

[0354] 用于治疗疾病的药物组合物:在其它实施例中,本公开提供了药物组合物的调配物,所述药物组合物在药学上可接受的载体中含有治疗有效量的一种或多种本文提供的化合物或其盐。

[0355] 所提供的组合物含有一种或多种本文提供的化合物或其盐,以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和/或佐剂。化合物可以配制成合适的药物制剂,如溶液、混悬剂、片剂、分散片、丸剂、胶囊、散剂、缓释调配物或酏剂(用于口服、口腔、鼻内、阴道、直肠、眼部施用,从玻璃体内植入的储库或纳米装置或树枝状大分子中持续释放,嵌入眼表的胶原蛋白或其它材料中,或嵌入用于肠胃外施用的无菌溶液或悬浮液中)、皮肤贴剂以及透皮贴剂制剂和干粉吸入器。所提供的调配物可以是滴剂的形式,如滴眼剂,并且药物调配物可以进一步含有抗氧化剂和/或用于治疗眼病的已知药剂。使用本领域熟知的技术和程序将本文所述的化合物配制成药物组合物(参见例如,《安塞尔药物剂型简介(Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms)》,第四版1985,126)。

[0356] 本公开的实施例提供了药物组合物,所述药物组合物含有各种形式的所提供化合物,作为游离羧酸或其药学上可接受的盐,或作为它们相应的酯或它们的磷脂衍生物。在其它有用的实施例中,本公开提供了药物组合物,所述药物组合物含有一种或多种在位于极长链多不饱和脂肪酸的n-3到n-18之间的位置处含有一个或两个羟基的类延长素,作为游离羧酸或其药学上可接受的盐,或作为它们相应的酯。

[0357] 在另外的实施例中,本公开提供了一种用于减轻疾病的症状、治疗或预防所述疾病的药物组合物。例如,所述疾病是过敏性炎性疾病、与细胞衰老和/或铁死亡相关的疾病,

或代谢紊乱。

[0358] 在所提供的组合物中，将有效浓度的一种或多种化合物或药学上可接受的衍生物与合适的药用载体或媒剂混合。如本文所述，化合物可以在配制之前被衍生为相应的盐、酯、烯醇醚或酯、酸、碱、溶剂化物、水合物或前药。组合物中化合物的浓度对于在施用时递送治疗、预防或改善疾病、病症或病状的一种或多种症状的量是有效的。

[0359] 如本文所述，组合物可以通过采用本领域已知的方法来制备。所述组合物可以是药物调配物的组分。药物调配物可以进一步含有已知的用于治疗炎症或退行性疾病(包含神经退行性疾病)的药剂。所提供的组合物可以作为脂肪酸的前药前体，并且可以在定位到疾病部位时被转化为游离脂肪酸。

[0360] 本公开还提供用于预防、恢复或用于治疗疾病或病状的包装组合物或药物组合物。本公开提供的其它包装组合物或药物组合物可以进一步包含标记，所述标记包含以下至少一项：使用该组合物治疗疾病或病状的说明。所述试剂盒可以进一步包含本领域已知的用于将本文所列组分的各种组合施用于宿主的适当缓冲剂和试剂。

[0361] 药物调配物：本公开的实施例可以包含如本文所鉴定的组合物或药物组合物并且可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体、天然存在的或合成的抗氧化剂和/或佐剂一起配制。此外，本公开的实施例可以包含与一种或多种药学上可接受的辅助物质一起配制的组合物或药物组合物。例如，所述组合物或药物组合物可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和/或佐剂一起配制以提供本公开的组合物的实施例。

[0362] 多种药学上可接受的赋形剂在本领域中是已知的。药学上可接受的赋形剂已在各种出版物中充分描述，所述出版物包含例如：A.Gennaro(2000)“雷明顿：药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)”第20版，利平科特威廉斯和威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams,&Wilkins)；《药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》(1999)H.C.编者：Ansel等人，第7版，利平科特威廉斯和威尔金斯出版公司；和《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2000)A.H.编者：Kibbe等人，第3版，《美国药物协会(Amer.Pharmaceutical Assoc.)》。药学上可接受的赋形剂，如媒剂、佐剂、载体或稀释剂，是公众可获得的。此外，药学上可接受的辅助物质，如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等，对于公众来说是容易获得的。

[0363] 在本公开的实施例中，可以使用能够产生期望效果的任何方式将组合物或药物组合物施用于受试者。因此，可以将组合物或药物组合物并入用于治疗性施用的多种调配物中。例如，组合物或药物组合物可以通过与适当的药学上可接受的载体或稀释剂组合而被配制成药物组合物，并且可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂，如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、霜剂和气雾剂。

[0364] 用于组合物或药物组合物的合适的赋形剂媒剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等，以及它们的组合。此外，如果需要，媒剂可以含有少量的辅助物质，如润湿剂或乳化剂、抗氧化剂或pH缓冲剂。制备此类剂型的方法对于本领域技术人员来说是已知的，或者在考虑本公开时将是显而易见的。参见例如，《雷明顿氏药剂学(Remington’s Pharmaceutical Science)》，马克出版公司(Mack Publishing Company)，宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton,Pennsylvania)，第17版，1985。待施用的组合物或调配物在任何情况下都将

含有足以在接受治疗的受试者中达到期望状态的组合物或药物组合物的量。

[0365] 本公开的组合物可以包含那些包括缓释或控释基质的组合物。此外，本公开的实施例可以与使用缓释调配物的其它治疗结合使用。如本文所使用的，缓释基质是由可通过酶或酸基水解或通过溶解降解的材料(例如聚合物)制成的基质。一旦插入体内，基质就会受到酶和体液的作用。缓释基质理想地选自生物相容性材料，如脂质体、聚丙交酯(聚乳酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酸酐、聚(原)酯、多肽、透明质酸、胶原蛋白、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅氧烷。示例性的可生物降解基质可以包含聚丙交酯基质、聚乙交酯基质和聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)基质。在另一个实施例中，本公开的药物组合物(以及组合组合物)可以在控释系统中递送。例如，组合物或药物组合物可以使用静脉输注、可植入渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它施用方式进行施用。在一个实施例中，可以使用泵(Sefton(1987))。《CRC生物医学工程评论综述(CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.)》14:201;Buchwald等人(1980).《外科手术(Surgery)》88:507;Saudek等人(1989).《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.)》321:574)。在另一个实施例中，使用聚合材料。在又一个实施例中，控释系统被放置在治疗靶标附近，因此仅需要全身剂量的一部分。在又一个实施例中，控释系统被放置在治疗靶标附近，因此仅需要系统的一部分。其它控释系统在以下文献的评论中讨论:Langer(1990).《科学(Science)》249:1527-1533。

[0366] 在另一个实施例中，本公开的组合物(以及单独或一起的组合组合物)可以包含通过将本文所述的组合物或药物组合物浸渍到吸收性材料(如缝线、绷带和纱布)中或涂覆在固相材料(如外科用缝合钉、拉链和导管，以递送组合物)的表面上而形成的那些组合物。鉴于本公开，这种类型的其它递送系统对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0367] 在另一个实施例中，本公开的组合物或药物组合物(以及单独或一起的组合组合物)可以是延迟释放调配物的一部分。延迟释放调配物可以按照标准参考文献中的描述进行制备，如“药物剂型片剂(Pharmaceutical dose form tablet)”，编者:Liberman等人(纽约的马塞尔德克尔公司(New York,Marcel Dekker,Inc.)，1989)；“雷明顿-药学的科学与实践”，第20版，利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司，马里兰州巴尔的摩(Baltimore,MD)，2000；以及“药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems)”，第6版，Ansel等人(宾夕法尼亚州Media市:威廉姆斯和威尔金斯出版社(Williams and Wilkins)，1995)。这些参考资料提供了有关用于制备片剂和胶囊剂以及片剂、胶囊剂和颗粒剂的缓释剂型的赋形剂、材料、设备和工艺的信息。这些参考资料提供了有关用于制备片剂和胶囊剂以及片剂、胶囊剂和颗粒剂的缓释剂型的载体、材料、设备和工艺的信息。

[0368] 组合物或药物组合物的实施例可以以一个或多个剂量施用于受试者。技术人员将理解，剂量水平可以根据所施用的具体组合物或药物组合物、症状的严重程度和受试者对副作用的敏感性而变化。本领域技术人员可通过多种方式容易地确定给定化合物的有用剂量。

[0369] 在一个实施例中，施用多剂量的组合物或药物组合物。组合物或药物组合物的施用频率可根据多种因素中的任何一种(例如，症状的严重程度等)而变化。例如，在一个实施

例中，组合物或药物组合物可以每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一天(qod)、每天(qd)、每天两次(qid)、每天三次(tid)或每天四次进行施用。如本文所讨论的，在一个实施例中，组合物或药物组合物在1到10天的时间段内每天施用1至4次。

[0370] 组合物或药物组合物类似物的施用持续时间，例如，施用组合物或药物组合物的时间段，可以根据多种因素中的任何一种(例如，患者反应等)而变化。例如，组合或单独的组合物或药物组合物可以在约一天到一周、约一天到两周的时间段内施用。

[0371] 可以有效治疗病状或疾病的本公开的组合物和药物组合物的量可以通过标准临床技术确定。此外，可以使用体外或体内测定来帮助确定最佳剂量范围。使用的精确剂量也可以取决于施用途径，并且应当根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。

[0372] 施用途径：本公开的实施例提供了用于使用适用于药物递送的任何可用方法和途径(包含体内和离体方法，以及全身和局部施用途径)将活性剂施用于受试者(例如，人类)的方法和组合物。施用途径可以包含鼻内、肌肉内、气管内、皮下、皮内、玻璃体内、局部施用、静脉内、直肠、鼻腔、口服和其它肠内和肠胃外施用途径。如果需要，可以组合施用途径，或根据药剂和/或期望效果进行调整。活性剂可以以单剂量或多剂量施用。

[0373] 在实施例中，本发明的方面可以通过喷雾器施用。术语“雾化器”可以指本领域已知的从液体产生小液滴或气溶胶的任何装置。例如，组合物可以以雾的形式施用，吸入肺部。

[0374] n-3 VLC-PUFA及其生物衍生物在细胞中形成，并且不是人类饮食的组分。本文提供的化合物的有利施用途径可以包含局部、口服、鼻内和肠胃外给药。例如，所提供的调配物可以以滴剂的形式(如滴眼剂)或用于治疗眼部过敏性炎性疾病的任何其它常规方法进行递送。例如，所提供的调配物可以以鼻内喷雾剂的形式或用于治疗鼻道或肺的过敏性炎性疾病的任何其它常规方法进行递送。例如，所提供的调配物可以以霜剂或凝胶的形式或用于治疗皮肤过敏性炎性疾病的任何其它常规方法进行递送。

[0375] 除吸入施用外的肠胃外施用途径可以包含但不限于局部、透皮、皮下、肌肉内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径，即，除通过消化道外的任何施用途径。可以进行肠胃外施用以影响组合物的全身或局部递送。在需要全身递送的情况下，施用涉及药物制剂的侵入性或全身吸收的局部或粘膜施用。在一个实施例中，组合物或药物组合物也可以通过肠内施用递送至受试者。肠内施用途径可以包含但不限于口服和直肠(例如，使用栓剂)递送。

[0376] 通过皮肤或粘膜施用组合物或药物组合物的方法可以包含但不限于局部施用合适的药物制剂、透皮传输、注射和表皮施用。对于经皮传输，吸收促进剂或离子电渗疗法是合适的方法。离子电渗传输可以使用市售的“贴片”来完成，这些贴片通过未破损的皮肤通过电脉冲连续递送他们的产品，持续数天或更长的时段。

[0377] 本公开提供的化合物和组合物能够在某些经历氧化应激或其它稳态破坏的细胞中恢复稳态并诱导存活信号传导。本公开还提供了所提供的化合物和组合物的使用方法，所述化合物和组合物含有极长链多不饱和脂肪酸的羟基化衍生物，作为游离羧酸或其药学上可接受的盐，或作为它们相应的酯或其它前药衍生物。所提供的化合物可以通过采用本领域已知的方法从市售材料开始容易地制备。

[0378] 所提供化合物的生物活性，如类延长素衍生物ELV-N-32-Me、ELV-N-32-Na、ELV-N-34-Me和ELV-N-34-Na所例示的，归因于它们通过进入细胞或/和作用于膜结合受体来到达目标人体细胞并发挥其生物学作用的能力。可替代地，所提供的化合物可以通过细胞内受体(例如核膜)起作用，因此它们可以通过影响关键信号传导事件来发挥作用。含有所提供的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物的施用恢复了稳态平衡并促进了某些对维持正常功能至关重要的细胞的存活。所提供的化合物、组合物和方法可用于炎症、退行性和神经退行性疾病的预防和治疗。本公开通过模仿内在细胞/器官反应的特定生物学来针对这些病状的起始和早期进展的关键步骤，以获得效力、选择性、无副作用和持续的生物活性。

[0379] 因此，本公开的一个方面涵盖组合物的实施例，所述组合物包括至少一种在其碳链中具有至少23个碳原子的极长链多不饱和脂肪酸。

[0380] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括药学上可接受的载体并且被配制用于递送一定量的至少一种极长链多不饱和脂肪酸，所述量有效减少受体受试者组织的病理状况或受体受试者组织的病理状况的发作。

[0381] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以是所述受体受试者组织的过敏性炎性疾病或过敏性炎性病状。

[0382] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以与细胞衰老、铁死亡或两者有关。

[0383] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以与代谢紊乱有关。

[0384] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长链多不饱和脂肪酸组织局部递送至受体受试者的皮肤或眼睛。

[0385] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长链多不饱和脂肪酸组织鼻内递送至受体受试者的鼻道和/或肺。

[0386] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括至少一种营养组分，并且例如，所述组合物可以被配制用于将至少一种极长链多不饱和脂肪酸口服或肠胃外递送至受体受试者。

[0387] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有约26到约42个碳原子。

[0388] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有32或34个碳原子。

[0389] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有五个或六个具有顺式几何形状的双键。

[0390] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述极长链多不饱和脂肪酸是14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-三十二碳-14,17,20,23,26,29-六烯酸或(16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-三十四碳-16,19,22,25,28,31-六烯酸。

[0391] 本公开的另一方面涵盖组合物的实施例，所述组合物包括至少一种在其碳链中具有至少23个碳原子的类延长素。

[0392] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括药学上可接受的载体并且可以被配制用于递送一定量的至少一种类延长素，所述量有效减少受体受试者组

织的病理状况。

[0393] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述病理状况可以是过敏性炎性疾病。

[0394] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种类延长素可以选自由以下组成的组：单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素、炔基单羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素，或其任何组合。

[0395] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种类延长素可以是类延长素的组合，其中所述组合选自由以下组成的组：单羟基化的类延长素和二羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；二羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素；单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基二羟基化的类延长素；以及单羟基化的类延长素、二羟基化的类延长素和炔基单羟基化的类延长素炔基二羟基化的类延长素，其中每种类延长素独立地是外消旋混合物、分离的对映异构体或对映异构体的组合，在所述组合中，一种对映异构体的量大于另一种对映异构体的量；并且其中每种二羟基化的类延长素独立地是非对映异构体混合物、分离的非对映异构体或非对映异构体的组合，在所述组合中，一种非对映异构体的量大于另一种非对映异构体的量。

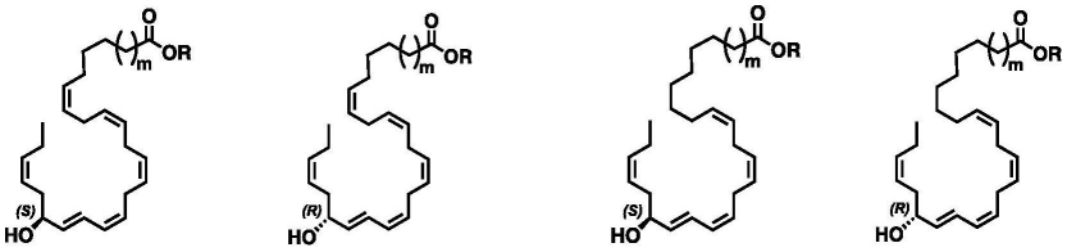
[0396] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以进一步包括至少一种在其碳链中具有至少23个碳原子的极长链多不饱和脂肪酸。

[0397] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有约26到约42个碳原子。

[0398] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种极长链多不饱和脂肪酸在其碳链中可以具有五个或六个具有顺式几何形状的双键。

[0399] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述至少一种极长链多不饱和脂肪酸可以是14Z,17Z,20Z,23Z,26Z,29Z)-三十二碳-14,17,20,23,26,29-六烯酸或(16Z,19Z,22Z,25Z,28Z,31Z)-三十四碳-16,19,22,25,28,31-六烯酸。

[0400] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述单羟基化的类延长素可以选自由式G、H、I或J组成的组：

[0401] 

G H I J。

[0402] 其中：n可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，并且其中：如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物G、H、I或J可以是其盐，则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子，并且如果-CO-OR可以是酯，则R可以是烷基。

[0403] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述药学上可接受的阳离子可以是铵阳离子、亚胺阳离子或金属阳离子。

[0404] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述金属阳离子可以是钠、钾、镁、锌或钙阳离子。

[0405] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体G和H，其中所述对映异构体在带有羟基的碳处具有(S)或(R)手性。

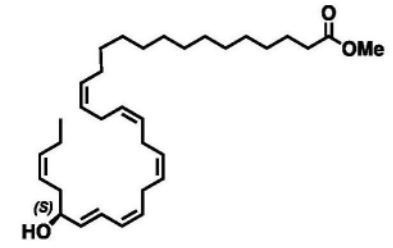
[0406] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括一定量的对映异构体I和J，其中所述对映异构体在带有羟基的碳处具有(S)或(R)手性。

[0407] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括G或H的对映异构体之一，其量超过G或H的另一种对映异构体的量。

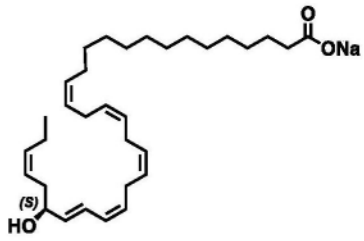
[0408] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述组合物可以包括I或J的对映异构体之一，其量超过I或J的另一种对映异构体的量。

[0409] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述单羟基化的类延长素可以选自由以下组成的组：(S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,23,25,29-六烯酸甲酯(G1)、(S,14Z,17Z,20Z,23Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,23,25,29-六烯酸钠(G2)、(S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,25,27,31-六烯酸甲酯(G3)；以及(S,16Z,19Z,22Z,25Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,25,27,31-六烯酸钠(G4)，它们分别具有下式：

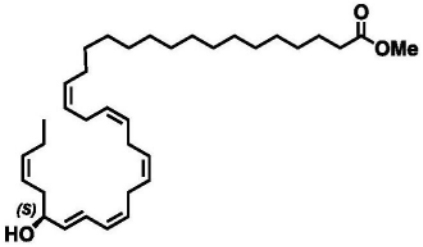
[0410]



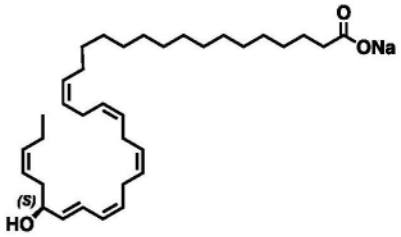
G1



G2



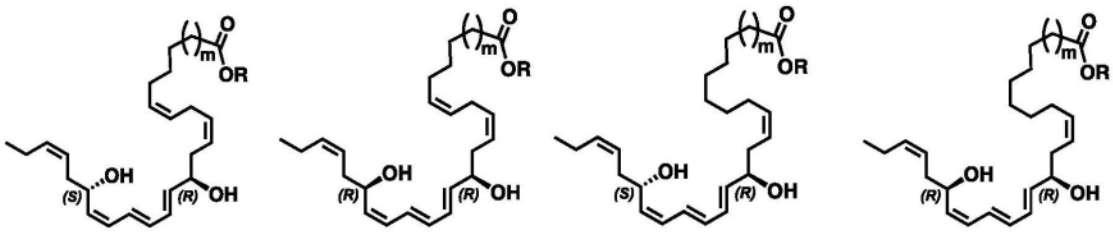
G3



G4

[0411] 在本公开的此方面的一些实施例中，所述二羟基化的类延长素可以选自由式K、L、M和N组成的组：

[0412]



K L M N

[0413] 其中：m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团，或其盐或酯，

[0414] 并且其中:如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物K、L、M或N可以是其盐,则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子,并且如果-CO-OR可以是酯,则R可以是烷基。

[0415] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述药学上可接受的阳离子可以是铵阳离子、亚胺阳离子或金属阳离子。

[0416] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述金属阳离子可以是钠、钾、镁、锌或钙阳离子。

[0417] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体K和L,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(R)手性。

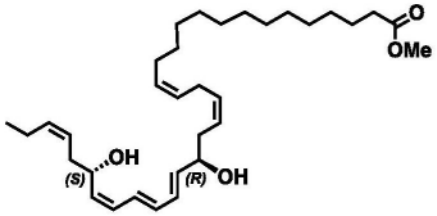
[0418] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体M和N,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(R)手性。

[0419] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括K或L的非对映异构体之一,其量超过K或L的另一种非对映异构体的量。

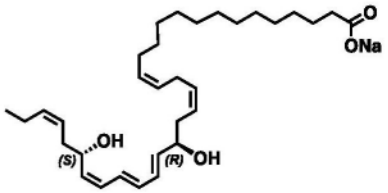
[0420] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括M或N的非对映异构体之一,其量超过M或N的另一种非对映异构体的量。

[0421] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述二羟基化的类延长素可以选自由以下组成的组:(14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-二烃基三十二碳-14,17,21,23,25,29-六烯酸甲酯(K1)、(14Z,17Z,20R,21E,23E,25Z,27S,29Z)-20,27-二烃基三十二碳-14,17,21,23,25,29-六烯酸钠(K2)、(16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-二烃基三十四碳-16,19,23,25,27,31-六烯酸甲酯(K3)以及(16Z,19Z,22R,23E,25E,27Z,29S,31Z)-22,29-二烃基三十四碳-16,19,23,25,27,31-六烯酸钠(K4),它们各自具有下式:

[0422]

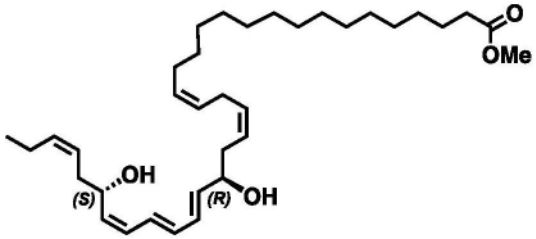


K1

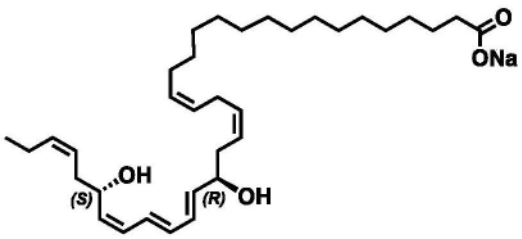


K2

[0423]

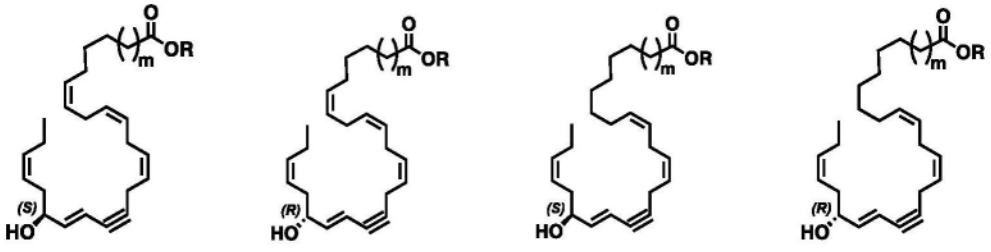


K3



K4

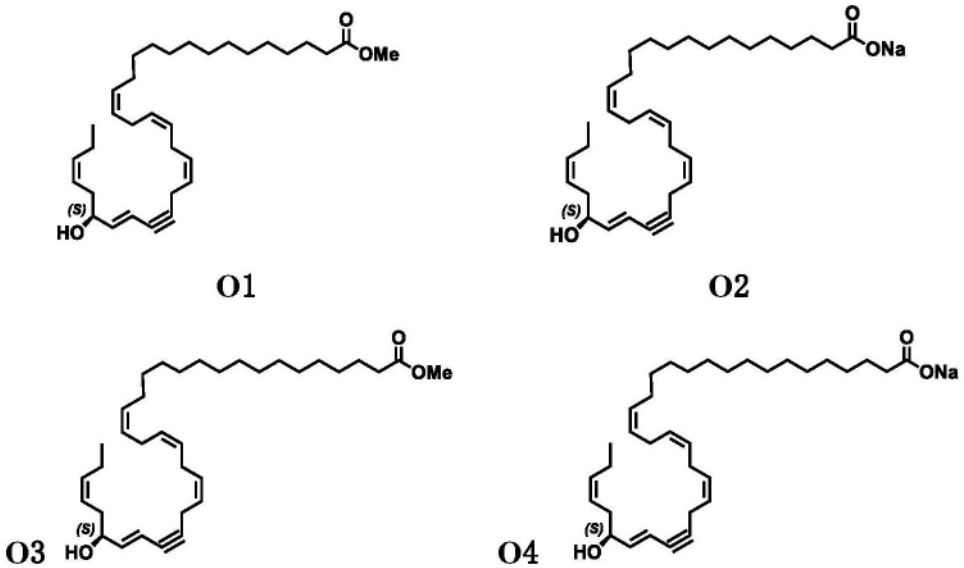
[0424] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述炔基单羟基化的类延长素可以选自由式O、P、Q或R组成的组:

[0425] 

O P Q R

[0426] 其中:m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团,或其盐或酯,并且其中:如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物O、P、Q或R可以是其盐,则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子,并且如果-CO-OR可以是酯,则R可以是烷基,并且其中:化合物O和P各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有定位在从n-3、n-12、n-15和n-18开始的位置处的4个顺式碳-碳双键;位于从n-7开始的位置处的反式碳-碳双键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键;并且化合物Q和R各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有从位置n-3、n-12和n-15处开始的3个顺式碳-碳双键、位于从n-7开始的位置处的反式碳-碳双键以及从位置n-9处开始的碳-碳三键。

[0427] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述炔基单羟基化的类延长素可以选自由以下组成的组:(S,14Z,17Z,20Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-14,17,20,25,29-五烯-23-炔酸甲酯(O1);(S,17Z,20Z,25E,29Z)-27-羟基三十二碳-17,20,25,29-四烯-23-炔酸钠(O2);(S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,27,31-五烯-25-炔酸甲酯(O3);以及(S,16Z,19Z,22Z,27E,31Z)-29-羟基三十四碳-16,19,22,27,31-五烯-25-炔酸钠(O4),它们分别具有下式:

[0428] 

O1 O2

O3 O4。

[0429] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述药学上可接受的阳离子可以是铵阳离子、亚胺阳离子或金属阳离子。

[0430] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述金属阳离子可以是钠、钾、镁、锌或钙阳离子。

[0431] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体

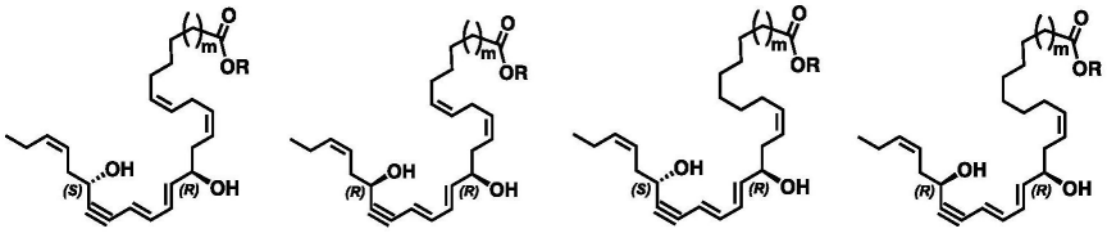
O和P,其中所述对映异构体在带有羟基的碳处具有(S)或(R)手性。

[0432] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的对映异构体Q和R,其中所述对映异构体在带有羟基的碳处具有(S)或(R)手性。

[0433] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括O或P的对映异构体之一,其量超过O或P的另一种对映异构体的量。

[0434] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括Q或R的对映异构体之一,其量超过Q或R的另一种对映异构体的量。

[0435] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述类延长素可以是选自由式S、T、U或V组成的组的炔基二羟基化的类延长素:

[0436] 

S T U V

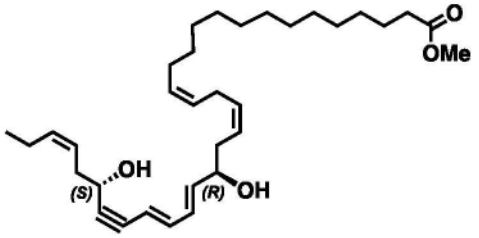
[0437] 其中:m可以是0到19并且-CO-OR可以是羧酸基团,或其盐或酯,并且其中:如果-CO-OR可以是羧酸基团并且化合物S、T、U或V可以是其盐,则盐的阳离子可以是药学上可接受的阳离子,并且如果-CO-OR可以是酯,则R可以是烷基,并且其中:化合物S和T各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有从位置n-3、n-15和n-18处开始的3个顺式碳-碳双键;从位置n-9、n-11处开始的2个反式碳-碳双键;以及从位置n-7处开始的碳-碳三键;并且化合物U和N各自在碳链中具有总共23到42个碳原子,具有从位置n-3和n-15处开始的2个顺式碳-碳双键;从位置n-9和n-11处开始的2个反式碳-碳双键;以及从位置n-7处开始的碳-碳三键。

[0438] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述药学上可接受的阳离子是铵阳离子、亚胺阳离子或金属阳离子。

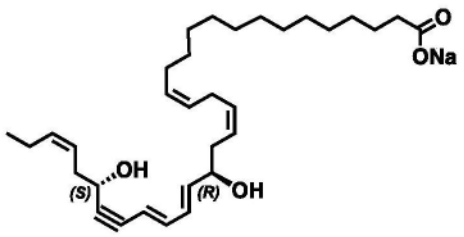
[0439] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述金属阳离子是钠、钾、镁、锌或钙阳离子。

[0440] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述炔基单羟基化的类延长素可以选自由以下组成的组:(14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,29-五烯-25-炔酸甲酯(S1);(14Z,17Z,20R,21E,23E,27S,29Z)-20,27-二羟基三十二碳-14,17,21,23,29-五烯-25-炔酸钠(S2);(16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,31-五烯-27-炔酸甲酯(S3);以及(16Z,19Z,22R,23E,25E,29S,31Z)-22,29-二羟基三十四碳-16,19,23,25,31-五烯-27-炔酸钠(S4),它们各自具有下式:

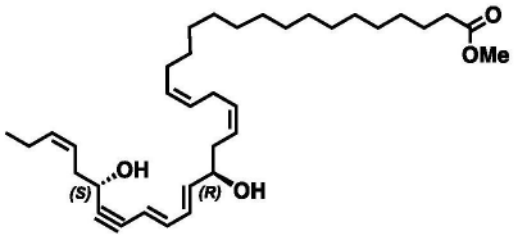
[0441]



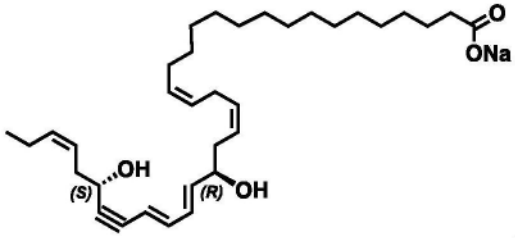
S1



S2



S3



S4

[0442] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体S和T,其中所述非对映异构体在带有羟基的碳处具有(S)或(R)手性。

[0443] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括等摩尔量的非对映异构体U和V,其中所述非对映异构体在位置n-6处具有(S)或(R)手性,并且在位置n-13处具有(R)手性。

[0444] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括S或T的非对映异构体之一,其量超过S或T的另一种非对映异构体的量。

[0445] 在本公开的此方面的一些实施例中,所述组合物可以包括U或V的非对映异构体之一,其量超过U或V的另一种非对映异构体的量。

[0446] 在检查以下附图、详细描述和实例后,本公开的其它组合物、化合物、方法、特征和优点对于本领域普通技术人员将是显而易见的或变得显而易见。所有这些额外的组合物、化合物、方法、特征和优点可以包含在本说明书中,并且在本公开的范围内。

[0447] 用于调节类延长素生物活性和可用性的组合物和方法

[0448] 细胞衰老是一种与衰老和疾病相关的细胞周期停滞形式。细胞衰老是与年龄相关性疾病(包含AD和AMD)相关的促炎细胞命运。衰老表型在经历终末复制停滞的细胞中表达,表现为细胞扩大、染色质改变、SASP和细胞周期调节蛋白(细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶)。衰老的持续积累与年龄相关性疾病和功能衰退有关。从组织中清除衰老细胞可以减轻与衰老相关的病理学,因为它们会在其微环境中传播退行性和促炎性事件。

[0449] 在大脑中,衰老特征程序在星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元中被触发(尽管是在有丝分裂后)。衰老细胞表型后果(例如,慢性炎症)也是AMD中的关键。细胞衰老是对抗癌症的防御事件,在与衰老和年龄相关的疾病中发挥作用。衰老细胞有助于创造一个促进肿瘤进展的微环境。这些事件涉及干细胞和祖细胞的消耗以及SASP表达的细胞紊乱后果,包含促炎稳态干扰细胞因子和趋化因子、生长因子和基质金属蛋白酶。

[0450] 此外,衰老细胞在损伤修复和组织重塑方面也具有有益作用。因此,不受理论束缚,衰老是年龄依赖性疾病和代谢综合征的驱动因素,除了通过衰老细胞清除去除对器官/生物体造成损害的其它细胞外,还可以去除健康细胞。例如,衰老细胞和SASP的积极作用是

通过由衰老细胞分泌的PDGF-AA触发的SASP的早期分泌来加速皮肤伤口愈合。伤口诱导局部成纤维细胞和内皮细胞衰老。结果，发生肌成纤维细胞分化、肉芽组织形成和伤口愈合完成。ELV修饰p16INK4a(也被称为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A，细胞周期蛋白依赖性激酶4抑制剂A)的表达(和蛋白质丰度)，所述p16INK4a是一种肿瘤抑制蛋白。该蛋白质由Ink4a/Arf基因座或Cdkn2a编码。p16通过减缓细胞从G1期到S期的进程而在细胞周期调节中发挥作用。

[0451] 参考这些图，ELV靶向上游铁死亡，这是一种参与衰老的程序性细胞死亡形式。发明人揭示了ELV的新分子靶标，其通过阻断支架蛋白PEBP-1的磷酸化来证明对细胞死亡的抑制(图29-31)。结果，没有形成过氧化脂质，并且铁死亡被阻断。衰老细胞中的铁、铁蛋白和氧化应激标志物得到增强。这些细胞表现出异常的铁稳态并影响衰老组织中的铁含量。铁本身会引起小胶质细胞的衰老，而铁螯合剂的降低可以减少和阻止细胞衰老中铁和铁蛋白的积累。不希望受理论束缚，作为急性期反应，衰老相关分泌表型(SASP)可以驱动神经元和神经胶质中的铁蛋白表达，这可以增强其对铁介导的细胞死亡过程(铁死亡)的易感性。

[0452] 例如，以下是具体的收敛机制：

[0453] 铁死亡处于自噬的中间阶段并参与衰老(图2-4)

[0454] AdipoR1受体亚型增强了VLC-PUFA的ELV前体的DHA细胞摄取/保留和可用性。在摄取/保留后，该受体亚型促进VLC-PUFA膜储库的磷脂酰胆碱的构建，这些储库在被PLA1释放后进入ELV生物合成通路。含有VLC-PUFA的膜在未补偿的氧化应激(UOS)攻击、创伤、缺血和神经退行性疾病发作时释放。在PRC死亡之前失败的通路上的5XFAD(图32和图37)。

[0455] 用于ELV和NPD1的特异性GPCR是开发MFRP与AdipoR1靶向肽的合成配体(肽小分子或其它)相互作用的基础，所述肽通过靶向特定受体而模拟ELV作用。GPCR数据(图36和图38)。

[0456] ELV靶向细胞内蛋白作为调节位点，以增强生物活性。鉴定细胞渗透(或组织渗透)肽或其它靶向GPCR的小分子。实例可以包含体内MO-(含有缓激肽类似物)。对视网膜没有毒性的实例(图34)。

[0457] 通过降解ELV来终止信号的酶作为新的小分子的靶标，这些小分子将通过阻断/减弱其降解来提高ELV的可用性。

[0458] ELV在GBM中的有益作用(见图)。

[0459] TBI(见图)

[0460] 因此，本发明的实施例包括导致消除衰老细胞的组合物和方法。例如，本发明的实施例涉及调节衰老细胞在癌症(化学疗法、脑(神经退行性疾病))、伤口愈合(糖尿病、角膜-角质形成细胞、褥疮)和神经退行性疾病(如AMD和AD)中的可用性的组合物和方法。

[0461] 本发明的实施例还涉及神经保护和/或神经恢复的组合物和方法。例如，在AMD或色素性视网膜炎(RP)或其它视网膜退行性疾病中，实施例在MCA的前驱靶向和/或失明之前的视力干扰中具有神经保护作用。此外，实施例在其它疾病(如AD、AM、CV疾病、代谢综合征、肥胖症、2型糖尿病、心肌梗塞、中风、TBI、GBM)中具有神经保护或神经恢复作用。例如，在癌症中，衰老细胞有助于创造一个促进肿瘤进展的微环境。

[0462] 本发明的一些方面涉及调节铁死亡和衰老并在疾病中具有有益结果的类延长素(ELV)的一组收敛机制。例如，本发明的方面涉及用于预防、治疗、改善癌症(如多形性胶质

母细胞瘤或GBM)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、阿尔茨海默病(AD)、其它神经退行性疾病、代谢综合征、肥胖症、2型糖尿病、神经外伤、皮肤和角膜伤口愈合的症状或减缓其进展的组合物和方法。

[0463] 在本文的实施例中使用的类延长素在PCT/US2016/017112、PCT/US2018/023082中进行了描述,所述文献的每一个均通过引用整体并入本文。例如,类延长素包括ELV-N-34或ELV-N-32,或其衍生物。n-3-VLC-PUFA(3)的脂氧合导致形成n-3-VLC-PUFA的酶促羟基化衍生物,其被称为类延长素,所述衍生物可以包含单羟基化合物(例如ELV-27S和ELV-29S,4)以及二羟基衍生物(例如ELV-N-32和ELV-N-34,5)。类延长素ELV-N-32是20R,27S-二羟基32:6衍生物(32个碳、6个双键的类延长素与神经保护素样20(R),27(S)-二羟基模式)。类延长素ELV-N-34是22R,29S-二羟基34:6衍生物(34个碳、6个双键的类延长素与22(R),29(S)-二羟基模式)。

[0464] 肽类似物

[0465] 进一步地,本发明的一些方面涉及开发新的合成非脂质类似物以模拟脂质介质(如类延长素)的生物活性。术语"类似物"可以指具有与第一有机或无机分子相似或相同功能的第二有机或无机分子。所述类似物可以在结构上类似于第一有机或无机分子。在实施例中,第一分子是脂质,并且第二分子(即类似物)是非脂质分子。例如,第一分子是类延长素,并且第二分子是肽。在此类实施例中,肽可以被称为"肽类似物"。

[0466] 在实施例中,肽类似物可以被认为是治疗性肽。术语"治疗性肽"可以指具有一种或多种治疗和/或生物活性的肽或其片段或变体。

[0467] 术语"肽"可以指包括通过肽键连接在一起的两个或更多个氨基酸残基的分子。这些术语可以包含例如天然和人工蛋白质、蛋白质序列的蛋白质片段和多肽模拟物(如突变蛋白、变体和融合蛋白)以及翻译后或以其它方式共价或非共价修饰的肽。肽可以是单体的或聚合的。在某些实施例中,"肽"是其中α碳可以通过肽键连接的氨基酸链。因此,链的一端(氨基末端)处的末端氨基酸具有游离氨基,而链的另一末端(羧基末端)处的末端氨基酸具有游离羧基。如本文所使用的,术语"氨基末端"(缩写为N端)可以指肽的氨基末端处的氨基酸上的游离氨基或肽中任何其它位置处的氨基酸的氨基。类似地,术语"羧基末端"可以指肽的羧基末端上的游离羧基或肽内任何其它位置中的氨基酸的羧基。肽还可以包含基本上任何聚氨基酸,包含但不限于通过醚而不是肽模拟物(如酰胺键)连接的氨基酸。

[0468] 在实施例中,肽类似物是包括至少四个通过肽键或本文所述的其它共价键连接的氨基酸的肽。在一个实施例中,肽或肽类似物的长度为约4到约50个氨基酸。4到50个氨基酸的所有整数子范围都可用于本文的肽。在一个实施例中,肽或肽类似物是长度上为约5到约35个氨基酸、约5到约30个氨基酸、约5到约25个氨基酸或约5到约20个氨基酸的氨基酸。在一个实施例中,肽或肽类似物是长度上为约6到约35个氨基酸、约7到约30个氨基酸、约6到约25个氨基酸或约6到约20个氨基酸的氨基酸。在一个实施例中,肽或肽类似物是长度上为约7到约35个氨基酸、约7到约30个氨基酸、约7到约25个氨基酸或约7到约20个氨基酸的氨基酸。在一个实施例中,肽或肽类似物是长度上为约8到约35个氨基酸、约8到约30个氨基酸、约8到约25个氨基酸或约8到约20个氨基酸的氨基酸。在一个实施例中,肽是长度为约8到约17或18或约9到约16或17个氨基酸的氨基酸。在一个实施例中,肽的长度为约10到约17或约12到约16或17或约14到约16个氨基酸。在一些实施例中,肽选自由以下组成的组:5聚

体、6聚体、7聚体、8聚体、9聚体、10聚体、16聚体、17聚体、18聚体、19聚体或20聚体。

[0469] 在实施例中，类延长素和/或肽类似物可以调节(regulate/modulate)铁死亡，其中调节铁死亡可治疗或预防受试者的疾病。如本文所使用的，“铁死亡”是指受调节的铁依赖性细胞死亡。铁死亡的特征是致命的脂质活性氧物质大量铁依赖性积累。铁死亡不同于细胞凋亡、坏死和自噬。例如，在Dixon等人(2012)中公开了铁死亡的测定。

[0470] 在其它实施例中，类延长素和/或肽类似物可以调节(regulate/modulate)细胞衰老，其中调节细胞衰老可治疗受试者的疾病。

[0471] 术语“调节(modulate、modulating)”及其语法变体意指改变(如增加或减少)生物活性。

[0472] 分子靶标

[0473] 在实施例中，类延长素和/或肽类似物可以结合一个或多个分子靶上的表位，如图28和图42中鉴定的那些。

[0474] 在实施例中，类延长素和/或肽类似物可以结合下表中鉴定的一个或多个分子靶标上的表位(例如，结合下表所列蛋白质NCBI参考编号所描绘的连续或非连续氨基酸序列)：

[0475]

	人				
	GPCR	mRNA	基因 ID	蛋白质 uniprot	蛋白质 NCBI
NPD1	LTB4R	NM_001143919.3	1241	Q15722	NP_001137391.1
	GPR37	NM_00502.5	2861	O15354	NP_005293.1
	GPR52	NM_005684.5	9293	P0C5J4	NP_005675.3
ELV32	GPR132	NM_001278696.2	29933	Q9UNW8	NP_037477.1
ELV34	CNR2	NM_001841.3	1269	P34972	NP_001832.1
	BAI2	NM_001364857.1	576	O60241	NP_001281264.1
	相互作用的蛋白质				
ELV34	TXNRD1	NM_001093771.3	7296	Q16881	NP_877393.1
	PEBP1	NM_002567.4	5037	P30086	NP_002558.1
	PTBP1	NM_002819.5	5725	P26599	NP_002810.1
ELV34	GSR（线粒体）	NM_001195104.2	2936	P00390	NP_000628.2

[0476] 在实施例中，类延长素和肽类似物与分子靶标上的相同或相似表位相互作用。在实施例中，类延长素和肽类似物可以与分子靶标上的不同表位相互作用。

[0477] 如本文所使用的，术语“表位”可以指分子靶标(如表中鉴定的那些，可以包含在本文中)的一部分，类延长素和/或肽类似物特异性结合至所述部分。

[0478] 例如，在实施例中，类延长素和肽类似物可以靶向LTB4R、GPR37、GPR52、GPR132、CNR2、BAI2、TXNRD1、PEBP1和/或GSR上的表位以调节细胞衰老和/或铁死亡。在实施例中，表位可以包含“靶位点”或“靶序列”，其可以指由结合配偶体(类延长素和肽类似物)结合的序列。例如，靶位点可以包括一个或多个氨基酸。

[0479] 本文表中的蛋白质可以被称为“分子靶标”。术语“靶标”或“分子靶标”可以指任何分子，例如细胞内或与细胞膜相关的分子，其正在被检查与候选化合物(例如，药物、类延长素或其肽类似物)的相互作用。分子靶标的非限制性实例可以包含DNA、RNA和蛋白质，如受体(例如，细胞表面、膜结合或核)、信号转导通路的组分、转录因子或其功能片段。分子靶标还可以包括大分子，如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、本文所述分

子的任何修饰衍生物，或包括本文所述分子中的一种或多种分子的任何复合物。当化合物、类延长素或肽类似物直接或间接影响分子靶标时，其会与分子靶标“相互作用”。化合物可以直接作用于分子靶标，例如当分子靶标是蛋白质时，所述化合物可以通过与其结合直接与该蛋白质相互作用，或者可以通过作用于转录调节元件直接调节该蛋白质的表达。类似地，化合物也可以间接作用于分子靶标，例如通过阻断或刺激一个单独的分子，该分子进而作用于分子靶标。例如，当靶标是非蛋白质分子并且化合物与参与非蛋白质分子靶标的产生、稳定性、活性、维持和/或修饰的蛋白质相互作用时，可以发生化合物对分子靶标的间接作用。

[0480] 术语“结合”可以指通过标准测定法(包含本文所述的那些测定法)确定，结合多肽识别并可逆地结合给定靶标。此类标准测定可以包含但不限于平衡透析、凝胶过滤和监测由结合引起的光谱变化。

[0481] 在实施例中，类延长素或肽类似物可以对表1中的分子靶标具有特异性。术语“特异性”可以指结合多肽对一个靶标比对另一个靶标具有更高的结合亲和力。结合特异性可以通过两种测试的目标材料的解离平衡常数(K_D)或缔合平衡常数(K_a)来表征。

[0482] 实例

[0483] 实例1-如本文实例中使用的原代人鼻上皮细胞(HNEpC)

[0484] 冷冻保存的人鼻上皮细胞HNEpC购自德国海德堡的PromoCell GmbH。(目录号C-1260，批号436Z028)。

[0485] 用于我们实验的细胞是从一名50岁高加索男性的鼻粘膜获得的原代鼻上皮细胞。

[0486] 细胞在通道(P1)中被接收，并被传代培养至通道(P3)，用于所有实验。

[0487] 将HNEpC在Promocell的气道上皮细胞生长培养基(目录号C-21060)中生长至80％的融合度，所述培养基补充有气道上皮细胞生长培养基补充包(目录号C-39160)和青霉素/链霉素。

[0488] 实例2-使用多种应激物(气源性过敏原)对HNEpC进行攻击

[0489] • 来自大肠杆菌血清型0111:B4(目录号L4391)的脂多糖(LPS)购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)。LPS是革兰氏阴性菌的主要组分，其通过Toll样受体4(TLR4)的识别来激活先天免疫系统。这导致信号传导级联，最终导致NF-κB的激活和促炎细胞因子的产生。我们用于实验的LPS是从革兰氏阴性大肠杆菌0111:B4中纯化的光滑(S)型LPS制剂，其用于以30μg/mL攻击HNEpC。

[0490] • 聚肌苷-聚胞苷酸(缩写为poly(I:C)或poly(rI):poly(rC))是双链病毒RNA(dsRNA)的合成类似物，其是一种与病毒感染(如上皮完整性的丧失、粘液和炎性细胞因子的产生增加)相关的分子模式。Poly(I:C)是一种TLR3激动剂，可激活抗病毒模式识别受体TLR3、RIG-I/MDA5和PKR，从而通过包含NF-κB和IRF在内的多种炎症通路诱导信号传导。高分子量Poly(I:C)包括与胞苷poly(C)均聚物链退火的肌苷poly(I)均聚物长链。Poly(I:C)HMW的平均大小为1.5kb到8kb。Poly(I:C)(目录号P1530)购自西格玛奥德里奇公司，并以100μg/mL的浓度用于攻击HNEpC。

[0491] • 屋尘螨提取物来自屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)(D.P.)(目录号3033)-纯冻干提取物来自Chondrex公司。

[0492] • D.P.以30μg/mL的浓度用于攻击HNEpC。过敏原-Der p1、Der p2。

[0493] • 屋尘螨提取物来自粉尘螨(Dermatophagoides farinae)(D.F.)(目录号3040)-纯冻干提取物来自Chondrex公司。

[0494] • D.F.以30μg/mL的浓度用于攻击HNEpC。过敏原-Der f1、Der f2

[0495] • 屋尘螨提取物-HDM,一种(D.P.)和(D.F.)二者的混合物,用于以(15μg/mL+15μg/mL)攻击HNEpC。

[0496] 实例3-使用几种应激物(气源性过敏原)对(HNEpC)进行攻击,并进行了以下测定:

[0497] • LDH细胞毒性测定-使用来自Invitrogen的CyQuant LDH细胞毒性测定试剂盒(目录号C20301)。

[0498] • 细胞活力测定-使用来自Invitrogen的PrestoBlue HS细胞活力测定试剂盒(目录号C50201)。

[0499] • Chondrex、Abcam和R&D Systems的夹心ELISA测定:

[0500] 1)来自Chondrex的人IL-6检测试剂盒(目录号6802)

[0501] 2)来自Chondrex的人IL-1β检测试剂盒(目录号6805)

[0502] 3)来自R&D Systems的人IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA试剂盒(目录号D8000C)

[0503] 4)来自Chondrex的人CCL2/MCP-1检测试剂盒(目录号6821)

[0504] 5)来自Chondrex的人CXCL1/KC/GRO检测试剂盒(目录号6825)

[0505] 6)来自Chondrex的人VEGF检测试剂盒(目录号6810)

[0506] 7)来自Abcam的人ICAM1(CD54)ELISA试剂盒(目录号ab100640)

[0507] 8)来自Chondrex的人IL-10检测试剂盒(目录号6806)

[0508] 实例4-使用Presto Blue HS试剂的细胞活力测定

[0509] PrestoBlue HS细胞活力试剂是一种完全添加和读取、无毒试剂,其不需要细胞裂解。用于PrestoBlue HS的高度纯化的刃天青导致产生背景荧光降低>50%且信噪比提高>100%的试剂。

[0510] 在进入活细胞时,细胞还原环境将刃天青还原为试卤灵,一种红色且高荧光的化合物。

[0511] 活细胞连续地将刃天青转化为试卤灵,从而增加细胞周围培养基的整体荧光和颜色。此外,刃天青转化为试卤灵会导致明显的颜色变化,因此可以使用基于吸光度的读板器检测细胞活力。

[0512] 使用560nm的荧光激发波长(激发范围为540-570nm)和590nm的发射(发射范围为580-610nm)读取荧光。

[0513] 实例5-结论

[0514] 细胞毒性测定(LDH)的结果表明,在添加应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)后,红色甲臜的形成显著增加,这指示细胞毒性,通过添加ELV可降低细胞毒性。(图17A和图17B)。

[0515] 使用PrestoBlue HS试剂的细胞活力测定还显示,与受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击的细胞相比,对照细胞中产生更多的试卤灵;添加ELV可增加细胞活力并为HNEpC提供保护(图18A和图18B)。

[0516] 与对照相比,当HNEpC受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击时,会显著产生促炎细胞因子和趋化因子-IL-6、IL-1β、IL-8/CXCL8、CCL2/MCP-1、CXCL1/KC/GRO、

VEGF、ICAM1(CD54)。通过在用相应的应激物攻击后30分钟时添加浓度为500nM的ELV来消除这种增加的促炎细胞因子和趋化因子的产生(图19A和图19B)。

[0517] 相反,当HNEpC受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击时,与对照相比,抗炎细胞因子IL-10的释放明显减少。通过在用相应的应激物攻击后30分钟时添加浓度为500nM的ELV来逆转这种减少的抗炎细胞因子的产生(图26A和图26B)。

[0518] 实例6-用于过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎和哮喘的类延长素

[0519] 以下是引发人鼻粘膜炎症/过敏(在原代培养中),并且类延长素收缩从而保护这些细胞的完整性的实验条件。

[0520] a)聚肌苷-聚胞苷酸(poly(I:C)或poly(rI):poly(rC)),一种双链病毒RNA(dsRNA)的合成类似物,其是一种与病毒感染(如上皮完整性的丧失、粘液和炎性细胞因子的产生增加)相关的分子模式;

[0521] b)LPS,革兰氏阴性菌的主要组分,其通过Toll样受体4(TLR4)的识别来激活先天免疫系统。这导致信号传导级联,最终导致NF-κB的激活和促炎细胞因子的产生。我们用于实验的LPS是从革兰氏阴性大肠杆菌0111:B4中纯化的光滑(S)型LPS制剂,其用于以30μg/mL攻击HNEpC;

[0522] c)屋尘螨提取物来自屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)(D.P.)(目录号3033)-纯冻干提取物来自Chondrex公司。D.P.以30μg/mL的浓度用于攻击HNEpC。过敏原-Der p1、Der p2;

[0523] d)屋尘螨提取物来自粉尘螨(Dermatophagoides farina)(D.F.)(目录号3040)-纯冻干提取物来自Chondrex公司。D.P.以30μg/mL的浓度用于攻击HNEpC。过敏原-Der f1、Der f2;

[0524] e)屋尘螨提取物-HDM,一种(D.P.)和(D.F.)二者的混合物,用于以(15μg/mL+15μg/mL)攻击HNEpC。

[0525] 对瘙痒、呼吸困难等的过敏治疗仍然不一致,因为许多人出现嗜睡、口干和其它副作用,这使得日常运作变得困难。类延长素可以通过鼻内递送来治疗过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、过敏性皮炎和哮喘,从而停止这些疾病的发展,为大多数非处方药及其抑制副作用提供有效的替代品。

[0526] 细胞毒性测定(LDH)的结果表明,在添加应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)后,红色甲臜的形成显著增加,这指示细胞毒性,通过添加ELV可降低细胞毒性。(图17A和图17B)。

[0527] 使用PrestoBlue HS试剂的细胞活力测定还显示,与受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击的细胞相比,对照细胞中产生更多的试卤灵;添加ELV可增加细胞活力并为HNEpC提供保护(图18A和图18B)。

[0528] 与对照相比,当HNEpC受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击时,会显著产生促炎细胞因子和趋化因子-IL-6、IL-1β、IL-8/CXCL8、CCL2/MCP-1、CXCL1/KC/GRO、VEGF、ICAM1(CD54)。通过在用相应的应激物攻击后30分钟时添加浓度为500nM的ELV来消除这种增加的促炎细胞因子和趋化因子的产生(图19A和图19B)。

[0529] 相反,当HNEpC受到不同应激物(LPS、poly(I:C)、HDM提取物)攻击时,与对照相比,抗炎细胞因子IL-10的释放减少。通过在用相应的应激物攻击后30分钟时添加浓度为500nM

的ELV来逆转这种减少的抗炎细胞因子的产生(图26A和图26B)。

[0530] 实例7

[0531] (1)可以在疾病明显之前成为前驱病状的目标。5xFAD视网膜的结构和功能。(A)Vlog I绘图示出了0到0.075cd·s/m2的闪光的最大ERG b波振幅。5xFAD小鼠的最大振幅约为100μV,约为针对野生型小鼠所记录的一半。(B)5个月大的5xFAD视网膜的电子显微镜,其展示了与野生型视网膜的形态相似性。i.5xFAD RPE细胞的基底侧,其示出了沿布鲁赫膜(Br)的膜折叠。ii.野生型杆外段基部的圆盘合成区域(箭头),其示出了来自连接纤毛(CC)膜的新形成的圆盘。iii.5xFAD视网膜中的类似区域,其示出了新的磁盘形成(箭头)。iv.5xFAD视网膜中细胞体层(N,光感受器核)的巩膜边缘处的外界膜(OLM,箭头)。Müller细胞(M)的细胞质比光感受器细胞(PR)的细胞质轻。v.5xFAD RPE细胞和杆状光感受器尖端(PR)之间的接口。两个吞噬体(Ph)仅在RPE细胞质内可见;较低的Ph保持在RPE心尖突内,而上部较暗的Ph更老,并且刚刚进入RPE细胞体,这展示了正常的吞噬功能。vi.5xFAD视网膜的内段线粒体(M)保留了非常细长的健康光感受器形式。(C)五个月大的野生型和5xFAD视网膜切片,其展示了5xFAD视网膜内的正常光感受器轮廓。(D)对来自WT和5xFAD的视网膜的荧光染色。蓝色(DAPI)是5xFAD中6个月大时RPE层中的细胞核和红色Aβ。(*P<0.05,使用学生t检验比较)。

[0532] 实例8

[0533] 在WT小鼠中视网膜下注射OAβ后,ELV可恢复RPE形态并降低基因表达。(A)将小鼠分为7组:未注射、PBS、仅OAβ、OAβ+ELV-N-32、OAβ+ELV-N-34、仅ELV-N-32和仅ELV-N-34。在第3天,分离mRNA用于RT-PCR。在第7天,对小鼠进行OCT,然后对眼睛进行去核并加工以用于整体RPE染色和蛋白质印迹。(B)RPE的全平面安装。OAβ破坏了RPE形态。然而,在ELV治疗组和PBS中,RPE的损伤较小,单独的ELV不会引起变化。(C)OCT对视网膜和RPE的OAβ影响评估。(D)OAβ注射组中的PRC厚度较薄。OAβ导致PRC的细胞死亡,作为OCT测量中的稀释剂。(E)OAβ(1-42)注射和用ELV处理后的RPE基因表达。注射3天后,分离来自RPE的RNA,将其逆转录为cDNA,并用不同引物进行RT-PCR。同一功能组中的基因绘制在同一图表中,包含衰老相关和AMD相关基因(E),以及胶原酶、明胶酶、间质溶解素和其它基质金属蛋白酶(MMP)(F)以及自噬(G)。(H)RPE/脉络膜的p16INK4a蛋白质印迹。ELV-N-32和ELV-N-34下调了关键衰老标志物p16INK4a的表达,而OAβ注射使p16INK4a升高。(I)OAβ(1-42)注射和用ELV处理后的视网膜基因表达。OAβ激活视网膜中的凋亡基因。通过ELV共注射,这些基因被下调。(*P<0.05,使用学生t检验比较)。

[0534] 实例9

[0535] OAβ毒性被原代hRPE中的ELV抵消。(A)在添加或不添加ELV的情况下用10μM OAβ处理原代hRPE细胞。3天后,分离总RNA并进行q-PCR分析。7天后,对细胞进行β-半乳糖苷酶染色。(B)7天后明场显微镜成像下的原代hRPE的活细胞图像。(C)原代hRPE的β-半乳糖苷酶染色,+/-ELV。β-Gal阳性细胞百分比的定量。ELV减少了阳性衰老细胞。(D)在OAβ(1-42)暴露和ELV治疗下,原代hRPE中衰老基因、AMD相关基因和自噬基因的转录。(*P<0.05,使用学生t检验比较)。

[0536] 实例10

[0537] ELV在OAβ诱导的RPE和PRC损伤中的工作模型。(A)OAβ诱导衰老并破坏RPE的紧密

连接。接下来,OAβ穿透视网膜,导致反映在较少细胞体层(CBL)细胞核中的光感受器细胞死亡。类延长素在OAβ暴露后恢复RPE层的形态,因此保留了视网膜结构。(B)OAβ诱导RPE中的衰老、自噬、基质金属蛋白酶和AMD相关基因以及视网膜中的凋亡基因。ELV下调OAβ-基因诱导。描绘了用于合成ELV的通路。

[0538] 实例11-类延长素对下丘脑和脂肪组织中衰老编程的下调抵消了糖尿病的发作和进展

[0539] 1)研究计划

[0540] a)具体目标

[0541] 2型糖尿病(肥胖的结果)的发病率正在迅速增加,例如在衰老过程中,并且是肾功能不全、心血管疾病、中风、伤口愈合受损、感染、抑郁、焦虑和认知能力下降的危险因素。尽管我们对糖尿病、代谢综合征和合并症的发病机制的理解取得了进展,但尚无有效的治疗方法。细胞衰老通过靶向胰腺β细胞功能和通过触发脂肪组织功能障碍而与年龄相关性慢性炎性疾病相关,包含代谢综合征(高血压、肥胖症和动脉粥样硬化),与2型糖尿病的发病机制相关。衰老编程形成一个糖尿病循环-细胞功能障碍的原因和后果。此类新的脂质介质,即类延长素(ELV),将作为衰老编程的下调调节剂被研究,以对抗糖尿病的发作和进展。我们在本文中提供验证一种新的治疗方法,所述方法利用糖尿病实验模型中令人信服的证据和我们最近发现的一种机制所支持的特定新化合物。

[0542] ELV是极长链多不饱和脂肪酸(VLC-PUFA)32:6n-3和34:6n-3的二羟基化衍生物。作为ELV的前体,VLC-PUFA通过22:6n-3脂肪酸的延长进行生物合成,并由ELOVL4(极长链脂肪酸-4的延长)催化。我们的实验室报告了ELV的发现,包含它们的详细结构和立体化学,如通过立体控制的全有机合成所建立的1,2。最近,我们的实验室发现,ELV是低丰度、高效、神经保护、促稳态的介质,其可在稳态破坏时阻止神经细胞中的衰老基因编程和衰老激活分泌表型(SASP)3。

[0543] 不希望受理论束缚,类延长素主要通过涉及衰老转录组和SASP的衰老程序(SP)下调脂肪组织(AT)和下丘脑(HT)中的缓慢炎症(发炎)。这通过使用来自糖尿病患者的人脂肪细胞、遗传糖尿病小鼠模型、培养物中的人脑细胞以及解决HT中特定功能问题的最先进方法的数据得到了验证。

[0544] HT也是一个靶标,因为虽然它包括终末分化细胞并且起源于神经上皮、衰老小鼠中的衰老神经元、AD模型4和星形胶质细胞5,6,但它也表达衰老并产生分泌型SASP,所述分泌型SASP促进附近细胞的神经炎症7-9。我们最近的研究表明,邻近的细胞被SASP的神经毒性作用靶向,从而诱导视网膜旁分泌衰老3。

[0545] 目标1)验证在通过TNFα、IL1β或其它诱导剂进行诱导后,类延长素在糖尿病患者的衰老编程激活中抵消人脂肪细胞。

[0546] 活跃的褐色/米色AT可塑性增加能量消耗,并与降低的高血糖和高脂血症有关;另一方面,它的萎缩和失活与肥胖症和衰老有关。因此,慢性缓慢发展的局部炎性病状会破坏内部信号的调节以及与HC的连接。

[0547] 目标2)验证遗传性糖尿病小鼠的HT会产生SP,其进而损害突触连接和神经元功能障碍。这得到了数据的支持,这些数据表明遗传性糖尿病小鼠的HC表现出扰乱的电生理活动(在我们新开发的Maestro系统中)。因此,除了评估治疗性类延长素的模型外,我们还有

一个新的实验模型可以利用和机制。

[0548] 目标3)在糖尿病小鼠全身和/或鼻内施用时,测试类延长素的实验性治疗效果。

[0549] b)意义和创新

[0550] 这个实例基于新的促稳态和神经保护介质类延长素(ELV)对糖尿病的治疗用途。这些化合物维持神经细胞完整性1,10,抵消衰老程序3,并且,正如我们目前的数据所支持的那样,阻止脂肪组织(人类糖尿病患者)和下丘脑(遗传性糖尿病小鼠模型)中的信号传导干扰。ELV在经历氧/葡萄糖剥夺或N甲基-D-天冬氨酸受体介导的兴奋性毒性以及实验性缺血性中风的神经元培养物中介导保护作用10。在大脑中动脉闭塞缺血2小时后1小时进行施用时,ELV-N-32和ELV-N-34的甲酯或钠盐可减少梗死体积、促进细胞存活并减少神经血管单元破坏。

[0551] 类延长素作为糖尿病和肥胖症的疗法

[0552] 最近发现,由于高脂肪饮食而变得肥胖的瘦小鼠在其大脑中表现出增强的衰老细胞丰度和焦虑行为11。这项研究还提供了第一个证据,表明肥胖驱动的焦虑被消散衰老细胞的新型抗衰老药物抑制。衰老细胞释放衰老相关分泌表型(SASP),诱其导附近的健康细胞参与功能障碍。

[0553] 将衰老细胞移植到年轻小鼠体内会引发虚弱、虚弱和持续性功能障碍,这些通过施用抗衰老混合物来减轻,所述抗衰老混合物可以包含达沙替尼(一种抗白血病药物)和槲皮素(一种植物类延长素),其启动衰老细胞的程序性细胞死亡,从而延长衰老小鼠的寿命和健康寿命。一些出版物报道了衰老细胞在肥胖症中积累。肥胖小鼠在侧脑室附近的白质中显示出增强的衰老细胞丰度12-17。

[0554] 类延长素作为一种疗法得到以下各项支持:

[0555] 1)我们关于AT和HT的数据(见本文)

[0556] 2)我们关于培养物中的人神经元的数据表明SASP激活被ELV阻断(见本文)。ELV可抵消人神经细胞的衰老。

[0557] 3)我们通过蛋白质印迹报道了,寡聚A-β肽激活SP、SASP,随后视网膜细胞死亡,并且类延长素阻止SP基因p16INK4a、MMP1、p53、p21、p27、Il-6和MMP1以及SASP分泌组和p16蛋白的表达3。

[0558] 4)此外,我们发现类延长素在视网膜细胞中的寡聚A-β肽攻击时抑制自噬基因(ATG3、ATG5、ATG7和Beclin-1)的表达3。自噬是褐色/米色脂肪细胞可塑性的关键事件,通过在褐色/米色脂肪生成、产热激活和失活过程中调节细胞内重塑。这可以包含线粒体的自噬降解,这对于褐色脂肪细胞的失活和从米色到白色脂肪组织的转变至关重要3。

[0559] 5)我们还发现类延长素调节基质金属蛋白酶转录组(MMP1a、MMP2、MMP3、MMP8、MMP9、MMP12和MMP13),并且我们指出,利用SASP,这种机制有助于改变细胞外基质3。所以,在AT和HT二者中,SASP都是自分泌和旁分泌的,因此会改变AT和HT中细胞外基质微环境的稳态,从而产生导致胰岛素敏感性功能受损的炎症环境。类延长素调节缓慢的、慢性的、无菌的炎症(即,发炎)。这甚至是本文描述的基本原理的一个重要租户。

[0560] 6)此外,类延长素的另一个目标是神经元和神经损伤模型中未解决的氧化应激和炎症1,2。这些改变,如未解决的炎症,在功能失调的脂肪细胞中发展,并且是在AT和胰岛素抵抗中研究的促炎信号传导的最佳结果之一。TNF-α由免疫细胞产生,通过下调主要的胰岛

素反应性葡萄糖转运蛋白GLUT4直接阻止脂肪细胞中的胰岛素作用,并且除了IL-6、IFN-γ和CCL2外,还通过产生神经酰胺抑制胰岛素受体和IRS-1的胰岛素依赖性酪氨酸磷酸化。

[0561] 7)翻译创新。使用合成产生的内源性类延长素分子的仿生治疗方法,其:

[0562] -恢复稳态和对抗糖尿病-阻止代谢综合征/肥胖症中的衰老编程和神经细胞损伤

[0563] -使用创新的药物化学

[0564] c)研究方法

[0565] 下丘脑是代谢综合征的靶标并且对肥胖症和2型糖尿病至关重要。

[0566] 生理恶化的各个方面,包含肥胖症和2型糖尿病,由下丘脑控制,下丘脑是连接神经内分泌系统和生理功能的关键大脑区域。此外,一组刺鼠相关肽/神经肽Y(AgRP/NPY)和阿片促黑素细胞皮质素原(POMC)神经元、一组生长激素释放激素(GHRH)和生长抑素(SST)神经元、一组精氨酸加压素(AVP)和血管活性肠肽(VIP)神经元以及一组促性腺激素释放激素(GnRH)和吻素(Kisspeptin)/神经激肽B/强啡肽(KNDy)神经元导致与年龄相关的能量代谢、激素调节、昼夜节律和生殖的生理衰退。下丘脑介导的功能障碍进展的潜在细胞机制包括营养感知失调、细胞间通讯改变、干细胞衰竭、衰老编程激活、蛋白质稳态丧失和表观遗传改变。

[0567] 弓状(ARC)下丘脑神经元的功能之一是对局部和外周的激素和神经肽作出适当的反应,并参与能量稳态。弓形下丘脑神经元向PVN投射,并且在刺激ARC时,多巴胺和GABA共同释放到PVN中的神经元,在此处多巴胺激发的食欲神经元合成AgRP和NPY,并抑制合成POMC的厌食神经元。下丘脑腹内侧核(VMH)参与检测低血糖事件并启动生理反调节反应以克服它。因此,为了评估下丘脑作为类延长素的靶标,我们使用来自C57BL/6J(WT)小鼠和年龄匹配的Leprdb(db/db糖尿病)小鼠大脑的下丘脑切片的离体器官培养物,并且使用由MaestroPro MEA(乔治亚州Axion Biosystems)执行的创新性Maestro微电极阵列(MEA)发现突触电路系统活动和动作电位放电序列的变化(见下文)。

[0568] 评估下丘脑作为糖尿病中类延长素的靶标的微电极阵列(MEA)测量。

[0569] 使用用来自乔治亚州Axion Biosystems的MaestroPro MEA系统执行的Maestro微电极阵列(MEA),我们确定了从C57BL/6J(WT)小鼠和年龄匹配的Leprdb(db/db糖尿病)小鼠的大脑中获得的下丘脑切片(厚度为200μm)的离体器官培养物是否具有电活性,并且能够放电动作电位序列。

[0570] 使用来自乔治亚州Axion Biosystems的48孔微电极阵列(MEA)板(M768-tMEA-48W)进行MEA测量。MEA板的每个孔都含有4×4网格的30nm圆形纳米多孔PEDOT电极,嵌入细胞培养底物中,极间电极间距为200μM。在准备接种丘脑切片时,将孔用0.1%聚乙烯亚胺(PEI)的硼酸钠缓冲液(pH 8.4)处理。然后将孔预涂在层粘连蛋白(6μg/mL)中,并将下丘脑切片(厚度为200μm)平板接种在电极网格上。在37℃和5%CO2条件下,将下丘脑切片在补充有B27™和N2补充剂以及GlutaMax™和Pen Strep(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Gibco™)的完全神经基础培养基中的培养物中平板接种并维持4天。

[0571] 使用MaestroPro MEA系统和AxIS软件版本1.5.1.12的标准神经设置,在37℃的培养基中进行自发动作电位的细胞外记录。(Axion Biosystems)。将数据以12.5kHz的速率采样,硬件频率带宽为200-5000Hz,并使用200-2500Hz单阶巴特沃斯(Butterworth)带通滤波器在软件中再次过滤,以在尖峰检测之前去除高频噪声。尖峰检测的阈值设置为每个电极

上过滤场电位滚动标准偏差的6倍。五分钟的记录跨度用于计算孔的平均尖峰速率,以及孔中的活性电极数量(“活性电极”),其被定义为尖峰速率≥0.5/分钟的数量。在从分析中忽略嘈杂的电极后,对每个电极记录的尖峰数进行平均。尖峰时间戳被导出到Neuroexplorer 5.0(NEX Technologies),以创建尖峰栅格图。

[0572] 使用MEA系统,从不同的下丘脑神经元记录群体水平的电活动。参考图43,在左上的图片中,我们有代表性的栅格图显示C57Bl6(WT)雄性小鼠的爆发活动和尖峰直方图,而在左下的图片中是用ELV(500nM)处理的C57Bl6(WT)雄性小鼠的栅格图。每个孔的光栅迹线显示下丘脑神经元对与活动神经元接触的电极进行可测量的放电。每个水平行代表孔中的一个电极。在来自正常C57Bl6 WT对照的下丘脑切片中,自发活动(孤立的单尖峰和多尖峰爆发)很明显,而中间和右上的图片分别示出了Leprdb(db/db糖尿病)雄性和雌性小鼠的光栅图。这些图显示了异步场电位和尖峰/爆发活动。低水平的尖峰可能是由于细胞自主性缺乏兴奋性或缺乏来自邻近细胞的突触所驱动的。所有这些尖峰都是通过添加多巴胺(50nM)和GABA-a拮抗剂荷包牡丹碱(10μM)诱导的。添加NMDA(10μM)后,没有诱导大的尖峰,而是像基线一样。中间图和右下的图片显示,在Leprdb(db/db糖尿病)雄性和雌性年龄匹配的对照小鼠下丘脑切片中,通过添加ELV-34-6Na(500nM)克服了异步活动,并且恢复了同步尖峰。ELV34可以保护下丘脑免受神经变性。在这里,我们已经证明,我们可以使用多电极阵列(MEA)系统的HTS筛查方法对CNS调节的疾病进行建模并描绘对照/疾病状态之间的差异,并且类延长素在逆转糖尿病的不良影响方面具有治疗作用,并且可能在中枢神经系统调节糖代谢中起关键作用。

[0573] 类延长素对成年肥胖糖尿病小鼠(db/db)中下丘脑神经元细胞死亡的保护(通过Fluoro-Jade B染色)

[0574] Fluoro-Jade b(F-Jb)染色退化的神经元。成年肥胖糖尿病小鼠(db/db)在下丘脑的器官切片中显示出增加的FJb信号,而野生型小鼠描绘的量可忽略不计,这表明db/db小鼠下丘脑正在经历神经退行性变。用500nM ELV34孵育48小时引发了神经保护作用,这反映在F-Jb信号的减少中(a)。

[0575] 人脑神经元/星形胶质细胞的验证实验证明类延长素阻断衰老相关分泌表型(SASP):衰老神经元的β-半乳糖苷酶染色

[0576] 在暴露于寡聚淀粉样蛋白β(Oaβ)(10μM)的人神经元-神经胶质(HNG)细胞中测量的衰老相关的β-半乳糖苷酶活性。(A-G)用Oaβ(10μM)和不同的类延长素(ELV)或浓度为500nM的神经保护素D1(NPD1)处理的HNG细胞中的SA-β-Gal活性。用明场显微镜获得显微照片。(H)(A-G)中所示的SA-β-Gal+细胞的定量。在至少150个总细胞的3个随机区域中对SA-β-Gal+细胞进行评分。结果表示为染色的SA-β-Gal+细胞的百分比(平均值±SEM)。使用Graphpad Prism软件8.3进行统计分析。将结果与单因素ANOVA相比,然后进行Holm’s Sidak事后检验,并且$p<0.05$被认为具有统计学意义。

[0577] 类似地,在暴露于爱拉斯汀(10μM)的人神经元-神经胶质(HNG)细胞中测量的衰老相关的β-半乳糖苷酶活性。(A-G)用爱拉斯汀(10μM)和不同的类延长素(ELV)或浓度为500nM的神经保护素D1(NPD1)处理的HNG细胞中的SA-β-Gal活性。用明场显微镜获得显微照片。(H)(A-G)中所示的SA-β-Gal+细胞的定量。在至少150个总细胞的3个随机区域中对SA-β-Gal+细胞进行评分。结果表示为染色的SA-β-Gal+细胞的百分比(平均值±SEM)。使用

Graphpad Prism软件8.3进行统计分析。将结果与单因素ANOVA相比，然后进行Holm'sSidak事后检验，并且p<0.05被认为具有统计学意义。实验设计：使用Oaβ或爱拉斯汀攻击人神经元神经胶质(HNG)细胞。

[0578] 以下目标将测试本文所述的组分：

[0579] 目标1)测试以下预测：在通过TNFα、IL1β或其它诱导剂进行诱导后，类延长素在糖尿病患者的衰老编程激活中抵消人脂肪细胞。

[0580] 活跃的褐色/米色AT可塑性增加能量消耗，并与降低的高血糖和高脂血症有关；另一方面，它的萎缩和失活与肥胖症和衰老有关。

[0581] 目标2)测试遗传性糖尿病小鼠的HT会产生SP，其进而损害突触连接和神经元功能障碍。这得到了数据的支持，这些数据表明遗传性糖尿病小鼠的HC表现出扰乱的电生理活动(在我们新开发的Maestro系统中)。因此，除了评估治疗性类延长素的模型外，我们还有一个新的实验模型可以测试机制。

[0582] 目标3)在糖尿病小鼠全身和/或鼻内施用时，测试类延长素的实验性治疗效果。

[0583] 数据证明了类延长素可对抗衰老编程和炎症

[0584] ELV34将来自用IL1β治疗的糖尿病患者的人脂肪细胞中的TP53 mRNA水平降低至非糖尿病对照水平。IL1β是一种在脂肪细胞中诱导胰岛素抵抗的细胞因子18

[0585] 类似地，在糖尿病和非糖尿病脂肪细胞中，IL8被IL1β升高并被500nM ELV34降低了约40倍。尽管机制未知，但ELV34可以作为一种治疗剂来阻止或停止在糖尿病患者中观察到的破坏性信号传导。

[0586] ELV34恢复IL1β在人糖尿病脂肪细胞中的作用。A)实验设计。B)通过Taqman实时PCR方法，TP53和IL8在人糖尿病和非糖尿病脂肪细胞中的表达水平。

[0587] ELV34降低了糖尿病db/db小鼠下丘脑中IL1β诱导的IL6(SASP标志物)的水平，这表明下丘脑神经元和星形胶质细胞经历SP。在雌性和雄性小鼠中观察到不同的效果。

[0588] ELV34处理增加了脂联素的水平，脂联素是一种由脂肪细胞和促进胰岛素敏感性的其它组织(下丘脑)分泌的抗糖尿病全身激素。A)用ELV34处理的糖尿病下丘脑在女性和男性中显示出脂联素增加的趋势。B)ELV34在皮下脂肪组织(SAT)和内脏脂肪组织(VAT)中的不同作用。SAT和VAT具有不同的褐变能力19。

[0589] 方法

[0590] 具体目标1：测试以下预测：在通过TNFα、IL1β或其它诱导剂进行诱导后，类延长素在糖尿病患者的衰老编程激活中抵消人脂肪细胞。

[0591] 基本原理。TNFα在肥胖患者中循环，并在胰岛素抵抗发病机制中发挥重要作用20,21。此外，白细胞介素1β信号传导介导巨噬细胞对脂肪组织的影响18。循环性IL1β诱导脂肪组织功能的破坏22。不希望受理论束缚，全身性IL1β诱导人脂肪细胞衰老。暴露于细胞因子的脂肪细胞功能丧失可能包含细胞无法褐变。活跃的褐色/米色AT可塑性增加能量消耗，并与降低的高血糖和高脂血症有关；另一方面，它的萎缩和失活与肥胖症和衰老有关。因此，慢性缓慢发展的局部炎性病状会破坏内部信号的调节以及与HC的连接。此外，当脂肪细胞经历SP时，脂肪组织产生和分泌的其它激素(如脂联素)可能会减少。不希望受理论束缚，脂联素具有抗糖尿病和抗炎作用，它还具有胰岛素增敏剂的作用23。结果表明，类延长素34(ELV34)可以恢复糖尿病小鼠(db/db)和人糖尿病脂肪细胞的几种病理特征。基于这些结

果,我们可以停止人糖尿病脂肪细胞上的SP和SASP。

[0592] 实验设计。

[0593] 实验1:为了确定IL1β是否在脂肪细胞中诱导衰老,我们将1)测试衰老的标志物:p16、p21、p27、p53的表达和活性;2)测量暴露于IL1β和/或TNFα的糖尿病和非糖尿病患者的人脂肪细胞中的β-半乳糖苷酶活性和3)衰老相关分泌表型(SASP)。

[0594] 为了测试衰老标志物的表达,将来自糖尿病和非糖尿病患者的分化脂肪细胞暴露于IL1β和/或TNFα持续6天(加上和减去ELV34),收获并提取它们的RNA并用作模板以进行cDNA合成。p16、p21、p27和p53的表达水平将使用Taqman探针通过实时PCR进行评估。结果将通过以下管家基因的表达进行归一化:PPIA、GAPDH、β-肌动蛋白、B2M、TBP和TFRC。这些标志物的活性将通过蛋白质印迹分析来测量,以检测磷酸化和总蛋白质含量的增加。

[0595] β-半乳糖苷酶活性测定基于内源性溶酶体β-半乳糖苷酶在衰老细胞中的过度表达和积累24。与检测衰老标志物的表达类似,将人糖尿病和非糖尿病脂肪细胞暴露于IL1β和/或TNFα持续6天、9天和12天(加上和减去ELV34),然后使用β-半乳糖苷酶底物进行染色,当被内源性酶水解时,所述底物会产生荧光信号。将样品将通过两种方法成像:共聚焦显微镜和流式细胞术。

[0596] 第三部分包括确定衰老相关分泌表型。如本文所述,在存在或不存在EL34的情况下,脂肪细胞的衰老将被诱导,所得培养基将被收集、浓缩并通过蛋白质印迹或ELISA测定测试候选物。一些待测试的候选物是:IL-6、IL-7、IL-1α、-1β、IL-13、IL-15、IL-8、GRO-α、-β、-γ、MCP-2、MIP-1a、嗜酸性粒细胞趋化因子、嗜酸性粒细胞趋化因子-3、TECK、ENA-78、I-309和MMP-1、-3、-10、-12、-13、-14。

[0597] 实验2:为了评估SP和/或SASP对褐色和白色脂肪细胞含量的影响,将测试实验1中的细胞的1)褐色组织的标志物,如CD137、TMEM26(跨膜蛋白26)和TBX1(T-box 1),它们富含人类褐色脂肪(BAT)。还将使用蛋白质印迹在暴露于IL1β和/或TNFα的糖尿病和非糖尿病脂肪细胞中评估PGC-1α、PPARγ、C/EBPα和PRDM16,以确定它们的含量变化,并通过荧光素酶报告基因测定法测量它们的活性。然后将用ELV34处理经历SP和/或SASP的脂肪细胞,并测试本文所述的参数。

[0598] 实验3:评估暴露于IL1β和/或TNFα持续6天、9天和12天的糖尿病脂肪细胞合成和释放脂联素的能力。将通过实时PCR(图X)、蛋白质印迹分析测试用IL1β和/或TNFα处理的脂肪细胞的脂联素mRNA的表达,并将收集培养基并进行ELISA和/或蛋白质印迹分析。将使用本文所述的程序测试ELV34对脂联素产生的影响。

[0599] 不希望受理论束缚,我们将检测来自暴露于IL1β和/或TNFα的糖尿病患者的人脂肪细胞中的衰老和SASP,但不在非糖尿病脂肪细胞中检测。然而,当在过度表达细胞周期抑制剂(如p16或p21)的细胞中触发衰老样表型时,细胞会经历具有许多衰老细胞特性的生长停滞,而不是SASP 25。因此,不希望受理论束缚,在存在增加的p16或p21的情况下不会观察到SASP。

[0600] 不希望受理论束缚,衰老的糖尿病脂肪细胞将表现出较低的BAT标志物的表达;CD137、TMEM26(跨膜蛋白26)和TBX1(T-box 1)伴随着低活性的主要转录因子,负责在褐色脂肪细胞中观察到的遗传特征。

[0601] 与SP平行,并且不希望受理论束缚,将观察到糖尿病脂肪细胞中脂联素的表达和

分泌减少。

[0602] ELV34将停止培养物中的糖尿病脂肪细胞中的SP和SASP,并有利于细胞的褐变和AdipoQ的合成。

[0603] 具体目标2:验证遗传性糖尿病小鼠的HT会产生SP,其进而损害突触连接和神经元功能障碍。这得到了数据的支持,这些数据表明遗传性糖尿病小鼠的HC表现出扰乱的电生理活动(在我们新开发的Maestro系统中)。因此,除了评估治疗性类延长素的模型外,我们还有一个实验模型来验证本文描述的实施例和机制。

[0604] 基本原理。下丘脑的神经炎症导致神经元失调,所述神经元然后进入衰老,从而导致代谢综合征。

[0605] 实验设计。我们将用BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J糖尿病小鼠和对照C57BLKS/J评估我们的发现。将包含来自两种性别的样品。这种小鼠品系用于对II型糖尿病和肥胖症的I期至III期进行建模。我们将解剖这些动物的大脑并将其切片以分离下丘脑、海马体和皮层。每个器官切片将被设置在单独的孔中,所述孔中含有补充有B27的神经基础培养基。平板接种后48小时将向培养基补充500nM ELV,并且24小时后,将记录器官切片。将使用Axion BioSystems的Maestro多电极阵列(MEA)技术确定神经元活动。由于构成下丘脑的神经元的异质性,我们将通过添加50nM多巴胺和10μM荷包牡丹碱来验证我们正在测试的下丘脑神经元身份,这将指示存在对饱腹感和进食很重要的腹中层(VTM)和弓状核。比较有和没有ELV的对照和糖尿病小鼠下丘脑的神经元活动将为我们提供这种大脑结构的基线活动,并帮助我们评估神经元的功能。记录后,将检索下丘脑切片并提取总RNA。第一链cDNA将被逆转录,并检查参与衰老编程的基因的表达,以及胰岛素信号传导和敏感性以及葡萄糖代谢。候选物(p53、p21、p16ink4a和Bmi-1)的上调和下调将通过蛋白质印迹或毛细管蛋白质印迹进一步确认,以用于更大的一组目标。

[0606] 结果。糖尿病小鼠的HT的神经元活动对多巴胺和荷包牡丹碱的敏感性降低,这表明神经元出现故障。通过研究因果关系,将观察到与对照相比,糖尿病小鼠中SP和SASP的标志物上调。

[0607] 具体目标3:验证在糖尿病小鼠全身和/或鼻内施用时,测试类延长素的治疗效果。

[0608] 基本原理。施用途径通过改变药物必须跨越的生物屏障的数量或通过改变药物对泵送和代谢机制的暴露来影响生物利用度。我们将验证各种施用途径,包含静脉内和鼻内肺作为药物施用的有效途径。肺泡代表一个大的表面和一个最小的扩散障碍。肺还接收作为血流的总心输出量。因此,从肺部吸收可以非常迅速和完全。溶解在0.9%盐水(媒剂)中的类延长素是无刺激性的,并且从之前的实验中可以看出,其可以非常有效地通过鼻内递送。预期效果可以是全身性的。

[0609] 实验设计。我们将用BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J小鼠和对照C57BLKS/J评估我们的发现。这种小鼠品系用于对II型糖尿病和肥胖症的I期至III期进行建模。将包含来自两种性别的样品。所有动物实验都将按照路易斯安那州立大学健康科学中心颁发的经批准的IACUC协议进行。对轻度麻醉的小鼠进行鼻内施用。每只小鼠将被放置在无菌手术垫上并轻轻伸展以更好地固定颈背。牢牢握住颈背,将小鼠在其背面转动,同时仍让鼠标呼吸并保持舒适。颈部和下巴平坦并平行于垫子,将含有分散在0.9%盐水(媒剂)中的类延长素的移液器尖端以45度角放置在小鼠左鼻孔附近,并将约5μL药物施用至鼻孔,间隔2-3秒,总共10μ

L/鼻孔。将小鼠保持在该位置持续5秒或直到它恢复知觉，然后对另一个鼻孔重复施用步骤，总共20μL/小鼠。在小鼠接受所有的滴剂后，动物将被保持在其背部，直到材料消失在鼻孔中，然后将其放回笼子。4小时、24小时、48小时、72小时和120小时后处死小鼠。我们将收集内脏和皮下脂肪组织(VAT和SAT)以及大脑，以解剖下丘脑并创建器官切片。将VAT和SAT分离，并将脂肪细胞平板接种在6孔板中，解剖大脑以收集下丘脑、海马和大脑皮层。我们将使用组织测试针对特定目标1和2设计的实验中所解释的参数。

[0610] 结果。不希望受理论束缚，SP和SASP将在Leprdb/J小鼠的VAT、SAT和HT中停止。此外，用ELV-34鼻内治疗db/db小鼠将恢复这些小鼠的HT的自发电活动。此外，VAT和SAT将合成和释放脂联素，并恢复SP重新编程。

[0611] 结果

[0612] 1-为类延长素作为肥胖症和2型糖尿病的治疗剂奠定坚实的基础，尽管也有使用类延长素作为1型糖尿病治疗剂的案例。

[0613] 本文实例中引用的参考文献：

[0614] 1.Bhattacharjee S,Jun B,Belayev L等人“类延长素是一类新型的稳态脂质介质，可在损伤时保护神经细胞的完整性(Elovanoids are a novel class of homeostatic lipid mediators that protect neural cell integrity upon injury.)”《科学进展(Sci Adv.)》2017;3(9):e1700735.doi:10.1126/sciadv.1700735

[0615] 2.Jun B,Mukherjee PK,Asatryan A等人“类延长素是新型细胞特异性脂质介质，其对于光感受器细胞完整性的神经保护信号传导是必需的(Elovanoids are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity.)”《科技报告(Sci Rep.)》2017;7(1):5279.doi:10.1038/s41598-017-05433-7

[0616] 3.Do KV,Kautzmann M-AI,Jun B等人.“类延长素抵消寡聚β-淀粉样蛋白诱导的基因表达并保护光感受器(Elovanoids counteract oligomericβ-amyloid-induced gene expression and protect photoreceptors.)”《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci.)》2019;116(48):24317-24325.doi:10.1073/pnas.1912959116

[0617] 4.Musi N,Valentine JM,Sickora KR等人“Tau蛋白聚集与大脑中的细胞衰老有关(Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain.)”《衰老细胞(Aging Cell.)》2018;17(6).doi:10.1111/acel.12840

[0618] 5.Das MM,Svendsen CN.“在ALS啮齿动物模型中，随着衰老加速，星形胶质细胞对运动神经元的支持减少(Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS.)”《神经生物学老化(Neurobiol Aging.)》2015;36(2):1130-1139.doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.020

[0619] 6.Turnquist C,Horikawa I,Foran E等人“p53亚型调节星形胶质细胞介导的神经保护和神经变性(p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration.)”《细胞死亡与分化(Cell Death Differ.)》2016;23(9):1515-1528.doi:10.1038/cdd.2016.37

[0620] 7.Appel SH,Zhao W,Beers DR,Henkel JS.“ALS中的小胶质细胞-运动神经元对

话(The microglial-motoneuron dialogue in ALS.)”《地中海肌病学会杂志肌病学报-心肌疾病(Acta MyolMyopathies Cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol.)》2011;30(1):4-8。

[0621] 8.Komine O,Yamanaka K.“运动神经元病中的神经炎症(Neuroinflammation in motor neuron disease.)”《名古屋医学杂志(Nagoya J Med Sci.)》2015;77(4):537-549。

[0622] 9.Lunyak VV,Amaro-Ortiz A,Gaur M.“间充质干细胞分泌反应:衰老信息分泌组和免疫调节观点(Mesenchymal Stem Cells Secretory Responses:Senescence Messaging Secretome and Immunomodulation Perspective.)”《遗传学前沿(Front Genet.)》2017;8:220.doi:10.3389/fgene.2017.00220

[0623] 10.Bazan NG.“来自ω-3脂肪酸的二十二烷酸和类延长素是炎症反应、细胞损伤和神经保护的促稳态调节剂(Docosanoids and elovanoids from omega-3fatty acids are pro-homeostatic modulators of inflammatory responses,cell damage and neuroprotection.)”《医学的分子层面(Mol Aspects Med.)》2018;64:18-33.doi:10.1016/j.mam.2018.09.003

[0624] 11.Ogrodnik M,Zhu Y,Langhi LGP等人“肥胖引起的细胞衰老会导致焦虑并损害神经发生(Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis.)”《细胞代谢(Cell Metab.)》2019;29(5):1061-1077.e8.doi:10.1016/j.cmet.2018.12.008

[0625] 12.Bussian TJ,Aziz A,Meyer CF,Swenson BL,van Deursen JM,Baker DJ.“清除衰老的神经胶质细胞可防止tau依赖性病理学和认知能力下降(Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline.)”《自然(Nature.)》2018;562(7728):578-582.doi:10.1038/s41586-018-0543-y

[0626] 13.Justice JN,Nambiar AM,Tchkonia T等人“特发性肺纤维化中的Senolytics:来自首次人体、开放标签、试点研究的结果(Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis:Results from afirst-in-human,open-label,pilot study.)”《E生物医学(EBioMedicine.)》2019;40:554-563.doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.052

[0627] 14.Kirkland JL.《临床试验数据库(ClinicalTrials.gov)》[互联网].马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD):国家医学图书馆(美国).2018年9月18日-.标识符NCT03675724,“非瑟酮对老年人虚弱、炎症和相关措施的缓解作用(Alleviation by Fisetin of Frailty,Inflammation,and Related Measures in Older Adults.)”《临床试验数据库》https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03675724.发布于2018年12月28日。于2019年12月16日访问。

[0628] 15.Hickson LJ.《临床试验数据库(ClinicalTrials.gov)》[互联网].马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD):国家医学图书馆(美国).2016年7月28日-.标识符NCT02848131,“慢性肾脏病的衰老(Senescence in Chronic Kidney Disease.)”《临床试验数据库》https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02848131.发布于2019年11月8日。于2019年12月16日访问。

[0629] 16.Hickson LJ.《临床试验数据库(ClinicalTrials.gov)》[互联网].马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD):国家医学图书馆(美国).2017年10月30日-.标识符NCT03325322,

“糖尿病和慢性肾病中的炎症和干细胞(Inflammation and Stem Cells in Diabetic and Chronic Kidney Disease.)”《临床试验数据库》https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03325322.发布于2019年10月17日。于2019年12月16日访问。

[0630] 17.Hickson LJ.《临床试验数据库(ClinicalTrials.gov)》[互联网].马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD):国家医学图书馆(美国).2016年1月11日-.标识符NCT02652052,“造血干细胞移植幸存者研究(HTSS研究)(Hematopoietic Stem Cell Transplant Survivors Study(HTSS Study).)”《临床试验数据库》https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02652052.发布于2019年10月15日。于2019年12月16日访问。

[0631] 18.Bing C.“白细胞介素-1β是肥胖中巨噬细胞-脂肪细胞串扰的罪魁祸首吗?(Is interleukin-1βa culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?)”《脂肪细胞(Adipocyte.)》2015;4(2):149-152.doi:10.4161/21623945.2014.979661

[0632] 19.He P,Hou B,Li Y等人.“脂质分析通过Β3-肾上腺素能刺激揭示白色脂肪组织的褐变异质性(Lipid Profiling Reveals Browning Heterogeneity of White Adipose Tissue byΒ3-Adrenergic Stimulation.)”《生物分子(Biomolecules.)》2019;9(9):444.doi:10.3390/biom9090444

[0633] 20.Xu H,Uysal KT,Becherer JD,Arner P,Hotamisligil GS.“改变脂肪细胞中的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)加工和肥胖中跨膜TNF-α的表达增加(Altered Tumor Necrosis Factor-α(TNF-α)Processing in Adipocytes and Increased Expression of Transmembrane TNF-αin Obesity.)”《糖尿病(Diabetes.)》2002;51(6):1876.doi:10.2337/diabetes.51.6.1876

[0634] 21.Ruan H,Lodish HF.“脂肪组织中的胰岛素抵抗:肿瘤坏死因子-α的直接和间接作用(Insulin resistance in adipose tissue:direct and indirect effects of tumor necrosis factor-α.)”《细胞因子与生长因子综述(Cytokine Growth Factor Rev.)》2003;14(5):447-455.doi:10.1016/S1359-6101(03)00052-2

[0635] 22.Pellegrinelli V,Rouault C,Veyrie N,Clément K,Lacasa D.“内脏脂肪组织中的内皮细胞在三维环境中破坏脂肪细胞功能:血管生成素-1的部分拯救(Endothelial Cells From Visceral Adipose Tissue Disrupt Adipocyte Functions in a Three-Dimensional Setting:Partial Rescue by Angiopoietin-1.)”《糖尿病》2014;63(2):535.doi:10.2337/db13-0537

[0636] 23.Kadowaki T,Yamauchi T,Kubota N,Hara K,Ueki K,Tobe K.“胰岛素抵抗、糖尿病和代谢综合征中的脂联素和脂联素受体(Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance,diabetes,and the metabolic syndrome.)”《临床研究杂志(J Clin Invest.)》2006;116(7):1784-1792.doi:10.1172/JCI29126

[0637] 24.Lee BY,Han JA,Im JS等人.“衰老相关的β-半乳糖苷酶是溶酶体β-半乳糖苷酶(Senescence-associatedβ-galactosidase is lysosomalβ-galactosidase.)”《衰老细胞》2006;5(2):187-195.doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x

[0638] 25.CoppéJ-P,Desprez P-Y,Krtolica A,Campisi J.“衰老相关的分泌表型:肿瘤抑制的阴暗面(The senescence-associated secretory phenotype:the dark side of tumor suppression.)”《病理学年度回顾(Annu Rev Pathol.)》2010;5:99-118.doi:

10.1146/annurev-pathol-121808-102144

[0639] 实例12-类延长素抵消寡聚β-淀粉样蛋白诱导的基因表达并保护光感受器

[0640] 摘要

[0641] 神经退行性疾病的发作会激活炎症,所述炎症导致进行性神经元细胞死亡以及认知障碍(阿尔茨海默病,AD)和视力障碍(年龄相关性黄斑变性,AMD)。尚不清楚如何抵消神经炎症。在AMD中,淀粉样蛋白β-肽(Aβ)在视网膜下玻璃疣中积累。在5xFAD视网膜中,我们发现了早期功能缺失(ERG)而没有光感受器细胞(PRC)死亡,并鉴定了促稳态/神经保护介质、神经保护素D1(NPD1)和类延长素(ELV)的生物合成通路的早期不足。为了模拟野生型(WT)小鼠的炎症环境,我们通过视网膜下注射寡聚β-淀粉样蛋白(OAβ)触发了视网膜色素上皮(RPE)损伤/PRC死亡,并观察到ELV施用抵消了它们的作用,从而保护了这些细胞。此外,ELV阻止了OAβ诱导的与衰老、炎症、自噬、细胞外基质重塑和AMD相关的基因表达变化。此外,由于OAβ靶向RPE,我们使用原代人RPE细胞培养物并证明OAβ引起细胞损伤,而ELV保护和恢复小鼠中的基因表达。我们的数据显示OAβ激活衰老,这反映在p16INK4a、MMP1、p53、p21、p27和Il-6以及衰老相关分泌表型(SASP)分泌组的表达增强,随后产生RPE和PRC消亡,并且类延长素32和34减弱这些事件并引起保护。此外,ELV抵消了OAβ诱导的参与AMD、自噬和细胞外基质(ECM)重塑的基因表达。总体而言,我们的数据发现,ELV可淡化OAβ衰老程序诱导和炎症转录事件,并保护RPE细胞和PRC,因此可用作AMD的治疗途径。

[0642] 这个实例揭示了在转基因阿尔茨海默病5xFAD小鼠的早期病理学表达过程中,视网膜中的促稳态/神经保护介质、神经保护素D1和类延长素的生物合成通路不足。这些变化与丧失之前的光感受器细胞功能障碍有关。淀粉样蛋白β(Aβ)肽在AMD的玻璃疣中积累。因此,在视网膜后面的野生型小鼠中注射寡聚Aβ会导致光感受器细胞退化和基因表达中断,其可能包含衰老程序和SASP的上调。类似的变化发生在培养物中的人视网膜色素上皮细胞中。新的脂质介质类延长素可恢复Aβ肽诱导的基因表达变化和SASP分泌组,进而保护这些细胞。这项研究开辟了对AMD的类延长素治疗评估的途径。

[0643] 介绍

[0644] 神经炎症反应的发作涵盖旨在抵消脑和/或视网膜损伤的内源性介质的合成。神经保护素D1(NPD1),一种衍生自ω-3必需脂肪酸的二十二烷酸,通过阻止炎症起始并因此维持光感受器细胞(PRC)的完整性而具有神经保护作用(1),并且在早期阿尔茨海默病(AD)的海马体CA1区域中缺乏(2)。Aβ在AD中积累。在5xFAD视网膜中,Aβ也会积累,尽管AMD中的Aβ会引起运动稳态干扰,其可以包含炎症并导致PRC死亡(3、4),但尚不清楚如何限制Aβ介导的细胞损伤。在PRC中,极长链多不饱和脂肪酸(VLC-PUFA,C>28)由ELOVL4(极长链脂肪酸-4的延长)合成(5、6),并且是视紫红质功能所必需的(7)。ELOVL4基因的突变(5)导致3型斯特格氏(Stargardt)黄斑营养不良伴中心视力丧失。隐性ELOVL4突变也会导致癫痫发作、智力迟钝和痉挛性四肢瘫痪,这表明VLC-PUFA在大脑发育和生理学中的重要性(8)。一旦VLC-PUFA被并入到光感受器细胞外段的特定磷脂酰胆碱分子种类(PC)中,它们就会在每天的PRC圆盘脱落和吞噬作用后到达视网膜色素上皮(RPE)。具有32和34C的ELV通过磷脂酶A1在RPE细胞中由PC释放的VLCPUFA酶促合成(9、10)。这些新的脂质介质能够通过上调促稳态和促存活蛋白丰度来保护RPE细胞免受未补偿的氧化应激,同时减弱光感受器细胞(9、10)和神经元(11)中的细胞凋亡。

[0645] Aβ42是AMD玻璃疣和AD老年斑的一种组分(12、13)。在AMD中,Aβ有助于炎症、扰乱的RPE形态和功能以及PRC完整性(14、15)。5xFAD转基因小鼠携带与早发性家族性AD相关的突变,并且尽管它显示出一些非特异性变化,但它显示出PRC变性(16、17)。我们首先研究了5xFAD视网膜磷脂谱,以了解在5xFAD小鼠中表达PRC变性之前脂质介质前体的可用性。接下来,我们研究了在野生型(WT)小鼠中视网膜下施用寡聚Aβ(OAβ)(其是Aβ最具细胞毒性的形式之一)对RPE和PRC的影响,以及对参与衰老、自噬、AMD、细胞外基质(ECM)重塑和细胞凋亡的基因的表达的影响。此外,我们将培养物中的人RPE细胞暴露于OAβ并评估了类似的终点。最后,我们评估了类延长素是否会改变OAβ诱导的基因表达,包含衰老程序和衰老相关分泌表型(SASP),以进而保护RPE并维持光感受器细胞的完整性。

[0646] 结果

[0647] 5xFAD小鼠视网膜和RPE揭示了导致NPD1和ELV生物合成的通路中的缺陷。

[0648] 当被PLA2和PLA1切割时,磷脂酰胆碱的酰基链与DHA(在sn2处)和VLC-PUFA,n-3(在sn1处)分别导致NPD1和类延长素的合成(10)。为了确定这些PC在5xFAD视网膜和RPE中的可用性,进行了热图分析。在比较5xFAD与WT时,从这些分析中出现了两个PC聚类:短链(<48C)且饱和(<6个双键)(第1组)和一个不太丰富的聚类(第2组)(图52,图片A)。这意味着5xFAD视网膜中含有VLC-PUFA的PC相对较少。然而,主要组分分析(PCA)并未揭示任何明显的差异,因为5xFAD和WT小鼠的所有可区分的标志物都是含有短链的PC(图52,图片B和C)。因此,我们进行了随机森林分类,其标准是磷脂酰胆碱使用的时间越长,PC对5xFAD对WT变化的贡献就越大。结果,我们发现在含有VLC-PUFA的PC区域中高时间使用的PC密集分布(图52,图片D),这支持了热图分析观察。因此,PC分为三组:(i)含有DHA和VLC-PUFA的PC,(ii)含有DHA的PC,和(iii)含有AA的PC。PC的结构和m/z(图60)。5xFAD描绘了含有DHA和VLC-PUFA的PC,包含PC54:12、PC56:12和PC58:12(图52,图片E)和含有DHA的PC,包含PC36:8、PC38:8和PC44:12(图52,图片F)。相反,含有AA的PC,包含PC36:4、PC38:4和PC36:5,在5xFAD视网膜中增加(图52,图片G),这表明n-6/n-3的平衡(AA、DHA和VLC-PUFA)被改变。接下来,我们观察到PC中所含的DHA和VLC-PUFA在5xFAD视网膜中缺乏(图1A-G),这与RPE不同(图53)。PC38:6含量在5xFAD的RPE中较高(与视网膜对比-图2E),并且PC40:6在5xFAD和WT中相似(图2E)。然而,PC44:12在5xFAD RPE中与在视网膜中一样低。此外,PC的相对丰度在视网膜和RPE中有所不同。在视网膜中,含有VLC-PUFA的PC占总PC的3%,而这些PC在RPE中不到0.3%。同样,PC44:12在视网膜中为5%,并且在RPE中低于0.5%。因此,含有DHA和VLC-PUFA的PC在光感受器细胞中比RPE更丰富。尽管这些PC在RPE中的贡献很小,但我们的结果清楚地揭示了5xFAD RPE中缺乏含有VLC-PUFA的PC。

[0649] 类延长素由储存在PC54-12和PC56-12中的VLC-PUFA产生,在5xFAD视网膜和RPE中以有限的量存在(图1和2)。我们发现,32:6n-3和34:6n-3的空闲池(free pool)大小增加,这分别反映了PC54-12和PC56-12的sn-1位置的释放。我们接下来探索随后的脂氧合酶催化的酶促环氧化以形成环氧化物中间体,然后是水解酶催化的酶促水解,从而导致二羟基化的ELV-N-32或ELV-N-34的合成,其具有Z、E、E三烯部分(图54,图片A)。因此,15-脂氧合酶-1在5xFAD RPE中的表达低于WT,而在视网膜中,两种基因型之间没有差异(图54,图片C和D),这与NPD1丰度一致,即在5xFAD RPE中较低并且在视网膜中没有变化(图54,图片B)。另一方面,ELOVL4是一种延长EPA或DHA的酶,其仅在PRC中表达,并且在5xFAD中较低,这与32:6n-3

和34:6n-3的较小池大小以及类延长素氢过氧化物前体的单羟基稳定衍生物相关(图54,图片B-D)。因此,在5xFAD视网膜病理学发展的早期,视网膜和RPE中的脂质以及参与ELV和NPD1通路的两种酶的表达明显降低。

[0650] 5xFAD中PRC丧失之前的早期视网膜功能异常。

[0651] 6个月大的5xFAD小鼠的b波ERG分析公开了视觉敏感性的丧失(图55,图片A)。然而,视网膜超微结构、RPE细胞/布鲁赫膜界面、圆盘合成的外段基底区域、外界膜(OLM)的完整性、伸长的内段线粒体(无裂变剖面)以及RPE的PRC尖端释放和吞噬作用(图55,图片B)显示没有异常。此外,组织学未显示5xFAD的PRC丧失(图55,图片C)。另一方面,免疫荧光显微术显示,在5xFAD中,Aβ主要在RPE下的视网膜中积累,如在玻璃疣的AMD表型中一样(图55,图片D)。

[0652] ELV保护RPE和PRC免受OAβ诱导的毒性。

[0653] 由于促稳态通路的早期缺陷导致5xFAD视网膜中的类延长素和随后的视网膜变性,我们接下来询问ELV是否可以防止OAβ的影响,所述OAβ是一种最具细胞毒性的Aβ肽(18)。视网膜下注射OAβ的六个月大的WT小鼠表现出PRC变性(图56,图片A、C)。描绘了眼底(左侧)和相应的光学相干断层扫描(OCT)(右侧)图像。PRC层经历了细胞丧失,从未注射视网膜的105μm厚度到OAβ注射视网膜的35μm。未注射、注射PBS和注射ELV-32、ELV-34的小鼠不产生PRC变性(图56,图片C、D)。平装RPE的ZO-1染色揭示了寡聚β-淀粉样蛋白破坏紧密连接并引发细胞损伤。我们将ELV32或ELV34与OAβ共同注射,然后在7天内局部应用类延长素(图56,图片A),从而恢复RPE形态(图56,图片B)并保护PRC(图56,图片C和D)。由于视网膜下注射后的机械应力,单独注射PBS或ELV的小鼠显示出ONL的小幅降低(图56,图片C和D)。这些结果表明,类延长素保持了PRC的完整性,这表明这些脂质介质能够抵抗由OAβ毒性持续的细胞损伤。

[0654] ELV可抵消RPE中OAβ诱导的衰老、自噬、AMD和ECM重塑基因表达中断和视网膜中的凋亡基因表达。为了寻找ELV保护免受OAβ介导的损伤所涉及的机制,对分离的RPE和视网膜进行了定量PCR(qPCR)。我们选择在RPE注射后第3天调查参与衰老(19、20)、自噬(21)、AMD(22、23)和ECM重塑(24)的基因(图56,图片E-G)。此外,我们探索了视网膜中的细胞死亡相关基因Bax、Bad、Casp3、Dapk1和Fas(图>56,图片I)。OAβ介导的衰老、自噬、AMD和一些ECM重塑基因表达的上调被类延长素抵消(图56)。某些基质金属蛋白酶(1b、10、14和7)不受OAβ的影响。此外,在RPE中,关键衰老p16INK4a的蛋白质丰度(图56,图片H)与其基因表达相关(图56,图片E)。

[0655] ELV保护人RPE细胞免受OAβ诱导的衰老和其它基因转录中断。

[0656] 由于5xFAD小鼠在Aβ积累时显示出RPE紧密连接破坏(16),我们使用用OAβ攻击的培养物中的原代人RPE细胞来评估损伤并评估ELV-N-32或ELV-N-34保护(图57,图片A)。孵育7天后,寡聚β-淀粉样蛋白改变了RPE细胞形态并激活了SASP,如通过SA-β-Gal染色所示(图57,图片B和C),并增强了一组衰老基因(图57,图片E)、AMD、基质金属蛋白酶和自噬相关基因的表达(图57,图片D)。有趣的是,一些基质金属蛋白酶受到影响,但并非全部在RPE细胞中表达。在其它细胞中,SASP主要是促炎性的,并且已显示包括趋化因子、金属蛋白酶、蛋白酶、细胞因子(例如,TNF-α、IL-6和IL-8)和胰岛素样生长因子结合蛋白。所研究的衰老基因是P16 INK4a(Cdkn2a)、p21CIP1(Cdkn1A)、p27 KIP(Cdkn1B)、p53(Tp53或TRP53)、IL6和

MMP1。ELV-N-32和ELV-N-34恢复了这些效果(图57,图片B-D。

[0657] 讨论AMD和阿尔茨海默病分别显示Aβ在视网膜和大脑中的积累。基于Aβ的抗体以及针对AD的抗炎疗法在很大程度上不成功,因此需要了解机制并鉴定限制Aβ神经毒性的特定药物(25-28)。RPE维持PRC的完整性,并且其功能障碍在包含AMD在内的视网膜退行性疾病中引发PRC死亡。在这里,我们显示,0aβ在啮齿动物体内和原代人RPE细胞培养物中驱动RPE和PRC病理学。在5xFAD PRC变性的发病机制早期,我们报告了用于NPD1和ELV生物合成的前体和通路中的缺陷。这些缺陷先于ECM和PRC损伤的组织学迹象,而ERG已经显示出损伤。这些发现揭示了在发病和早期疾病进展期间关键的促稳态脂质信号传导的前驱变化。除了用作生物标志物外,它们还可以作为AMD的治疗靶标进行探索。

[0658] 在遗传动物模型中没有明确的证据表明阻断Aβ形成会导致AMD病理学减少。然而,有研究旨在通过实验抑制眼睛中的Aβ以保护PRC。例如,Liu等人表明,10个月的Aβ疫苗接种可抑制视网膜沉积,但会导致AD转基因小鼠中以小胶质细胞浸润和星形胶质细胞增生为特征的视网膜淀粉样血管病(29)。这样做的一个缺点是,主动免疫会导致严重的副作用。

[0659] 尚不清楚有多少AD患者发展为AMD,反之亦然。然而,除了AMD之外,AD与眼部疾病之间存在相关性,包含青光眼和对糖尿病视网膜病变的易感性(30)。不断演变的关键信号传导疾病机制可以包含CFH、APOE(31-33)和基质金属蛋白酶通路(34)。我们的数据显示,小鼠视网膜下OAβ注射会在7天后引发RPE细胞损伤和PRC丧失。为了测试Aβ对RPE的有害影响的可靠性,我们使用了原代培养物中的人RPE细胞,并表明它会引起与体内啮齿动物相似的损伤。此外,在体内的啮齿动物模型和体外的人类细胞中,基因表达谱的变化都是相似的。Aβ合成发生在RPE中(35-38)并在玻璃疣中积累,很明显,淀粉样前体蛋白加工功能障碍也会导致肽在视网膜内积累,也与神经节细胞相邻,到达内核层(39-41),并且其合成、丰度、分泌和聚集以年龄依赖性方式增加(39)。我们的Aβ视网膜下注射在此概括了与靶向RPE的AMD的病理学相关的一些情况。

[0660] 在野生型小鼠体内OAβ诱导的RPE和光感受器细胞死亡被类延长素抵消的这一发现揭示了这些来自ω-3脂肪酸的特定下游介质的额外生物活性。从机制上讲,神经炎症的破坏参与AMD病理学的早期阶段,并且一些研究使用具有ω-3脂肪酸的膳食补充剂(42-46),由于这些关键脂肪酸向PRC供应并且突触涉及复杂的步骤(其可以包含肠道、肝脏、血流运输、细胞摄取等),因此并没有产生明显的益处(47、48)。AMD的合理治疗方法是使用来自具有神经保护生物活性的ω-3脂肪酸的介质。

[0661] 该研究将ELV 32和34鉴定为OAβ诱发的衰老的下调介质,如通过SASP和RPE中衰老相关基因的表达所示。在这些条件下,自噬相关和AMD相关基因(包含人补体因子(49)和细胞外基质基因)的上调表达也被类延长素有益地靶向。因此,低聚β-淀粉样蛋白在培养物中的RPE细胞中以及在体内RPE和PRC中引起的效应的相似性,包含ELV靶向保护,表明与人类视网膜相关。令人惊讶的是,我们观察到OAβ注射在光感受器细胞中引起凋亡相关的细胞死亡信号传导而不是衰老。然而,重要的是要注意,类延长素防止了RPE中OAβ诱导的衰老和OAβ诱导的PRC细胞凋亡。

[0662] 总之,我们发现了5xFAD小鼠在PRC死亡之前的稳态前通路早期缺陷,其通过RPE(例如,含有VLC-PUFA的那些)和视网膜(含有DHA和VLCPUFA的那些)中PC分子种类的丰度降低突出显示。此外,发现游离VLC-PUFA以及前体27-和29-单羟基的稳定衍生物以及ELV-32

和ELV-34的稳定衍生物的池大小分别被耗尽。此外，视网膜显示出用于合成稳态前/神经保护NPD1和ELV的通路的关键酶缺乏，而没有明显的PRC损伤或丧失，但显示出功能障碍。类延长素抵消了在WT小鼠中视网膜下施用的OAβ的细胞毒性，从而导致RPE紧密连接破坏，随后PRC细胞死亡。我们的数据显示，OAβ激活衰老程序，这反映在p16INK4a、MMP1、p53、p21、p27、I1-6、MMP1和SASP分泌蛋白组的基因表达增强，随后产生RPE和PRC消亡，并且ELV-N-32和ELV-N-34减弱这些事件并引发对两种细胞的保护。RPE细胞是终末分化的，并且起源于神经上皮。在这方面，老年小鼠和AD模型(50)和星形胶质细胞(51,52)中的衰老神经元也表达衰老并产生分泌性SASP，所述分泌性SASP促进附近细胞中的神经炎症(53-55)。我们的研究表明，SASP神经毒性作用可以靶向邻近细胞，从而诱导光感受器旁分泌衰老。因此，来自RPE细胞的SASP可能是自分泌和旁分泌的，从而改变了光感受器间基质微环境的稳态并产生炎症环境，导致与衰老相关的功能丧失(56)、与年龄相关的病理学(56)和AMD。此外，ELV恢复了OAβ处理所改变的ECM重塑基质金属蛋白酶的表达，这表明光感受器间基质存在额外的干扰。引发的炎症可能是一种低度、无菌、慢性的促炎病状，类似于发炎，其也与免疫系统的衰老有关(56、57)。此外，类延长素抵消了OAβ诱导的参与AMD和自噬的基因的表达。不希望受理论束缚，类延长素靶向基因转录事件(图58)以告知新的统一调节机制，以维持衰老和神经退行性疾病期间的健康跨度(56、58)。尽管需要进一步研究，但总体而言，我们的结果表明，ELV是AMD的一种探索治疗途径。

[0663] 材料和方法

[0664] 材料和方法。这些信息可以包含动物、脂质提取和基于LC-MS/MS的脂质组学分析、原代人RPE培养、Aβ(1-42)寡聚化、SA-β-Gal染色、蛋白质提取和蛋白质印迹分析、RNA分离和定量PCR分析、免疫荧光和共聚焦显微镜以及统计。

[0665] 此实例中引用的参考文献

[0666] 1.N.G.Bazan,“细胞存活很重要:二十二碳六烯酸信号传导、神经保护和光感受器(Cell survival matters:docosahexaenoic acid signaling,neuroprotection and photoreceptors.)”《神经科学的趋势(Trends Neurosci.)》29,263-271(2006)。

[0667] 2.W.J.Lukiw等人,“二十二碳六烯酸衍生的神经保护素D1在神经细胞存活和阿尔茨海默病中的作用(A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease.)”《临床研究杂志》115,2774-2783(2005)。

[0668] 3.L.V.Johnson等人,“阿尔茨海默病Aβ肽沉积在与衰老和年龄相关性黄斑变性相关的病理沉积物中的补体激活位点(The Alzheimer's A beta-peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration.)”《美国国家科学院院刊》99,11830-11835(2002)。

[0669] 4.D.H.Anderson等人,“玻璃疣中β淀粉样蛋白组装体的表征:与衰老和年龄相关性黄斑变性相关的沉积物(Characterization of beta amyloid assemblies in drusen:the deposits associated with aging and age-related macular degeneration.)”《实验性眼睛研究(Exp.Eye Res.)》78,243-256(2004)。

[0670] 5.M.-P.Agbaga等人,“斯特格氏-3黄斑营养不良蛋白(ELOVL4)在极长链脂肪酸生

物合成中的作用(Role of Stargardt-3macular dystrophy protein(ELOVL4)in the biosynthesis of very long chain fatty acids.)”《美国国家科学院院刊》105,12843-12848(2008)。

[0671] 6.R.Harkewicz等人,“ELOVL4蛋白在极长链脂肪酸合成和视网膜功能中的重要作用(Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function.)”《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》287,11469-11480(2012)。

[0672] 7.M.I.Aveldaño,“用已烷提取光感受器膜后,含有长和极长的多烯脂肪酸的磷脂种类与视紫红质一起保留(Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes.)”《生物化学(Biochemistry)》27,1229-1239(1988)。

[0673] 8.M.A.Aldahmesh等人,“ELOVL4的隐性突变导致鱼鳞病、智力障碍和痉挛性四肢瘫痪(Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis,intellectual disability, and spastic quadriplegia.)”《美国人类遗传学杂志(Am.J.Hum.Genet.)》89,745-750(2011)。

[0674] 9.B.Jun等人,“类延长素是新型细胞特异性脂质介质,其对于光感受器细胞完整性的神经保护信号传导是必需的”《科学报告》7,5279(2017)。

[0675] 10.N.G.Bazan,“来自ω-3脂肪酸的二十二烷酸和类延长素是炎症反应、细胞损伤和神经保护的促稳态调节剂”《医学的分子层面》64,18-33(2018)。

[0676] 11.S.Bhattacharjee等人,“类延长素是一类新型的稳态脂质介质,可在损伤时保护神经细胞的完整性”《科学进步(Science Advances)》3,e1700735(2017)。

[0677] 12.T.Dentchev,A.H.Milam,V.M.-Y.Lee,J.Q.Trojanowski,J.L.Dunaief,“β-淀粉样蛋白存在于一些年龄相关性黄斑变性视网膜的玻璃疣中,但在正常视网膜的玻璃疣中没有(Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas,but not in drusen from normal retinas.)”《分子视觉(Mol.Vis.)》9,184-190(2003)。

[0678] 13.M.T.Heneka等人,“阿尔茨海默病中的神经炎症(Neuroinflammation in Alzheimer'sdisease.)”《柳叶刀神经病学(Lancet Neurol)》14,388-405(2015)。

[0679] 14.T.Prasad等人,“通过AAV介导的基因转移在视网膜色素上皮细胞中过度表达淀粉样蛋白β肽模拟小鼠中的AMD样病理学(Amyloidβpeptides overexpression in retinal pigment epithelial cells via AAV-mediated gene transfer mimics AMD-like pathology in mice.)”《科技报告》7,3222(2017)。

[0680] 15.K.H.Kurji等人,“微阵列分析确定了炎症基因表达的变化,以响应培养的人视网膜色素上皮细胞的淀粉样蛋白-β刺激(Microarray analysis identifies changes in inflammatory gene expression in response to amyloid-beta stimulation of cultured human retinal pigment epithelial cells.)”《眼科学研究与视力学(Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.)》51,1151-1163(2010)。

[0681] 16.S.W.Park等人,“老年5XFAD小鼠的干性年龄相关性黄斑变性样病理学:超微结构和微阵列分析(Dry age-related macular degeneration like pathology in aged 5XFAD mice:Ultrastructure and microarray analysis.)”《肿瘤靶标(Oncotarget)》8,

40006-40018(2017)。

[0682] 17.C.Criscuolo等人,“5xFAD小鼠模型研究后,视网膜作为阿尔茨海默病早期功能障碍的窗口(The retina as a window to early dysfunctions of Alzheimer’s disease following studies with a 5xFAD mouse model.)”《神经生物学老化》67,181-188(2018)。

[0683] 18.B.A.Yankner,T.Lu,“β-淀粉样蛋白毒性和阿尔茨海默病的发病机制(Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease.)”《生物化学杂志》284,4755-4759(2009)。

[0684] 19.R.Salama,M.Sadaie,M.Hoare,M.Narita,“细胞衰老及其效应程序(Cellular senescence and its effector programs.)”《基因与发育(Genes Dev.)》28,99-114(2014)。

[0685] 20.P.Zhang等人,“Senolytic疗法减轻阿尔茨海默病模型中Aβ相关的少突胶质祖细胞衰老和认知缺陷(Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer’s disease model.)”《自然神经科学(Nat.Neurosci.)》22,719-728(2019)。

[0686] 21.S.K.Mitter等人,“RPE中失调的自噬与氧化应激和AMD的易感性增加有关(Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD.)”《自噬(Autophagy)》10,1989-2005(2014)。

[0687] 22.C.B.Toomey,L.V.Johnson,C.Bowes Rickman,“AMD中的补体因子H:桥接遗传关联和病理学(Complement factor H in AMD:Bridging genetic associations and pathobiology.)”《视网膜与眼科研究进展(Prog Retin Eye Res)》62,38-57(2018)。

[0688] 23.M.M.DeAngelis等人,“年龄相关性黄斑变性(AMD)的遗传学(Genetics of age-related macular degeneration(AMD).)”《人类分子遗传学(Hum.Mol.Genet.)》26,R45-R50(2017)。

[0689] 24.B.Budiene等人,“基质金属蛋白酶多态性与白细胞介素在晚期老年性黄斑变性中的关系(The association of matrix metalloproteinases polymorphisms and interleukins in advanced age-related macular degeneration.)”《眼科遗传学(Ophthalmic Genet.)》39,463-472(2018)。

[0690] 25.F.Panza,M.Lozupone,G.Logroscino,B.P.Imbimbo,“对淀粉样蛋白-β靶向治疗阿尔茨海默病的批判性评价(A critical appraisal of amyloid-β-targeting therapies for Alzheimer disease.)”《自然综述:神经病学(Nat Rev Neurol)》15,73-88(2019)。

[0691] 26.P.L.McGeer,E.G.McGeer,“阿尔茨海默病的淀粉样蛋白级联炎症假说:对治疗的影响(The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease:implications for therapy.)”《神经病理学学报(Acta Neuropathol.)》126,479-497(2013)。

[0692] 27.A.C.Cuello,“阿尔茨海默病的早期和晚期中枢神经系统炎症:连续体的两个极端?(Early and Late CNS Inflammation in Alzheimer’s Disease:Two Extremes of

a Continuum?)”《药理学的发展趋势(Trends Pharmacol.Sci.)》38,956-966(2017)。

[0693] 28.A.Crane等人,“阿尔茨海默病中外周补体与淀粉样蛋白β肽的相互作用:2.与β淀粉样蛋白免疫疗法的关系(Peripheral complement interactions with amyloidβ peptide in Alzheimer’s disease:2.Relationship to amyloidβimmunotherapy.)”《阿尔茨海默病与痴呆(Alzheimers Dement)》14,243-252(2018)。

[0694] 29.B.Liu等人,“淀粉样肽疫苗可减少β-淀粉样蛋白斑块,但会加剧阿尔茨海默病转基因小鼠视网膜中的血管沉积和炎症(Amyloid-peptide vaccinations reduce{beta}-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer’s transgenic mice.)”《美国病理学杂志(Am.J Pathol.)》175,2099-2110(2009)。

[0695] 30.C.S.Lee等人,“近期和既定眼科疾病与阿尔茨海默病风险之间的关联(Associations between recent and established ophthalmic conditions and risk of Alzheimer’s disease.)”《阿尔茨海默病与痴呆》15,34-41(2019)。

[0696] 31.L.Biscetti等人,“阿尔茨海默病与黄斑变性的关联(Associations of Alzheimer’s disease with macular degeneration.)”《生物科学前沿(Front Biosci)》(Elite编辑)9,174-191(2017)。

[0697] 32.M.A.Williams等人,“阿尔茨海默病中与年龄相关的黄斑变性相关基因(Age-Related Macular Degeneration-Associated Genes in Alzheimer Disease.)”《美国老年精神病学杂志(Am JGeriatr Psychiatry)》23,1290-1296(2015)。

[0698] 33.S.Frost等人,“阿尔茨海默病和年龄相关性黄斑变性的早期迹象(Alzheimer’s Disease and the Early Signs of Age-Related Macular Degeneration.)”《阿尔茨海默病研究现状(Curr Alzheimer Res)》13,1259-1266(2016)。

[0699] 34.A.A.Hussain,Y.Lee,J.-J.Zhang,P.T.Francis,J.Marshall,“年龄相关性黄斑变性和阿尔茨海默病中的基质金属蛋白酶通路紊乱(Disturbed Matrix Metalloproteinase Pathway in Both Age-Related Macular Degeneration and Alzheimer’s Disease.)”《神经变性疾病杂志(JNeurodegener Dis)》2017,4810232(2017)。

[0700] 35.S.A.Lynn等人,“年龄相关性黄斑变性背后的复杂性:β淀粉样蛋白会发挥重要作用吗?(The complexities underlying age-related macular degeneration:could amyloid beta play an important role?)”《神经再生研究(Neural Regen Res)》12,538-548(2017)。

[0701] 36.J.A.Ratnayaka,L.C.Serpell,A.J.Lotery,“眼睛痴呆:β淀粉样蛋白在视网膜变性中的作用(Dementia of the eye:the role of amyloid beta in retinal degeneration.)”《眼睛(Eye)》(Lond)29,1013-1026(2015)。

[0702] 37.T.Yoshida等人,“β淀粉样蛋白在年龄相关性黄斑变性发病机制中的潜在作用(The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration.)”《临床研究杂志》115,2793-2800(2005)。

[0703] 38.J.Wang,K.Ohno-Matsui,I.Morita,“衰老的视网膜色素上皮中β-淀粉样蛋白的产生升高,这是年龄相关性黄斑变性中β-淀粉样蛋白视网膜下沉积的可能机制

(Elevated amyloidβproduction in senescent retinal pigment epithelium,a possible mechanism of subretinal deposition of amyloidβin agerelated macular degeneration.)”《生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Commun.)》423,73-78(2012)。

[0704] 39.J.Wang等人,“β-淀粉样蛋白肽42在大鼠视网膜神经节细胞中的发育和表达(Development and expression of amyloid-βpeptide 42in retinal ganglion cells in rats.)”《解剖学记录(Anat Rec)》(Hoboken)294,1401-1405(2011)。

[0705] 40.R.M.Dutescu等人,“阿尔茨海默病小鼠模型中的淀粉样前体蛋白加工和视网膜病理学(Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of Alzheimer’sdisease.)”《格雷夫斯临床和实验眼科档案(Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.)》247,1213-1221(2009)。

[0706] 41.J.Hoh Kam,E.Lenassi,G.Jeffery,“查看衰老的眼睛:衰老小鼠视网膜中β淀粉样蛋白积累的不同部位和巨噬细胞的上调(Viewing ageing eyes:diverse sites of amyloid Beta accumulation in the ageing mouse retina and the up-regulation of macrophages.)”《公共科学图书馆期刊(PloS ONE)》5(2010)。

[0707] 42.M.Fiala,G.Kooij,K.Wagner,B.Hammock,M.Pellegrini,“ω-3脂肪酸对阿尔茨海默病患者先天免疫的调节作用(Modulation of innate immunity of patients with Alzheimer’s disease by omega-3fatty acids.)”《美国实验生物学会联合会杂志(FASEB J.)》31,3229-3239(2017)。

[0708] 43.F.La Rosa等人,“阿尔茨海默病和ω-3中的肠脑轴:临床试验的重要概述(The Gut-Brain Axis in Alzheimer’s Disease and Omega-3.A Critical Overview of Clinical Trials.)”《营养学(Nutrients)》10(2018)。

[0709] 44.N.M.D’Cunha等人,“长期使用营养保健品和膳食补充剂对老年人认知的影响:对随机对照试验的10年系统评价(Effect of long-term nutraceutical and dietary supplement use on cognition in the elderly:a 10-year systematic review of randomised controlled trials.)”《英国营养学杂志(Br.J.Nutr.)》119,280-298(2018)。

[0710] 45.M.Belkouch等人,“ω-3二十二碳六烯酸对阿尔茨海默病特征的多效性影响(The pleiotropic effects of omega-3docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer’s disease.)”《营养生物化学杂志(J.Nutr.Biochem.)》38,1-11(2016)。

[0711] 46.J.G.Devassy,S.Leng,M.Gabbs,M.Monirujjaman,H.M.Aukema,“ω-3多不饱和脂肪酸和羟脂在神经炎症和阿尔茨海默病管理中的作用(Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins in Neuroinflammation and Management of Alzheimer Disease.)”《营养学进展(Adv Nutr)》7,905-916(2016)。

[0712] 47.N.G.Bazan,M.F.Molina,W.C.Gordon,“营养素中的二十二碳六烯酸信号脂质组学:在衰老、神经炎症、黄斑变性、阿尔茨海默氏症和其他神经退行性疾病中具有重要意义(Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition:significance in aging, neuroinflammation,macular degeneration,Alzheimer’s,and other neurodegenerative diseases.)”《营养学年度回顾(Annu.Rev.Nutr.)》31,321-351(2011)。

[0713] 48.D.S.Rice等人,“脂联素受体1保护二十二碳六烯酸并促进光感受器细胞存活(Adiponectin receptor 1conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival.)”《自然通讯(Nature Communications)》6,6228(2015)。

[0714] 49.M.Landowski等人,“人补体因子H Y402H多态性导致小鼠年龄相关性黄斑变性表型和脂蛋白失调(Human complement factor H Y402H polymorphism causes an agerelated macular degeneration phenotype and lipoprotein dysregulation in mice.)”《美国国家科学院院刊》116,3703-3711(2019)。

[0715] 50.N.Musi等人,“Tau蛋白聚集与大脑中的细胞衰老有关”《衰老细胞》17(2018)。

[0716] 51.M.M.Das,C.N.Svendsen,“在ALS啮齿动物模型中,随着衰老加速,星形胶质细胞对运动神经元的支持减少”《神经生物学老化》36,1130-1139(2015)。

[0717] 52.C.Turnquist等人,“p53亚型调节星形胶质细胞介导的神经保护和神经变性”《细胞死亡与分化》23,1515-1528(2016)。

[0718] 53.S.H.Appel,W.Zhao,D.R.Beers,J.S.Henkel,“ALS中的小胶质细胞-运动神经元对话”《肌病学报(Acta Myol)》30,4-8(2011)。

[0719] 54.O.Komine,K.Yamanaka,“运动神经元病中的神经炎症(Neuroinflammation in motor neuron disease.)”《名古屋医学杂志》77,537-549(2015)。

[0720] 55.V.V.Lunyak,A.Amaro-Ortiz,M.Gaur,“间充质干细胞分泌反应:衰老信息分泌组和免疫调节观点”《遗传学前沿》8,220(2017)。

[0721] 56.J.Campisi等人,“从衰老研究的发现到健康衰老的疗法(From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing.)”《自然》571,183-192(2019)。

[0722] 57.S.He,N.E.Sharpless,“健康与疾病的衰老(Senescence in Health and Disease.)”《细胞》169,1000-1011(2017)。58.D.J.Baker等人,“自然产生的p16(Ink4a)阳性细胞缩短健康寿命(Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan.)”《自然》530,184-189(2016)。

[0723] 材料和方法

[0724] 动物

[0725] 所有动物实验均根据ARVO眼科和视觉研究中动物使用声明进行,并且该协议已获得LSU健康新奥尔良机构动物护理和使用委员会(IACUC)的批准。6个月大的5xFAD小鼠(库存号:34848-JAX,美国缅因州巴港的杰克森实验室(The Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME,USA))在神经元特异性小鼠Thy1启动子的转录控制下共同过表达人淀粉样前体蛋白的FAD突变形式(瑞典突变:K670N、M671L;佛罗里达突变:I716V;和伦敦突变:V717I)和早老素1(PS1,由Psen1编码:M146L,L286V)转基因。5xFAD小鼠是转基因和非转基因WT同窝小鼠的半合子。通过尾部DNA的PCR进行基因分型。所有的分析都是对小鼠基因型盲目进行的。对于视网膜下注射,通过腹腔注射氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉6个月大的C57BL/6J小鼠,用1.0%托品胺(美国伊利诺伊州的Akorn公司)扩张瞳孔;并用0.5%盐酸丙美卡因(Akorn)进行表面麻醉。在不干扰晶状体的情况下,用30号针头在角膜巩膜交界处和锯缘部之间将眼睛刺入玻璃体腔。在解剖显微镜下,使用连接到5μl Hamilton注射器(美国内华达州里诺的汉密尔顿公司(Hamilton Company,Reno,NV,USA))的33号钝针将化合物递送至视网膜下区

域。未注射的小鼠用作阴性对照，而注射了PBS的小鼠用于假手术。注射量为2μl含PBS、10μM OAβ、10μM OAβ+200ng ELV-N-32、单独200ng ELV-N-32、10μM OAβ+200ng ELV-N-34或单独200ng ELV-N-34(n＝12/组)。所有组均接受局部滴剂：仅PBS或ELV-N-32(200nM)或ELV-N-34(200nM)，每天两次，持续3或7天。

[0726] 脂质提取和基于LC-MS/MS的脂质组学分析

[0727] 将视网膜或RPE/脉络膜在3ml MeOH中均质化，然后加入6ml CHCl3和5μl氘标记脂质的内标混合物(AA-d8(5ng/μl)、PGD2-d4(1ng/μl)、EPA-d5(1ng/μl)、15-HETE-d8(1ng/μl)和LTB4-d4(1ng/μl))。将样品超声处理30分钟并在-80℃下储存过夜。然后收集上清液，将沉淀物用1ml CHCl3/MeOH(2:1)洗涤并离心，合并上清液。向上清液中加入2ml pH 3.5的蒸馏水，涡旋并离心，然后用0.1N HCl将上相的pH调节至3.5-4.0。将下相在N2下干燥，然后重新悬浮在1ml MeOH中。在配备有带有流通针的Acquity I级UPLC的Xevo TQ中进行LC-MS/MS分析(美国马萨诸塞州米尔福德的Waters公司(Waters,Milford,MA,USA))。对于PC和PE分子种类分析，将样品在N2下干燥，然后重新悬浮在20μl样品溶剂(乙腈/氯仿/甲醇，体积比为90:5:5)中。将Acquity UPLC BEH HILIC 1.7-μm,2.1×100-mm色谱柱与溶剂A(乙腈/水，1:1;10mM乙酸铵，pH 8.3)和溶剂B(乙腈/水，95:5;10mM乙酸铵，pH 8.3)的混合物一起使用，作为流动相(0.5毫升/分钟)。将溶剂B(100％)在前5分钟等度运行，然后以溶剂A的20％的梯度运行8分钟，增加到溶剂A的65％持续0.5分钟，在溶剂A的65％下等度运行3分钟，然后回到100％的溶剂B持续3.5分钟，以进行平衡。柱温设置为30℃。将每种PC和PE种类的量计算为总PC和PE/样品的百分比。为了分析脂肪酸及其衍生物，如本文所述将六个视网膜或六个RPE/脉络膜混合并匀浆。将样品(在1ml MeOH中)与9ml H2O在pH 3.5下混合，负载到C18柱(美国加利福尼亚州圣克拉拉的Agilent公司(Agilent,Santa Clara,CA,USA))上，然后用10ml甲酸甲酯洗脱，在N2下干燥，重新悬浮在50μl MeOH/H2O(1:1)中，并注入Acquity UPLC HSS T3 1.8-μm 2.1×50-mm色谱柱中。流动相45％溶剂A-H2O+0.01％乙酸和55％溶剂B-MeOH+0.01％乙酸-，初始流速为0.4毫升/分钟，然后在前10分钟梯度至15％溶剂A，梯度至2％溶剂A持续18分钟，2％溶剂A等度运行直至25分钟，然后梯度回至45％溶剂A以重新平衡直至30分钟。脂质标准品(美国密歇根州安娜堡的Cayman公司(Cayman,Ann Arbor,MI,USA))用于调整和优化，以及为每种化合物创建校准曲线。

[0728] 原代人RPE培养物

[0729] 所有使用原代人RPE细胞的实验都得到了LSUHNO机构审查委员会的批准，并按照NIH指南进行。细胞是从眼库提供的匿名捐赠者那里收集的。简而言之，在头部外伤死亡后24小时内，从NDRI获得了一名19岁高加索男性的眼球，没有眼部病理学。打开球体，收获和培养RPE细胞(1、2)，并将其在补充有10％FBS、5％NCS、非必需氨基酸、青霉素-链霉素(100U/mL)、人成纤维细胞生长因子(10ng/ml)的MEM培养基中生长，并在37℃下以恒定供应的5％CO2孵育。如之前的研究(3)一样验证细胞完整性。对于寡聚Aβ处理，将细胞以30.000个细胞/cm2接种在6孔板中。2天后，用10μM OAβ或用PBS(媒剂对照)处理亚汇合细胞。

[0730] Aβ(1-42)寡聚化

[0731] 通过添加1％NH4OH/水和DMSO，将Aβ(1-42)(经HFIP处理，美国加利福尼亚州弗里蒙特的ANASPEC公司(ANASPEC Company,Fremont,CA,USA)，目录AS-64129)重新悬浮，以获得500μM的浓度并超声处理10分钟。然后通过在低结合聚丙烯微量离心管中在4℃下用无菌

磷酸盐缓冲液将t Aβ(1-42)稀释24小时来进行寡聚化。使用小鼠单克隆6E10抗体通过蛋白质印迹验证寡聚化(图64)。

[0732] 衰老相关的β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色

[0733] 使用SA-β-Gal染色试剂盒(目录9860,美国马塞诸塞州的Cell Signaling Technology公司)观察细胞。简而言之,将RPE细胞用PBS洗涤,用4%多聚甲醛(PFA)固定15分钟,然后再次用PBS洗涤并在染色溶液混合物中在37℃下孵育过夜(无CO2),CO2的存在会导致pH的变化,这可能会影响染色结果。在显色后在明场显微镜(Nikon Eclipse TS100)200X放大倍数下拍摄照片,并在每孔10个不同的随机视野中对细胞进行计数。

[0734] 蛋白质提取和蛋白质印迹分析

[0735] 将样品通过RIPA缓冲液裂解,并通过Bradford测定法(美国加利福尼亚州赫拉克勒斯的Bio-Rad公司(Bio-Rad,Hercules,CA,USA))确定蛋白质。变性后,用SDS-PAGE(4-12%梯度)凝胶(美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA))分离20μl的每个培养基样品或30μg的细胞/组织样品总蛋白,并将其转移到硝酸纤维素膜(Bio-Rad)。将膜用PBST中的5%脱脂奶粉封闭,用一抗(图66)探测1小时,用PBST洗涤3次,用二抗(美国伊利诺伊州芝加哥的通用电气医疗集团(GE Healthcare,Chicago,IL,USA))探测1小时,并用PBST洗涤3次。使用LAS 4000成像系统(通用电气医疗集团)将蛋白质条带可视化。在95%的置信水平下对光密度数据进行统计分析。

[0736] RNA分离和qPCR分析

[0737] 去除细胞培养基,用PBS 1X洗涤细胞,并使用细胞刮刀收集样品。使用RNeasy Plus迷你试剂盒(德国希尔登的Qiagen公司)分离总RNA。

[0738] 对于体内实验,眼球被摘除,含有角膜、晶状体和虹膜的前段被移除,视网膜与眼杯的其余部分(RPE/脉络膜)分离。使用RNeasy Plus迷你试剂盒(Qiagen)分离总视网膜和眼杯(RPE/脉络膜)RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad)逆转录1μg总RNA,并使用BrightGreen 2X qPCR MasterMix(加拿大不列颠哥伦比亚省里士满市的应用生物材料公司(Applied Biological Materials Inc.,Richmond,BC,Canada))和经过验证的引物(SI附录,表S2)进行反应。在CFX-384实时PCR系统(Bio-Rad)中进行定量PCR。将靶基因的表达相对于看家基因(housekeeping gene)的几何平均值进行归一化,并通过比较阈值循环法(Δ ΔCT)计算相对表达。

[0739] 免疫荧光和共聚焦显微镜

[0740] 对于整体RPE染色,将眼球去核并预先固定在4%PFA中,持续15分钟。然后将含有RPE片的眼杯固定在4%PFA中,持续30分钟,在室温下在封闭步骤1小时后在PBS中洗涤3次。通过在4℃下将一抗(ZO-1)孵育48小时进行免疫染色。然后将眼杯用PBS洗涤3次,并与二抗一起在4℃下孵育12小时。将原代人RPE细胞和小鼠眼杯嵌入ProLong™ Gold Antifade封固剂(赛默飞世尔科技公司)中,置于两个玻璃盖玻片之间。用Olympus FV1200显微镜(日本Olympus公司)拍摄照片。通过软件ImageJ(rsb.info.nih.gov/ij/)分析图像。

[0741] 光谱结构域-光学相干断层扫描成像和分析

[0742] 注射后7天,通过腹腔注射(ip)氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠,通过局部1.0%托吡卡胺扩张瞳孔并将其放置在定制的OCT成像支架中(使用热垫将体温保持在38℃)。使用Heidelberg Spectralis HRA OCT系统(德国海德堡的Heidelberg Engineering公司)沿水

平子午线通过视神经乳头对视网膜进行成像。轴向分辨率为7mm光学和3.5mm数字。将原始OCT B扫描横截面图像以μm为单位导出并在ImageJ(http//imagej.nih.gov/ij)中打开。PRC层厚度被定义为从外层丛状层之后的外核层尖端到PRC外段的宽度。在同一次扫描中进行了三次测量并取平均值。计算平均值(SEM)的平均值和标准误差(n＝4/组)。使用学生T检验计算统计学显著性,并且P值小于0.05被认为是显著的。

[0743] 统计学

[0744] 数据表示为至少三个或更多个独立实验的平均值±SEM。通过单因素ANOVA分析数据,然后以95％的置信度进行Tukey HSD事后检验,以比较不同的组,并认为P＜0.05具有显著性。使用Pearson相关分析分析因素之间的关系。通过使用BioVinci软件(美国加利福尼亚州圣地亚哥的Bioturing公司)进行统计分析。

[0745] 参考文献

[0746] 1.S.Sonoda等人,“高度极化的人视网膜色素上皮细胞的培养和分化方案(A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells.)”《自然规程(Nat Protoc)》4,662-673(2009)。

[0747] 2.M.Ishida,G.M.Lui,A.Yamani,I.K.Sugino,M.A.Zarbin,“从外周巩膜瓣活检中培养人视网膜色素上皮细胞(Culture of human retinal pigment epithelial cells from peripheral scleral flap biopsies.)”《当前眼科研究(Curr.Eye Res.)》17,392-402(1998)。

[0748] 3.B.Jun等人,“类延长素是新型细胞特异性脂质介质,其对于光感受器细胞完整性的神经保护信号传导是必需的”《科学报告》7,5279(2017)。

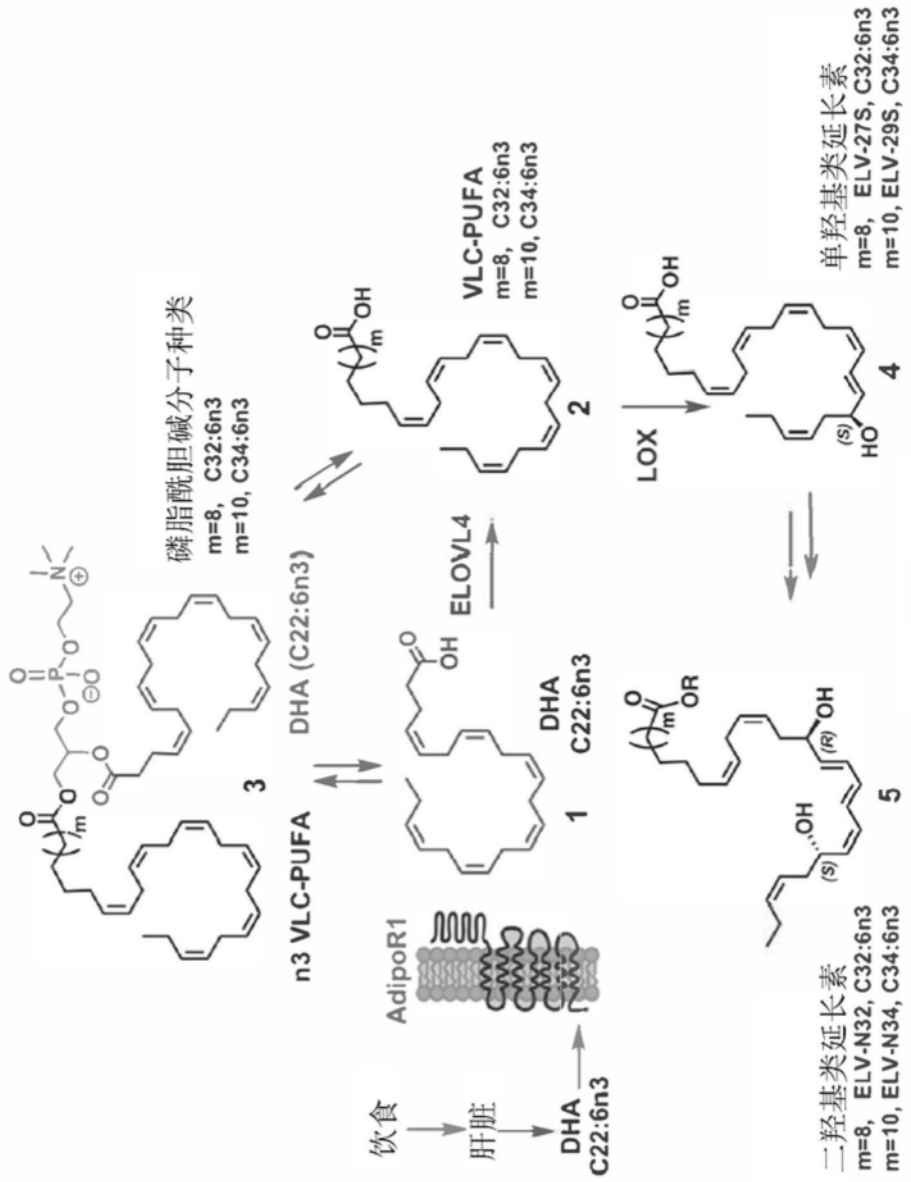

磷脂酰胆碱分子种类
m=8, C32:6n3
m=10, C34:6n3
3
n3 VLC-PUFA
DHA (C22:6n3)
1
DHA
C22:6n3
ELOVL4
2
VLC-PUFA
m=8, C32:6n3
m=10, C34:6n3
AdipoR1
饮食
肝脏
DHA
C22:6n3
LOX
4
单羟基类延长素
m=8, ELV-27S, C32:6n3
m=10, ELV-29S, C34:6n3
5
二羟基类延长素
m=8, ELV-N32, C32:6n3
m=10, ELV-N34, C34:6n3

图1

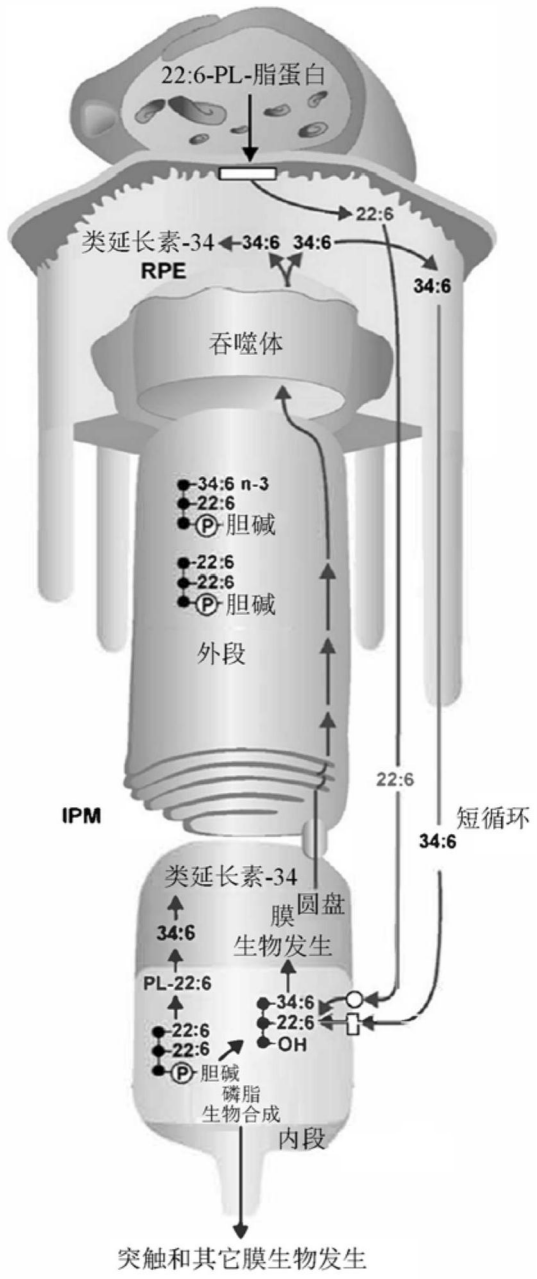

22:6-PL-脂蛋白
22:6
类延长素-34
34:6
34:6
RPE
34:6
吞噬体
34:6 n-3
22:6
Ⓟ胆碱
22:6
22:6
Ⓟ胆碱
外段
22:6
IPM
短循环
34:6
类延长素-34
膜圆盘
34:6
生物发生
PL-22:6
34:6
22:6
22:6
OH
Ⓟ胆碱
磷脂
生物合成
内段
突触和其它膜生物发生

图2

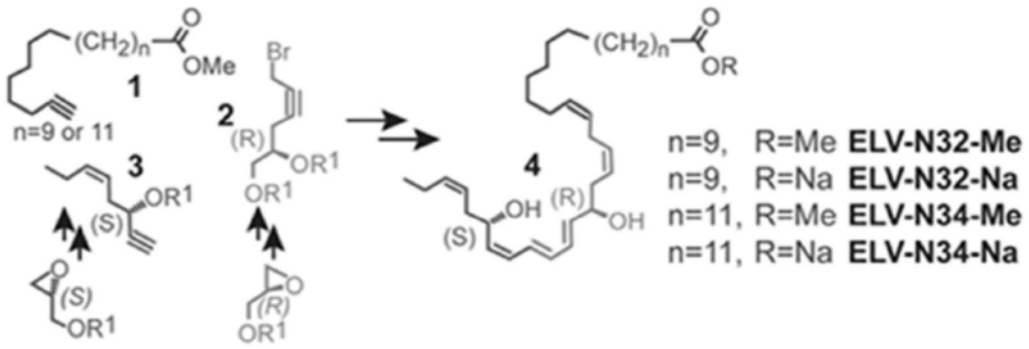

(CH2)n
OMe
1
n=9 or 11
2
Br
(R)
OR1
OR1
3
OR1
(S)
(S)
OR1
(R)
OR1
4
(CH2)n
OR
OH
(R)
(S)
OH
n=9, R=Me ELV-N32-Me
n=9, R=Na ELV-N32-Na
n=11, R=Me ELV-N34-Me
n=11, R=Na ELV-N34-Na

图3A

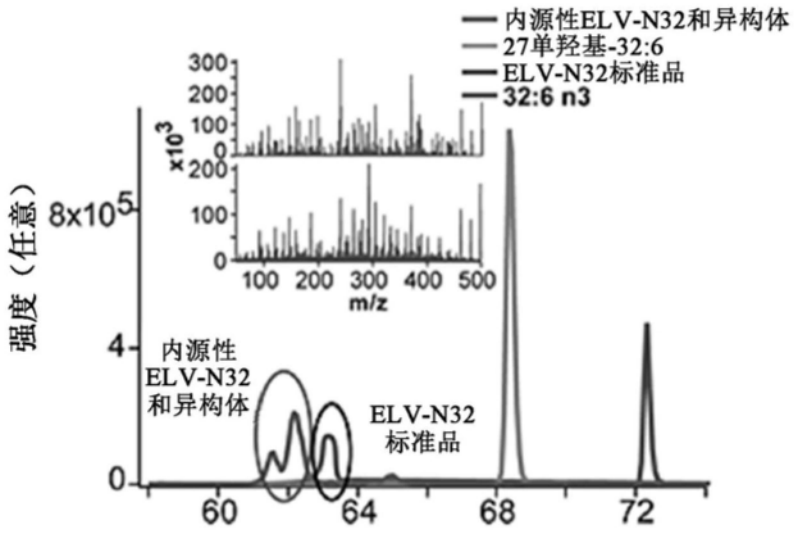

内源性ELV-N32和异构体
27单羟基-32:6
ELV-N32标准品
32:6 n3
强度（任意）
8x10^5
4
0
x10^3
300
200
100
0
200
100
0
100 200 300 400 500
m/z
内源性
ELV-N32
和异构体
ELV-N32
标准品
60
64
68
72

图3B

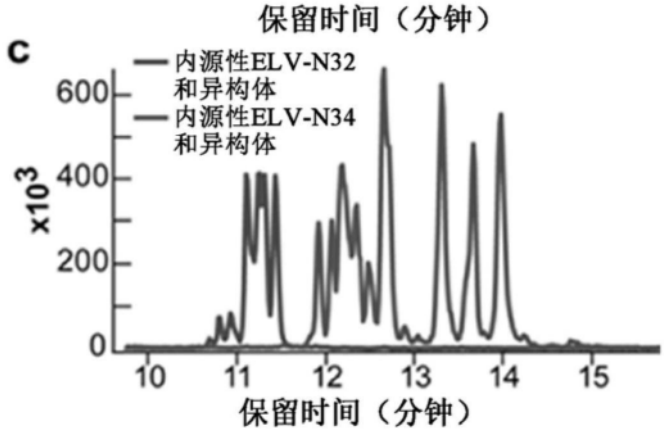

保留时间（分钟）
C
内源性ELV-N32
和异构体
内源性ELV-N34
和异构体
x10^3
600
400
200
0
10
11
12
13
14
15
保留时间（分钟）

图3C

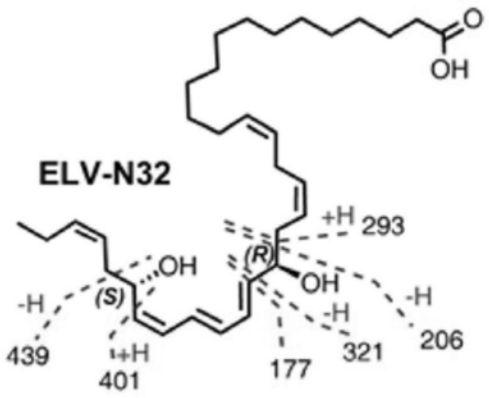

ELV-N32
OH
O
+H 293
(R)
OH
OH
(S)
-H
439
+H
401
177
-H
321
-H
206

图3D

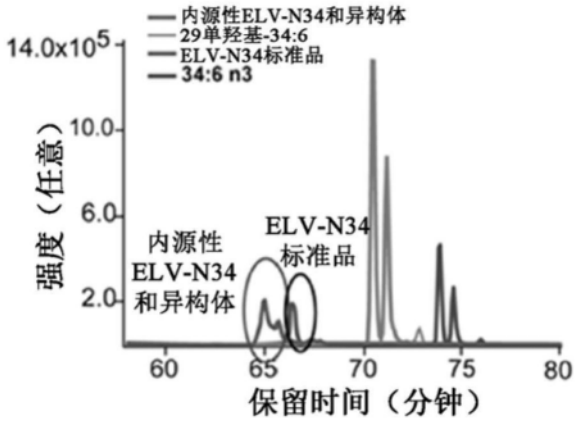

内源性ELV-N34和异构体
29单羟基-34:6
ELV-N34标准品
34:6 n3
14.0x10^5
10.0
6.0
2.0
强度（任意）
内源性
ELV-N34
和异构体
ELV-N34
标准品
60
65
70
75
80
保留时间（分钟）

图3E

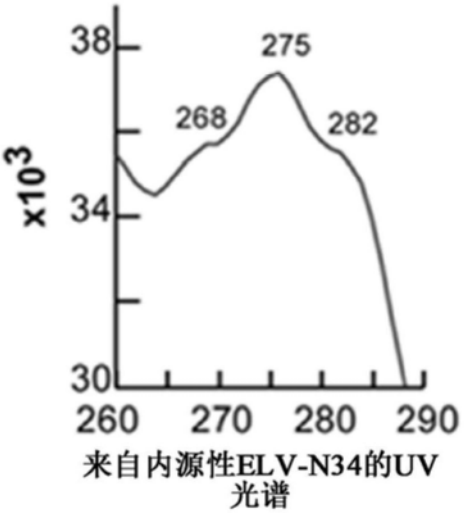

38
34
30
x10^3
275
268
282
260
270
280
290
来自内源性ELV-N34的UV
光谱

图3F

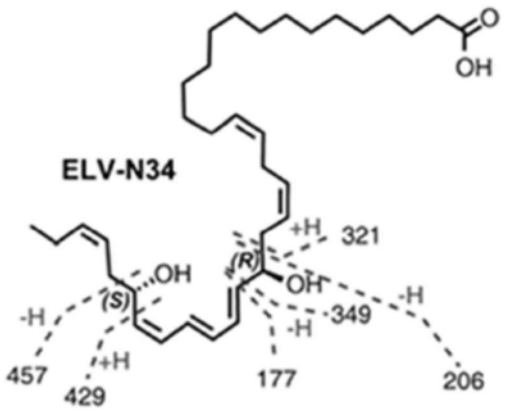

ELV-N34
O
OH
+H
321
(R)
OH
OH
(S)
-H
-H
-349
-H
457
+H
429
-H
177
206

图3G

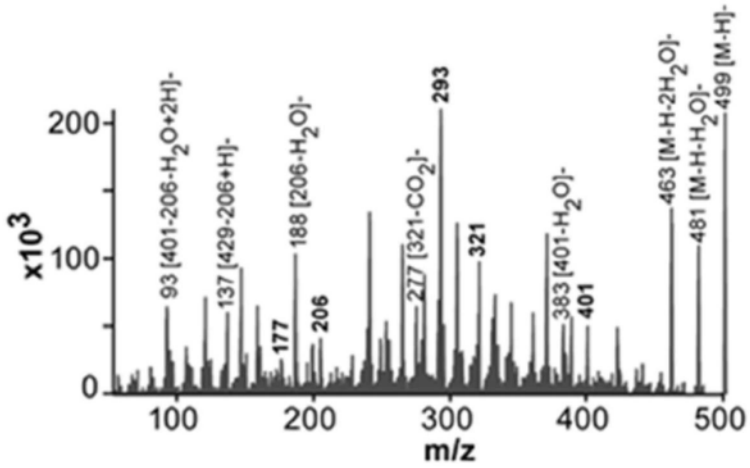

x10^3
200
100
0
100
200
300
400
500
m/z
93 [401-206-H2O+2H]-
137 [429-206+H]-
177
188 [206-H2O]-
206
277 [321-CO2]-
293
321
383 [401-H2O]-
401
463 [M-H-2H2O]-
481 [M-H-H2O]-
499 [M-H]-

图3H

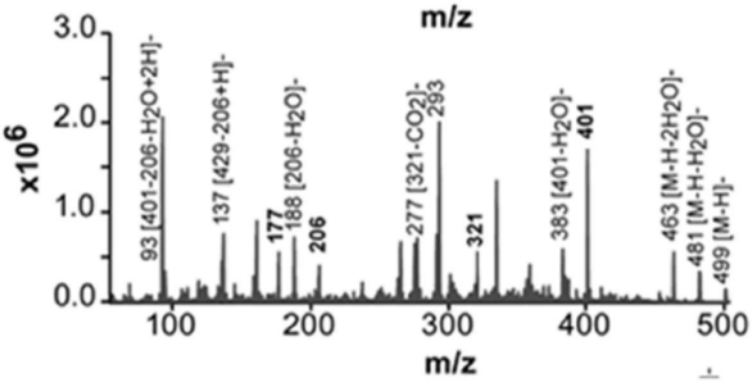

m/z
x10^6
3.0
2.0
1.0
0.0
100
200
300
400
500
m/z
93 [401-206-H2O+2H]-
137 [429-206+H]-
177
188 [206-H2O]-
206
277 [321-CO2]-
293
321
383 [401-H2O]-
401
463 [M-H-2H2O]-
481 [M-H-H2O]-
499 [M-H]-

图3I

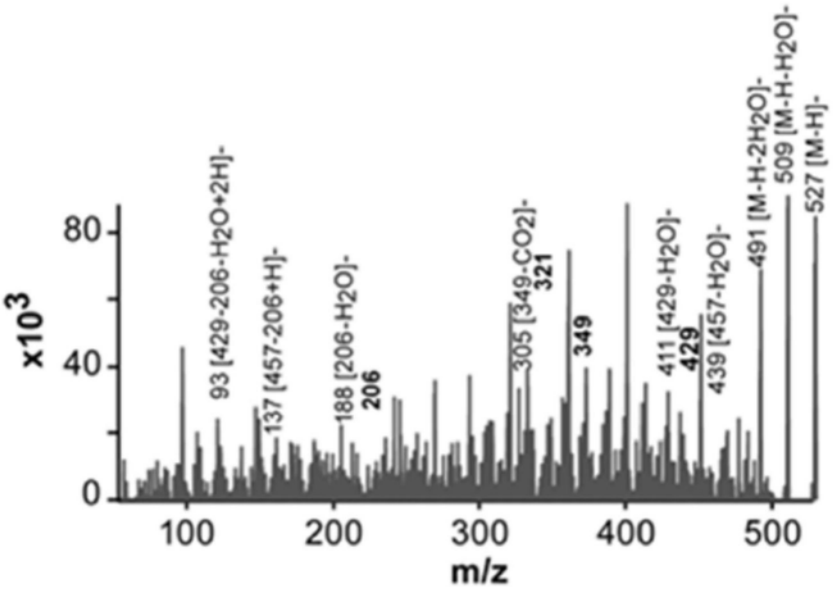

x10^3
80
40
0
100
200
300
400
500
m/z
93 [429-206-H2O+2H]-
137 [457-206+H]-
188 [206-H2O]-
206
305 [349-CO2]-
321
349
411 [429-H2O]-
429
439 [457-H2O]-
491 [M-H-2H2O]-
509 [M-H-H2O]-
527 [M-H]-

图3J

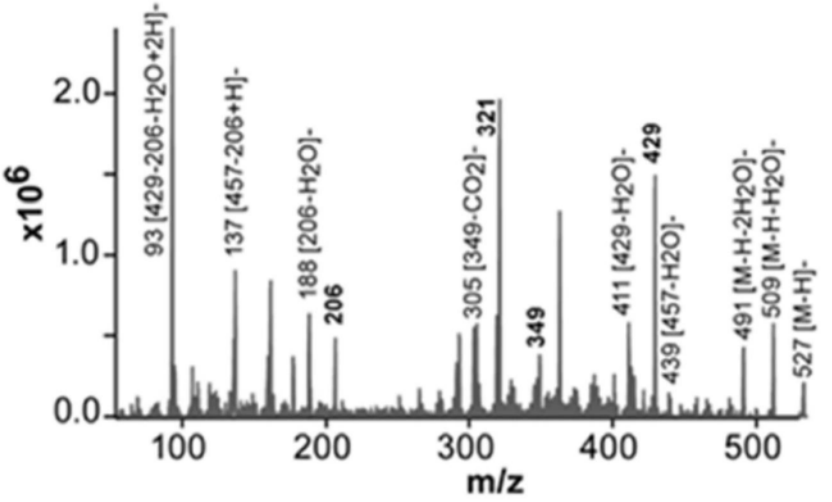

x10^6
2.0
1.0
0.0
100
200
300
400
500
m/z
93 [429-206-H2O+2H]-
137 [457-206+H]-
188 [206-H2O]-
206
305 [349-CO2]-
321
349
411 [429-H2O]-
429
439 [457-H2O]-
491 [M-H-2H2O]-
509 [M-H-H2O]-
527 [M-H]-

图3K

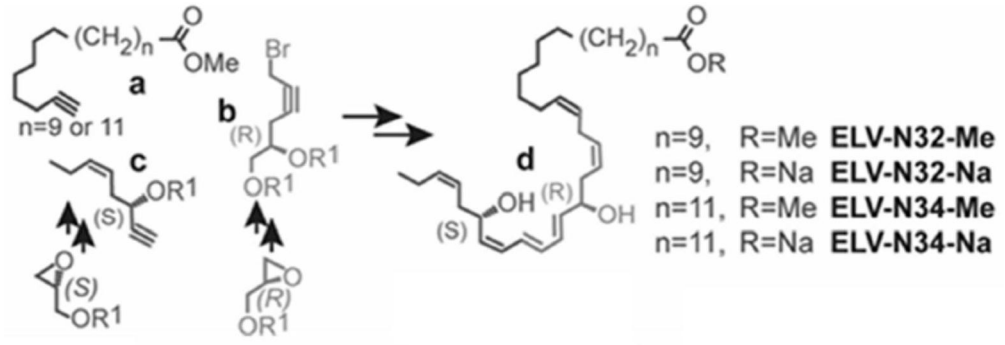

(CH2)n
OMe
a
n=9 or 11
Br
b
(R)
OR1
c
(S)
(S)
OR1
(R)
OR1
d
(CH2)n
OR
OH
(R)
OH
(S)
n=9, R=Me ELV-N32-Me
n=9, R=Na ELV-N32-Na
n=11, R=Me ELV-N34-Me
n=11, R=Na ELV-N34-Na

图4A

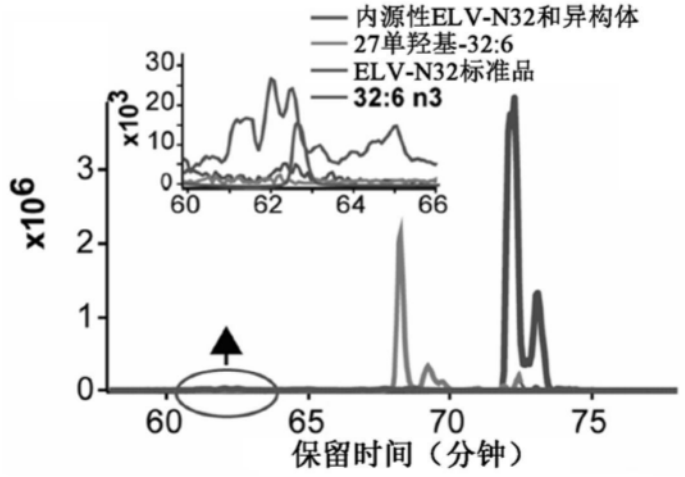

内源性ELV-N32和异构体
27单羟基-32:6
ELV-N32标准品
32:6 n3
x10^3
x10^6
保留时间（分钟）

图4B

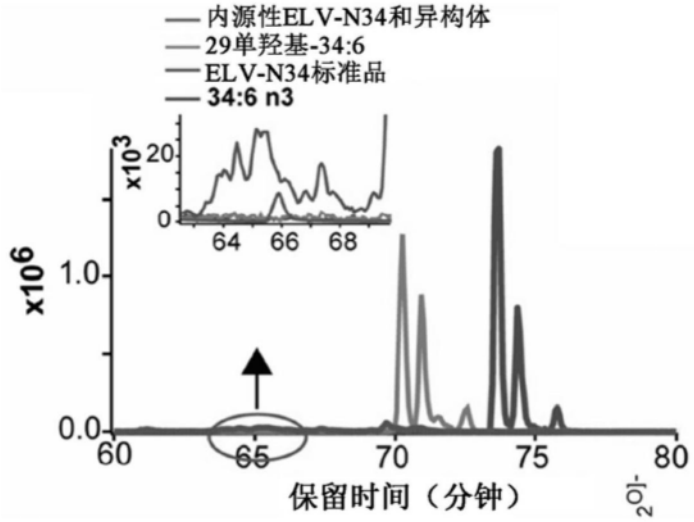

内源性ELV-N34和异构体
29单羟基-34:6
ELV-N34标准品
34:6 n3
x10^3
x10^6
保留时间（分钟）

图4C

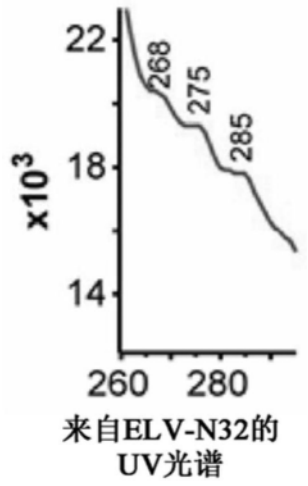

22
18
14
x10³
268
275
285
260
280
来自ELV-N32的
UV光谱

图4D

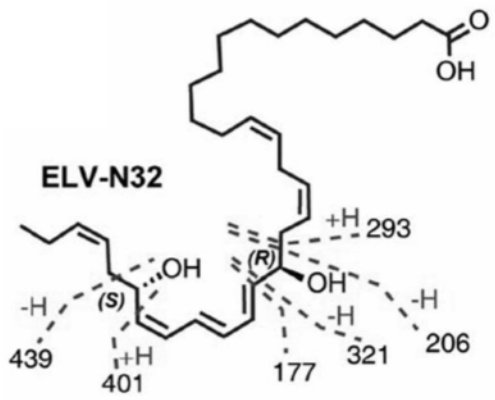

ELV-N32
OH
O
OH
+H
293
(R)
OH
-H
(S)
-H
439
+H
401
177
-H
321
206

图4E

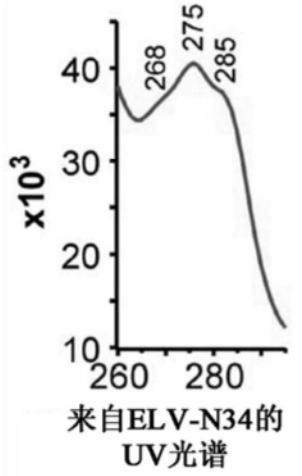

40
30
20
10
x10³
268
275
285
260
280
来自ELV-N34的
UV光谱

图4F

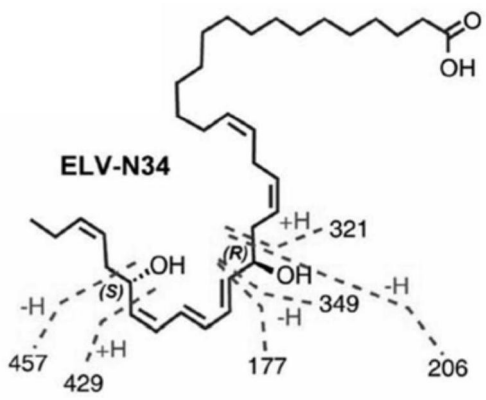

ELV-N34
OH
O
OH
+H
321
(R)
OH
(S)
OH
-H
349
-H
-H
457
+H
429
177
206

图4G

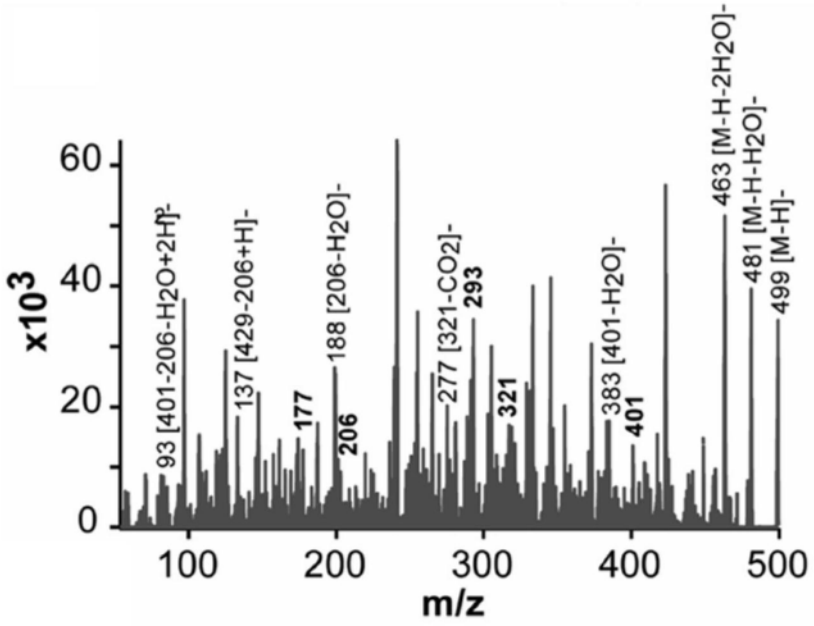

x10^3
60
40
20
0
100
200
300
400
500
m/z
93 [401-206-H2O+2H]-
137 [429-206+H]-
177
188 [206-H2O]-
206
277 [321-CO2]-
293
321
383 [401-H2O]-
401
463 [M-H-2H2O]-
481 [M-H-H2O]-
499 [M-H]-

图4H

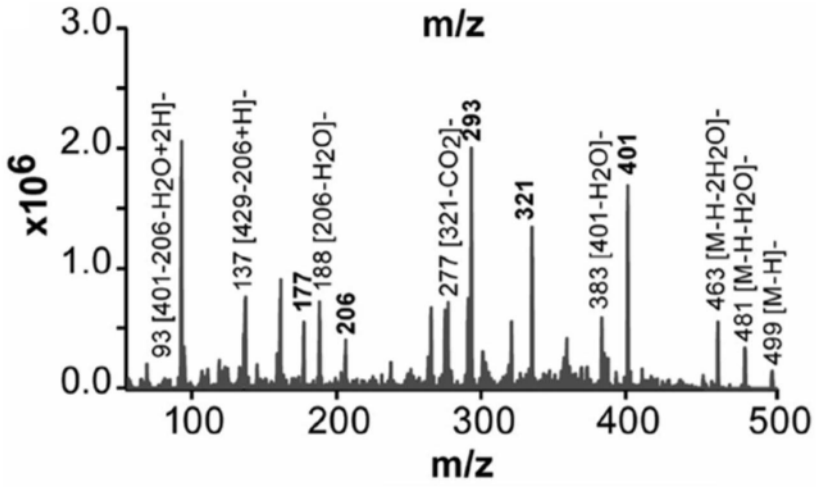

m/z
x10^6
3.0
2.0
1.0
0.0
100
200
300
400
500
m/z
93 [401-206-H2O+2H]-
137 [429-206+H]-
177
188 [206-H2O]-
206
277 [321-CO2]-
293
321
383 [401-H2O]-
401
463 [M-H-2H2O]-
481 [M-H-H2O]-
499 [M-H]-

图4I

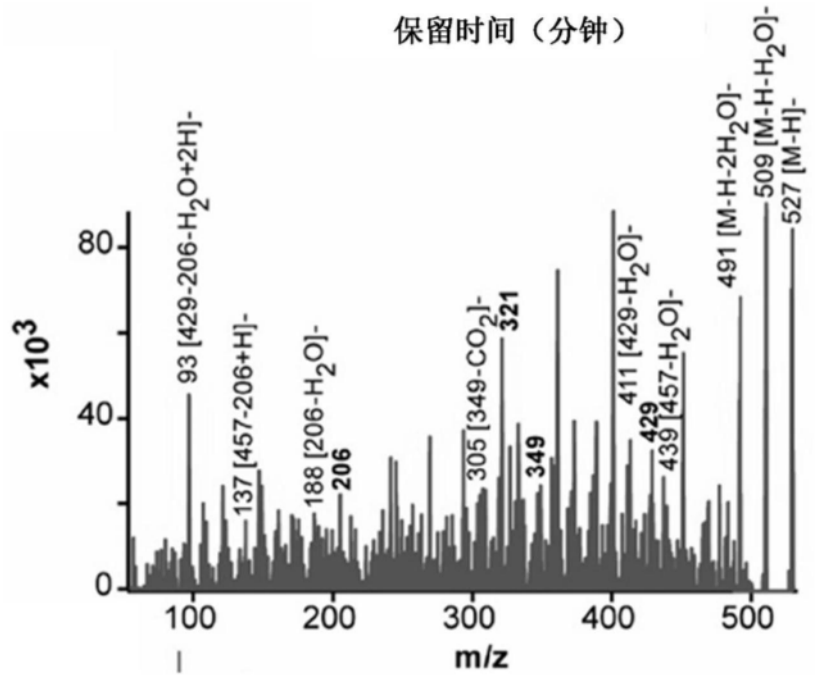

保留时间（分钟）
x10^3
80
40
0
100
200
300
400
500
m/z
93 [429-206-H2O+2H]-
137 [457-206+H]-
188 [206-H2O]-
206
305 [349-CO2]-
321
349
411 [429-H2O]-
429
439 [457-H2O]-
491 [M-H-2H2O]-
509 [M-H-H2O]-
527 [M-H]-

图4J

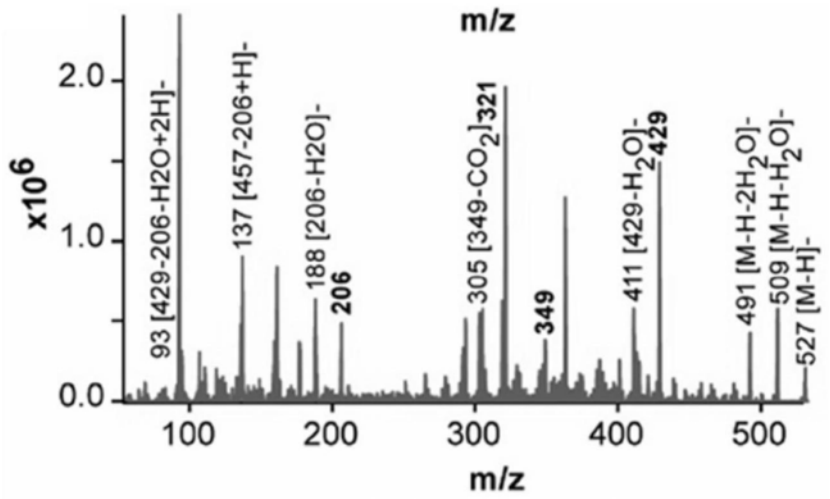

m/z
x10^6
2.0
1.0
0.0
100
200
300
400
500
m/z
93 [429-206-H2O+2H]-
137 [457-206+H]-
188 [206-H2O]-
206
305 [349-CO2]-
321
349
411 [429-H2O]-
429
491 [M-H-2H2O]-
509 [M-H-H2O]-
527 [M-H]-

图4K

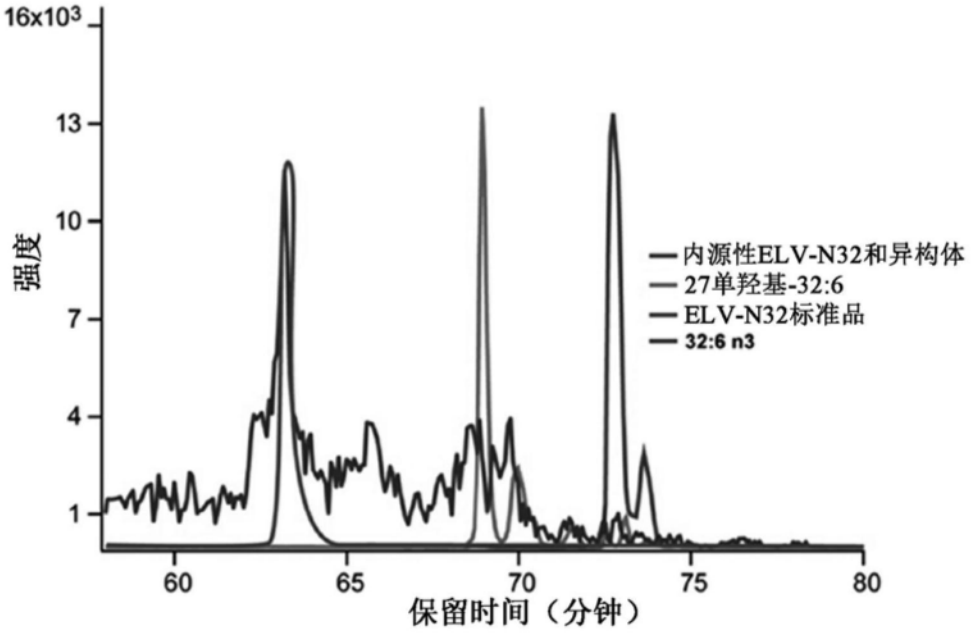

16x10^3
13
10
7
4
1
强度
60
65
70
75
80
保留时间（分钟）
内源性ELV-N32和异构体
27单羟基-32:6
ELV-N32标准品
32:6 n3

图5A

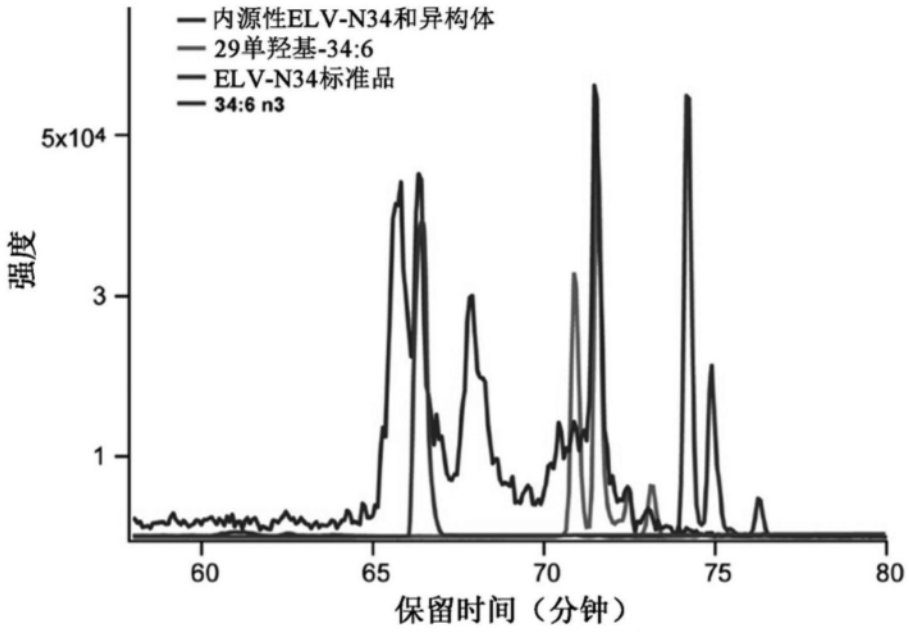

内源性ELV-N34和异构体
29单羟基-34:6
ELV-N34标准品
34:6 n3
5x10⁴
3
1
强度
60
65
70
75
80
保留时间（分钟）

图5B

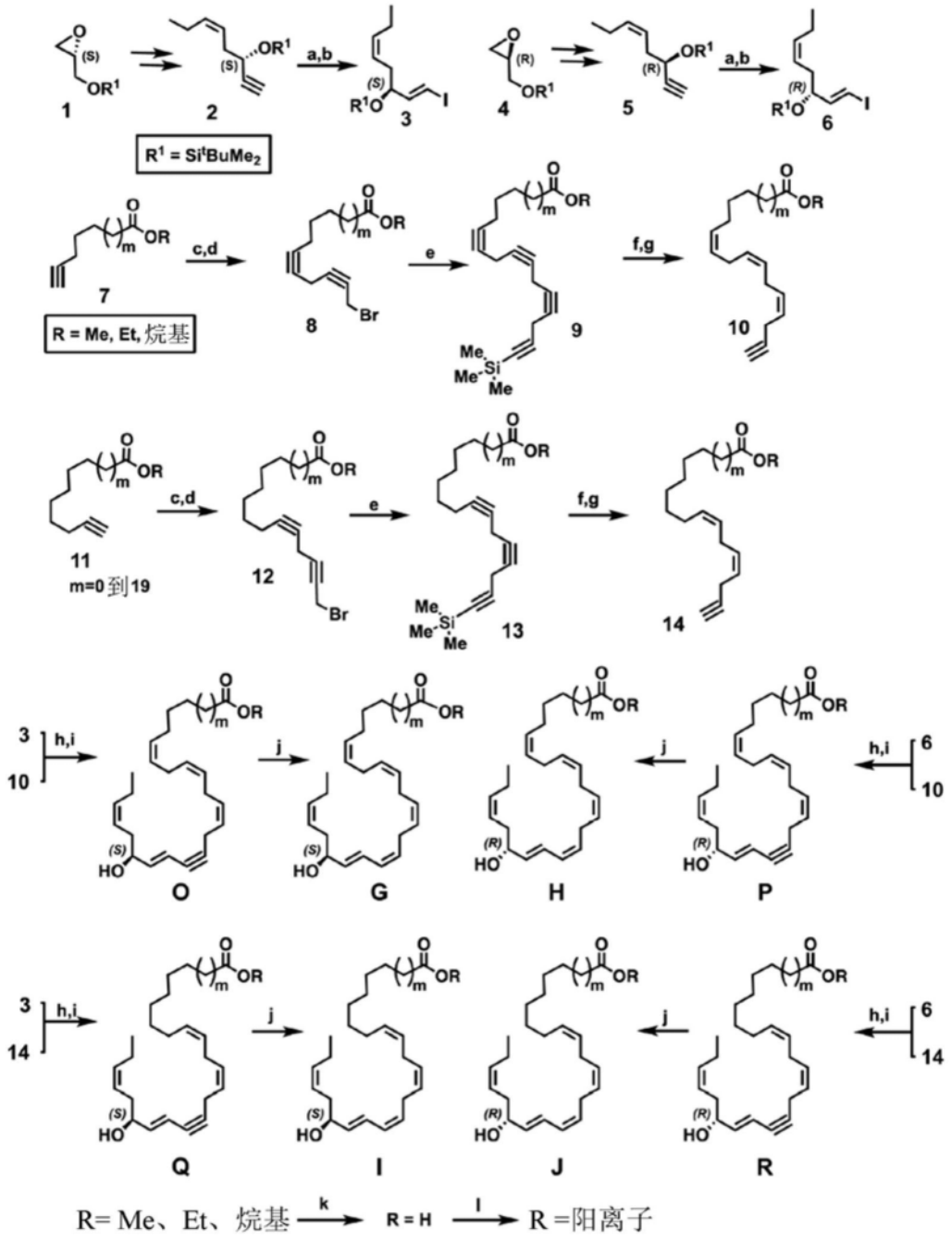


图6

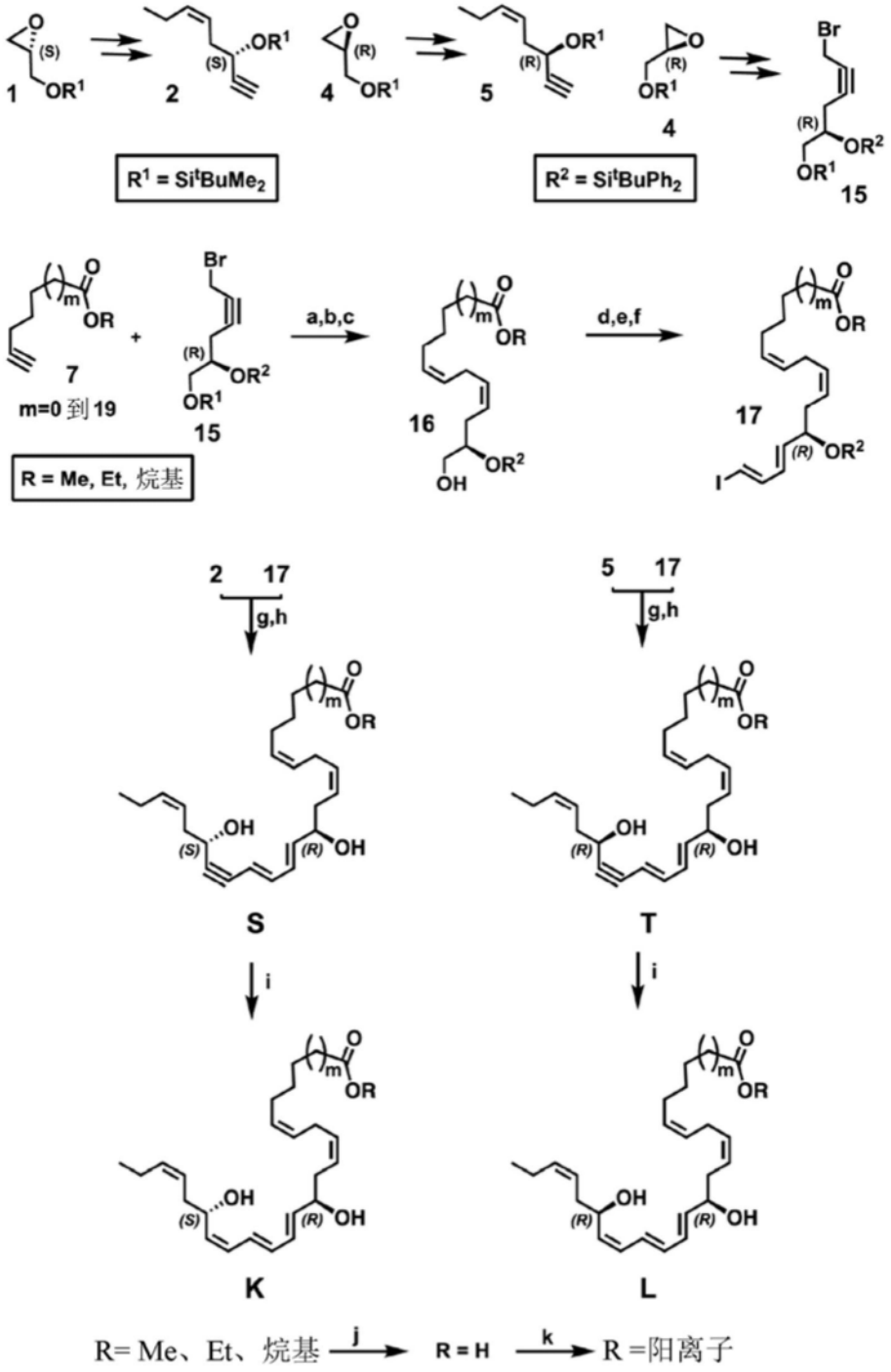

R1 = SitBuMe2
R2 = SitBuPh2
m=0 到 19
R = Me, Et, 烷基
a,b,c
d,e,f
g,h
i
j
k
R= Me、Et、烷基
R = H
R =阳离子

图8

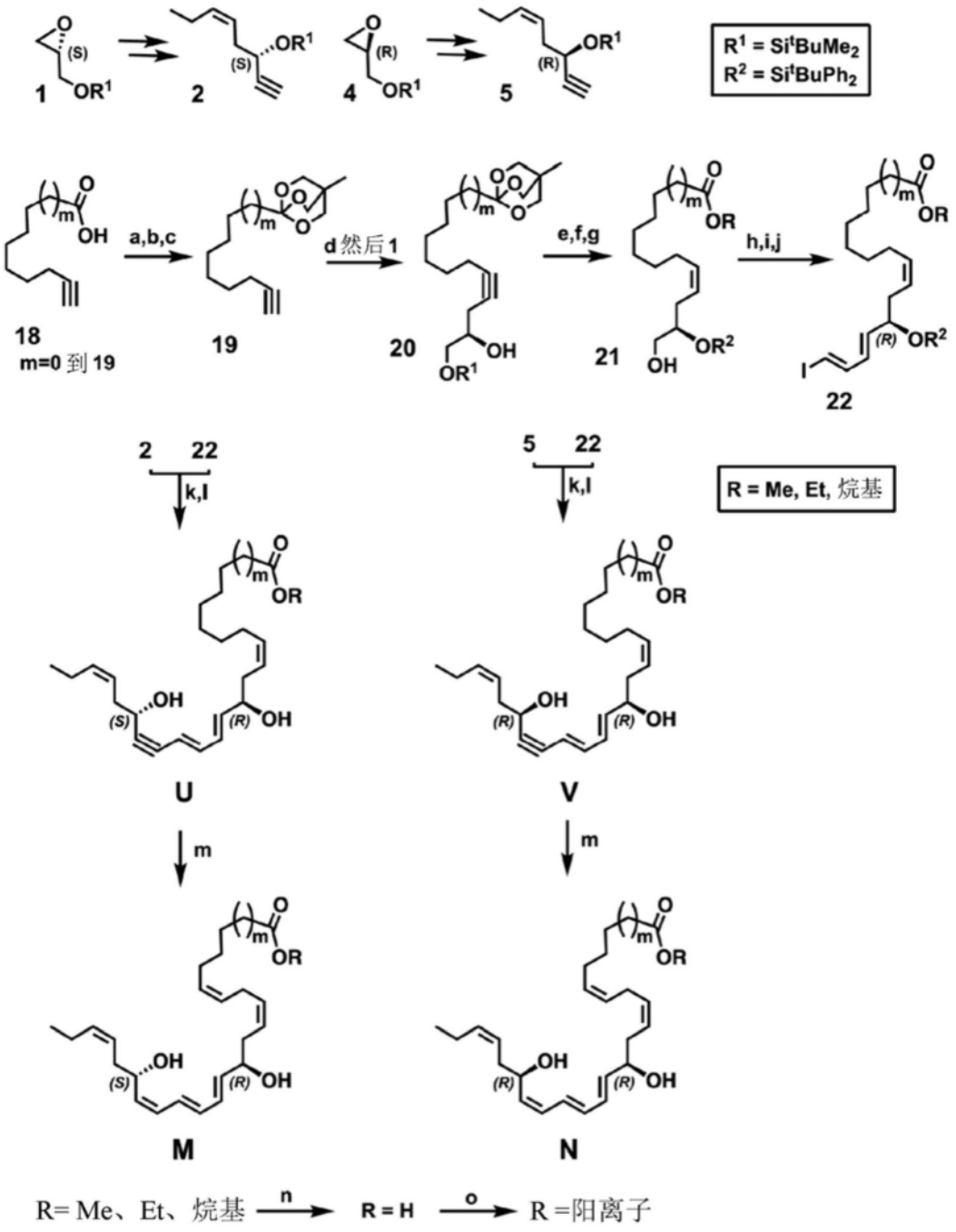

R1 = SitBuMe2
R2 = SitBuPh2
1
2
4
5
18
m=0 到 19
19
20
21
22
a,b,c
d 然后 1
e,f,g
h,i,j
2 22
k,l
5 22
k,l
R = Me, Et, 烷基
U
V
m
m
M
N
R= Me、Et、烷基
n
R = H
o
R =阳离子

图7

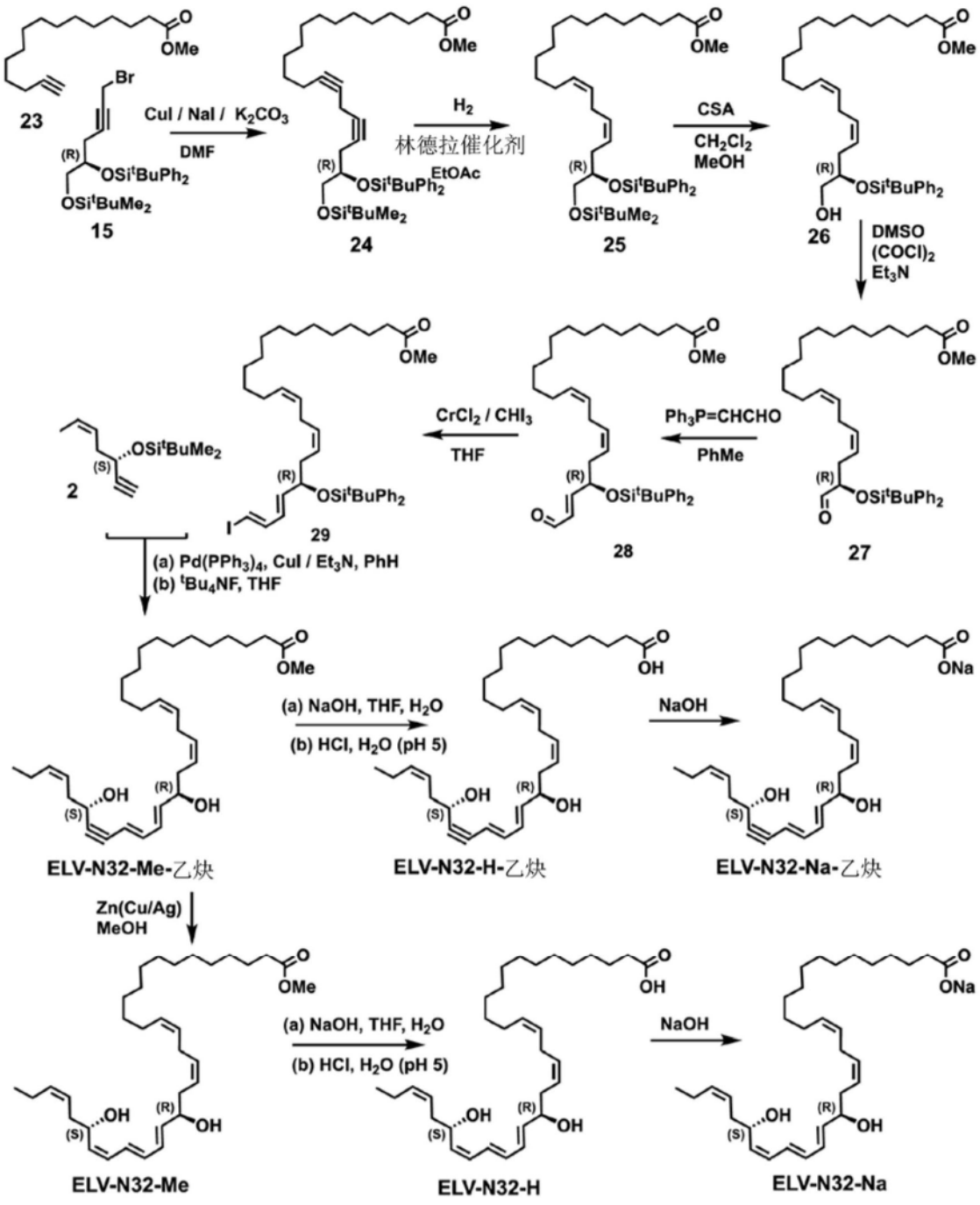

23
15
24
25
26
27
28
29
2
林德拉催化剂
ELV-N32-Me-乙炔
ELV-N32-H-乙炔
ELV-N32-Na-乙炔
ELV-N32-Me
ELV-N32-H
ELV-N32-Na

图9

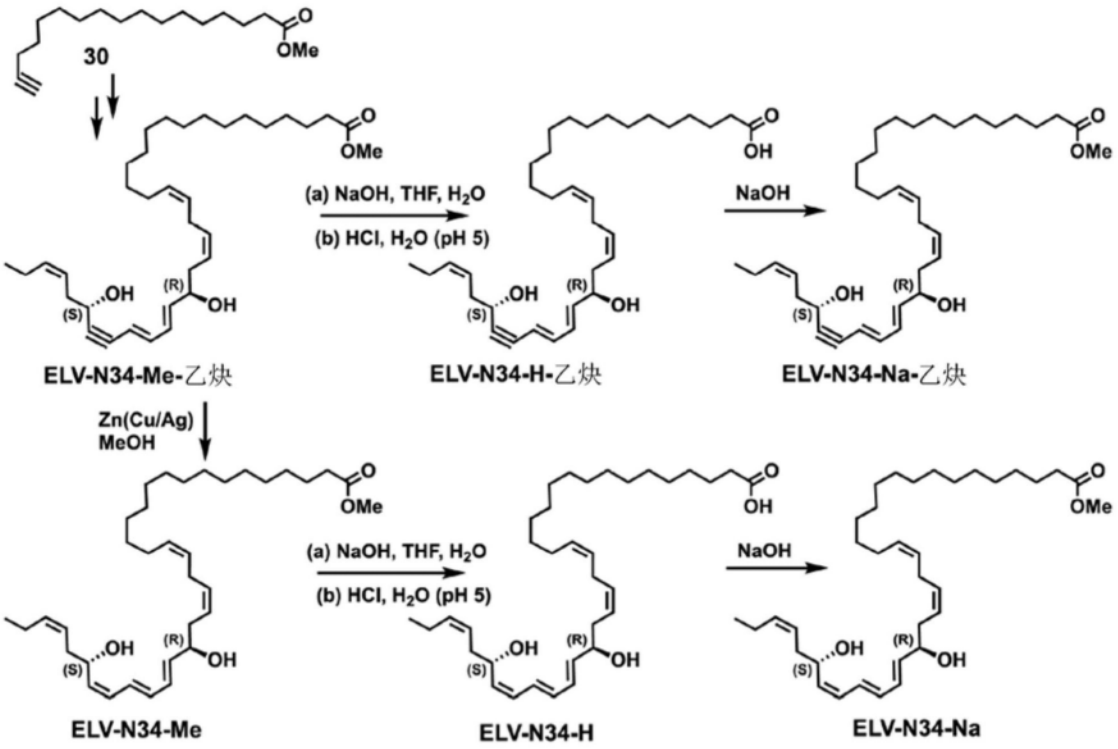

30
OMe
(a) NaOH, THF, H2O
(b) HCl, H2O (pH 5)
NaOH
OH
(R)
(S)
ELV-N34-Me-乙炔
ELV-N34-H-乙炔
ELV-N34-Na-乙炔
Zn(Cu/Ag)
MeOH
ELV-N34-Me
ELV-N34-H
ELV-N34-Na

图10

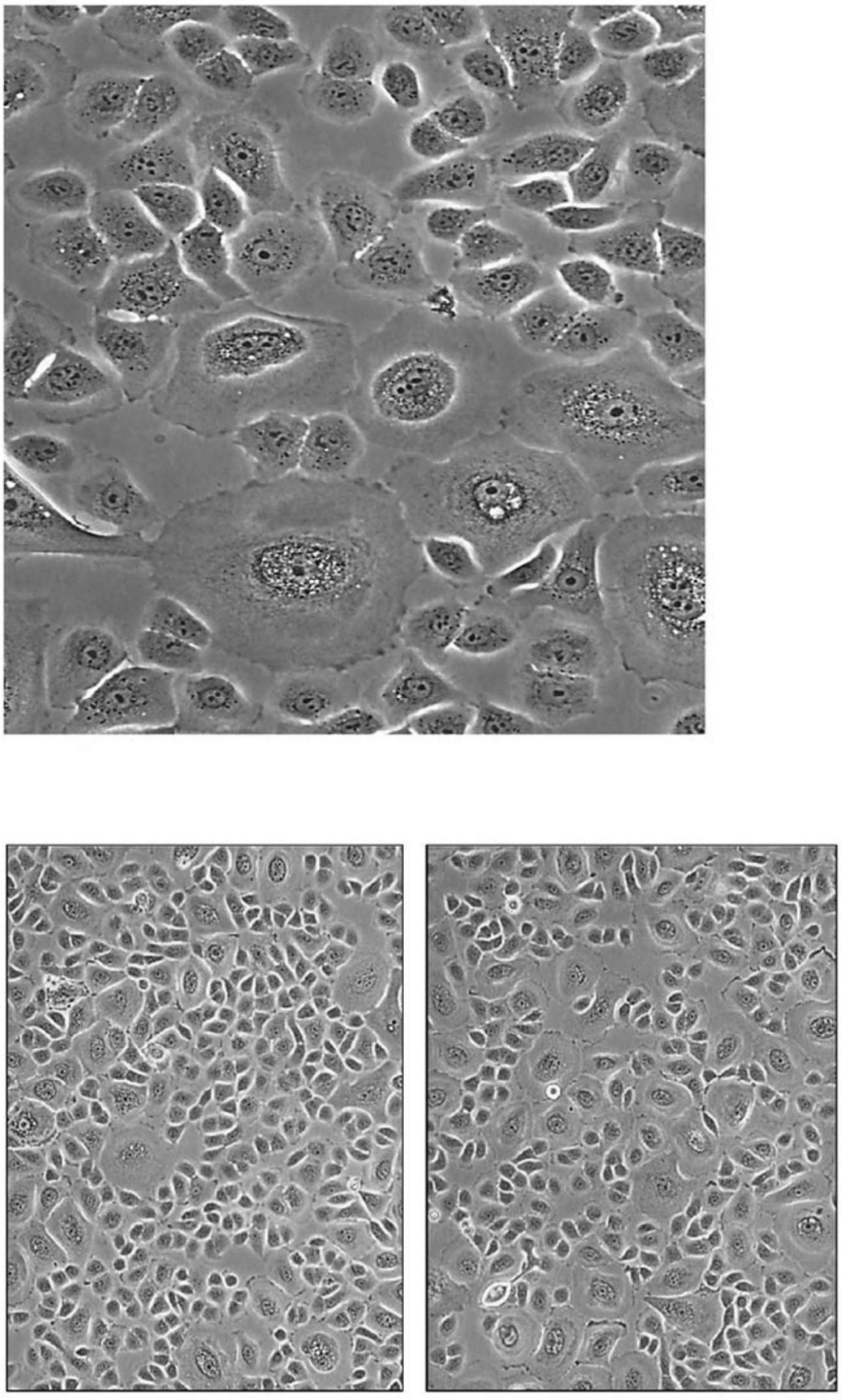


图11

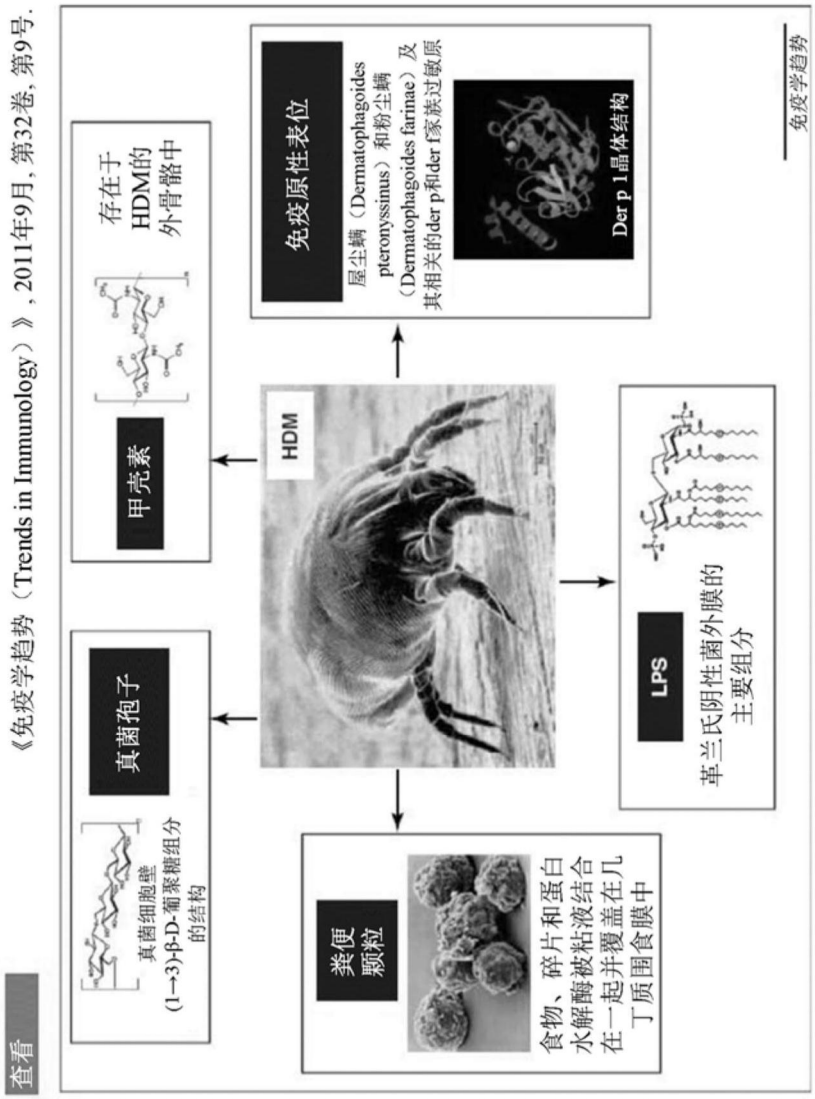

查看
《免疫学趋势（Trends in Immunology）》，2011年9月，第32卷，第9号.
真菌孢子
真菌细胞壁
(1→3)-β-D-葡聚糖组分
的结构
甲壳素
存在于
HDM的
外骨骼中
HDM
免疫原性表位
屋尘螨（Dermatophagoides
pteronyssinus）和粉尘螨
（Dermatophagoides farinae）及
其相关的der p和der f家族过敏原
Der p 1晶体结构
粪便
颗粒
食物、碎片和蛋白
水解酶被粘液结合
在一起并覆盖在几
丁质围食膜中
LPS
革兰氏阴性菌外膜的
主要组分
免疫学趋势

图12

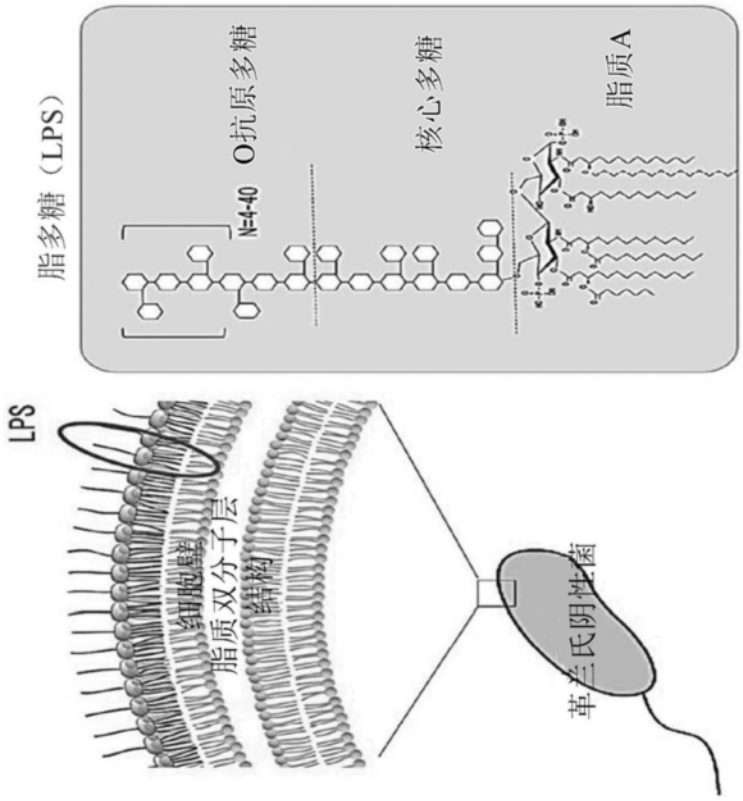


图13

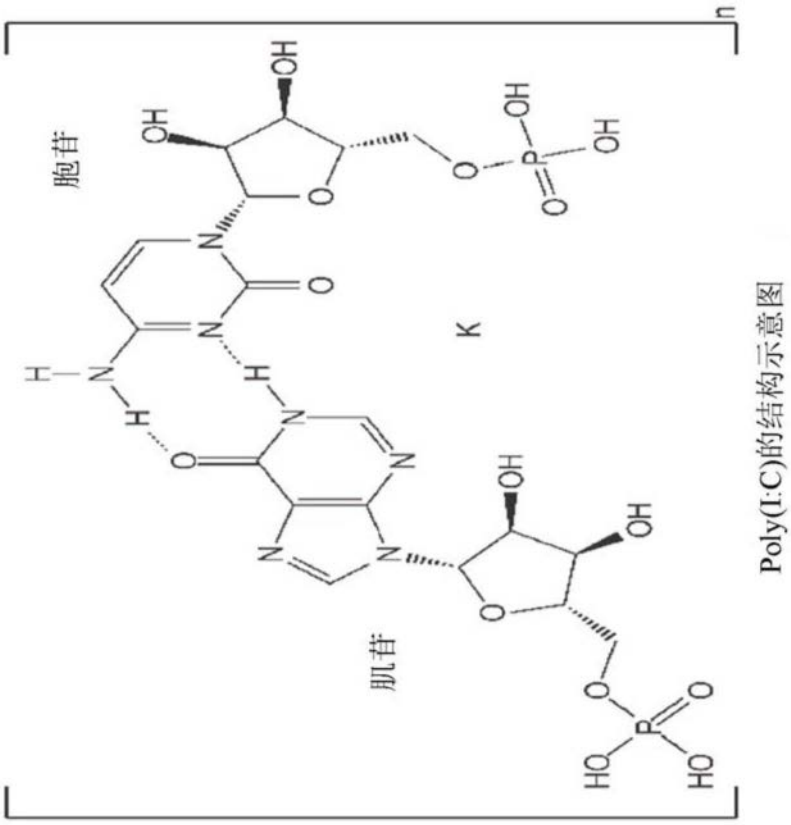


图13续

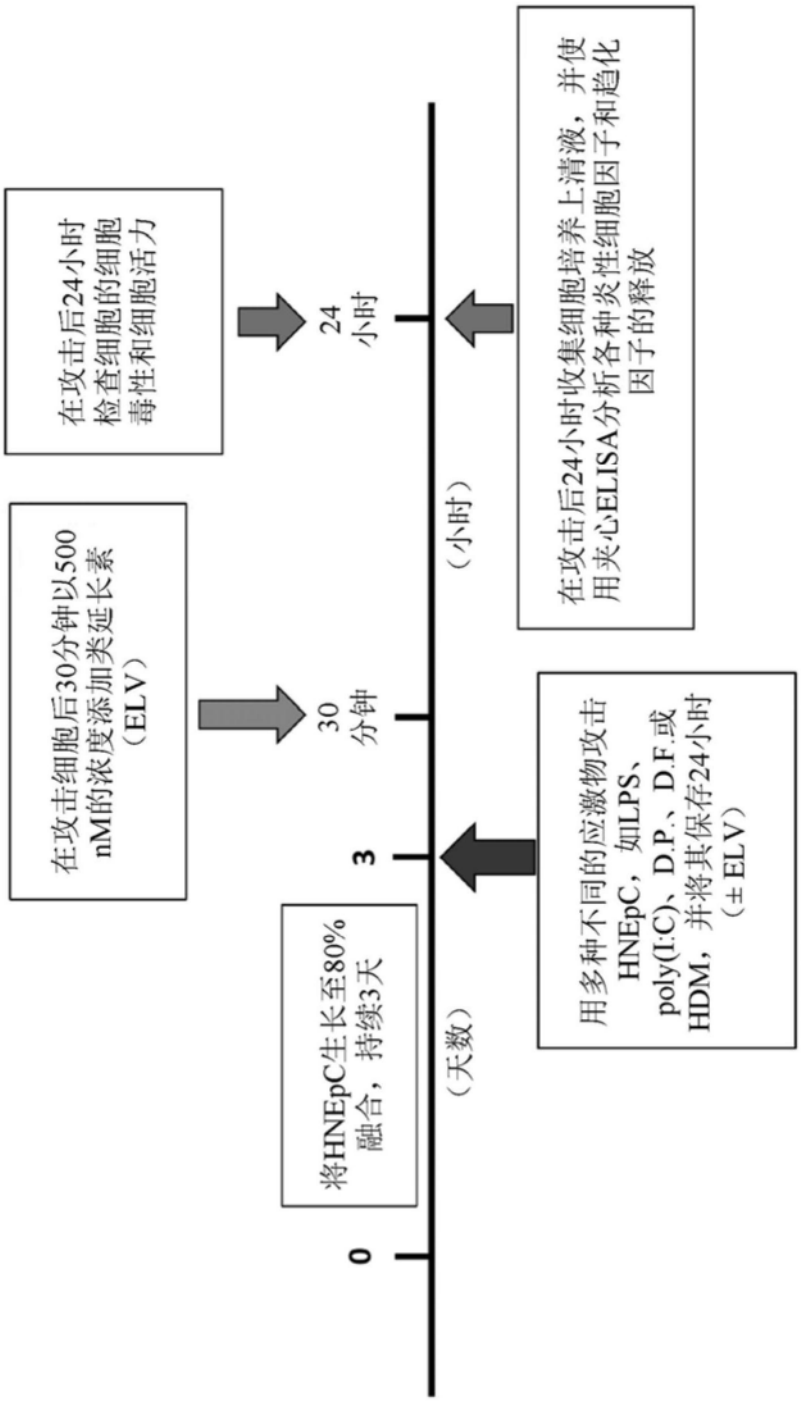

在攻击后24小时检查细胞的细胞毒性和细胞活力
24小时
在攻击细胞后30分钟以500 nM的浓度添加类延长素（ELV）
30分钟
在攻击后24小时收集细胞培养上清液，并使用夹心ELISA分析各种炎性细胞因子和趋化因子的释放
（小时）
将HNEpC生长至80%融合，持续3天
3
用多种不同的应激物攻击HNEpC，如LPS、poly(I:C)、D.P.、D.F.或HDM，并将其保存24小时（± ELV）
0
（天数）

图14

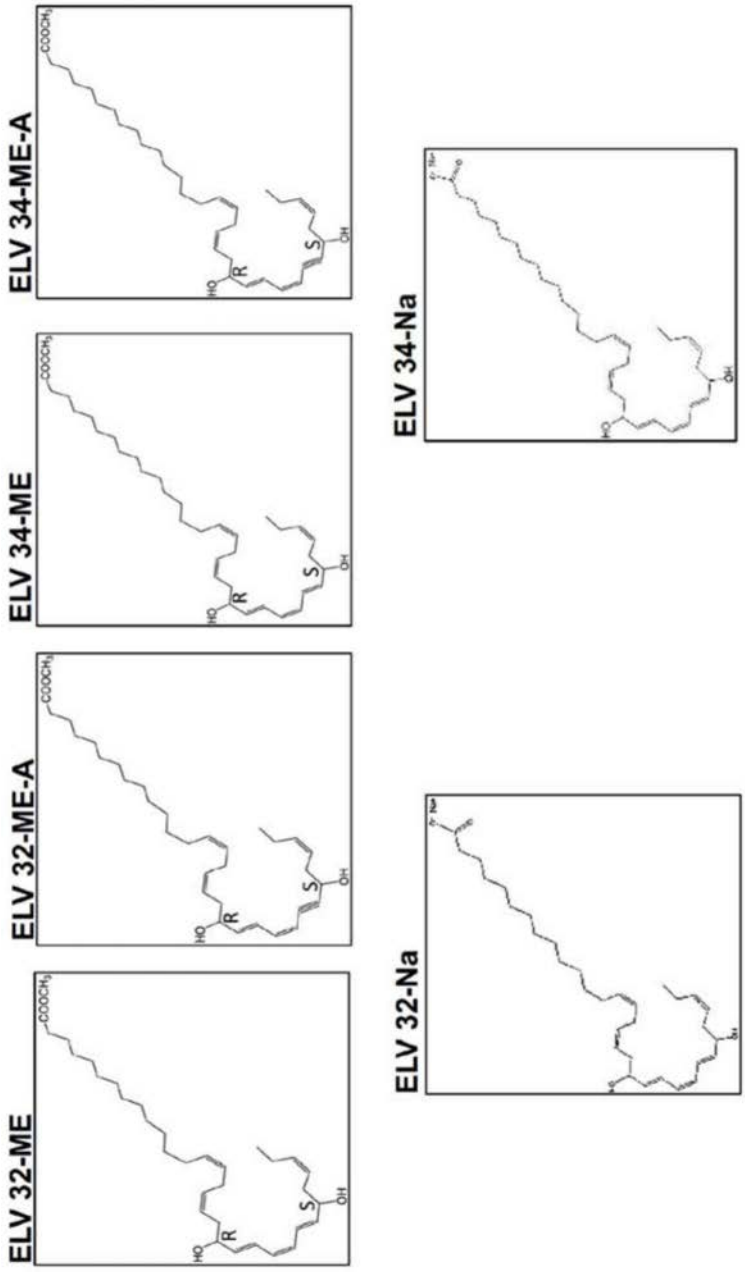


图15

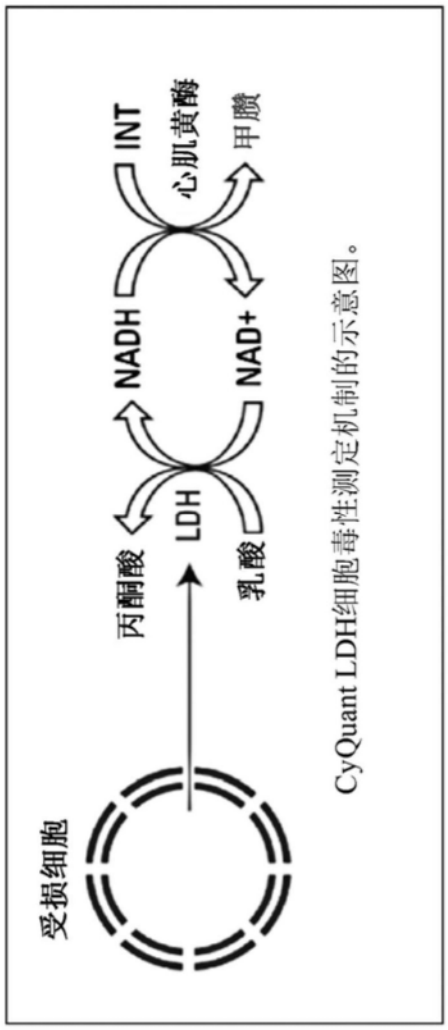

受损细胞
丙酮酸
LDH
乳酸
NADH
NAD+
INT
心肌黄酶
甲臜
CyQuant LDH细胞毒性测定机制的示意图。

图16

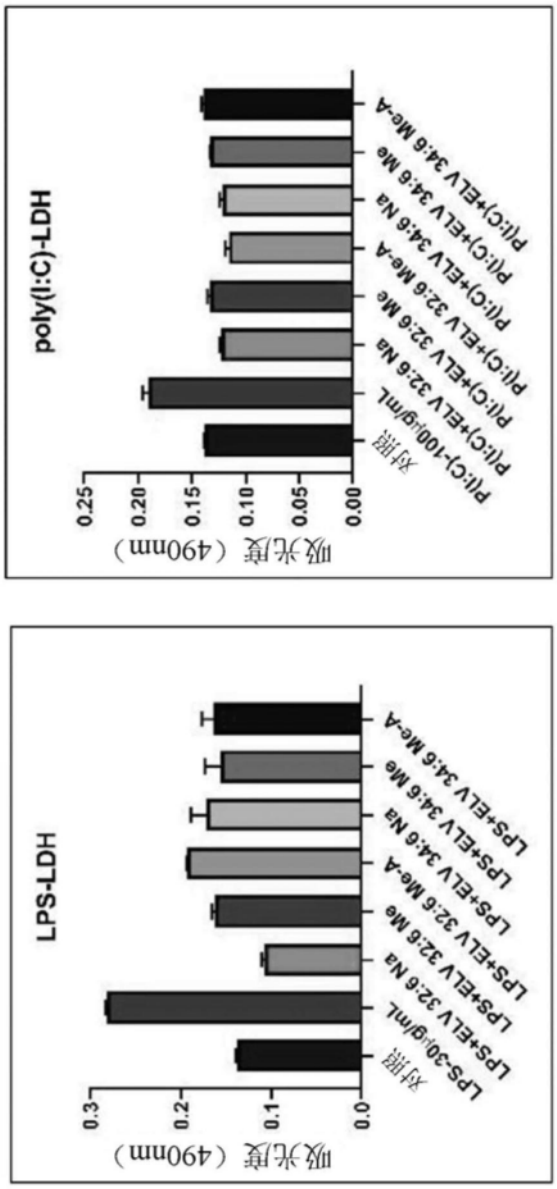

poly(I:C)-LDH
吸光度（490nm）
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
对照
Pl(I:C)+100μg/mL
Pl(I:C)+ELV 32:6 Na
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me-A
Pl(I:C)+ELV 34:6 Na
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me-A
LPS-LDH
吸光度（490nm）
0.3
0.2
0.1
0.0
对照
LPS-30μg/mL
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A

图17A

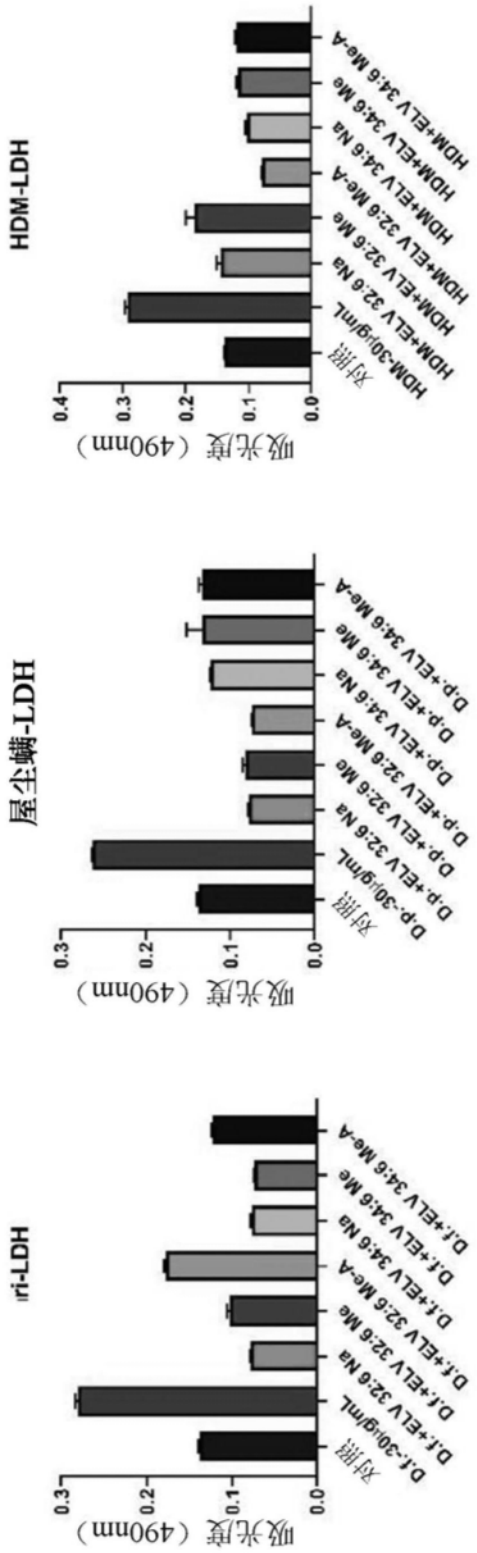

HDM-LDH
吸光度（490nm）
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
对照
HDM-30μg/mL
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
屋尘螨-LDH
吸光度（490nm）
0.0
0.1
0.2
0.3
对照
D.p.-30μg/mL
D.p.+ELV 32:6 Na
D.p.+ELV 32:6 Me
D.p.+ELV 32:6 Me-A
D.p.+ELV 34:6 Na
D.p.+ELV 34:6 Me
D.p.+ELV 34:6 Me-A
ri-LDH
吸光度（490nm）
0.0
0.1
0.2
0.3
对照
D.f.-30μg/mL
D.f.+ELV 32:6 Na
D.f.+ELV 32:6 Me
D.f.+ELV 32:6 Me-A
D.f.+ELV 34:6 Na
D.f.+ELV 34:6 Me
D.f.+ELV 34:6 Me-A

图17B

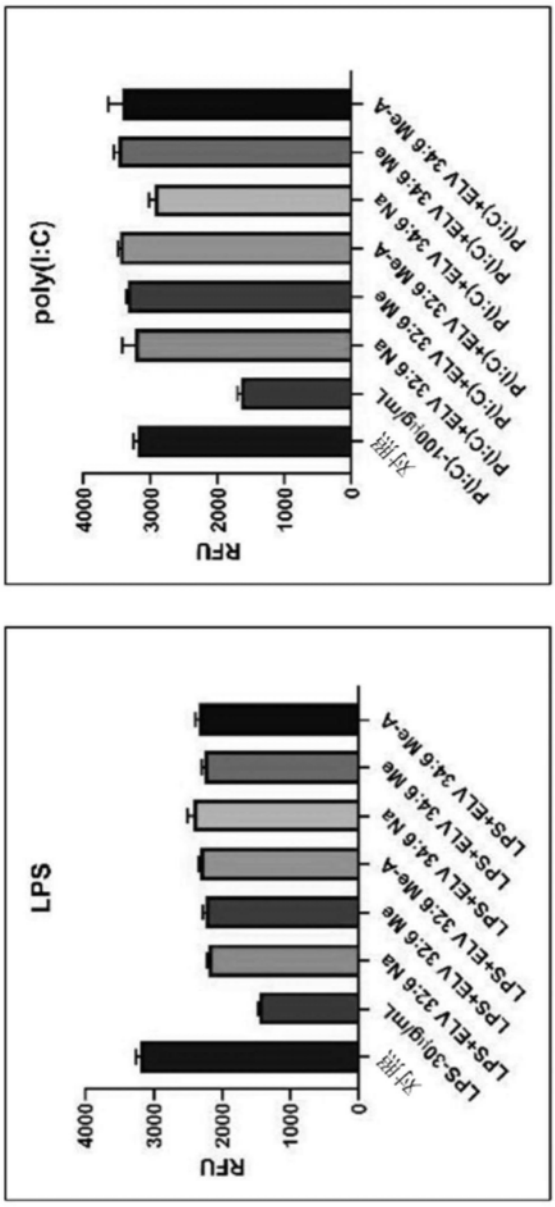

poly(I:C)
RFU
4000
3000
2000
1000
0
对照
Pl(I:C)-100μg/mL
Pl(I:C)+ELV 32:6 Na
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me-A
Pl(I:C)+ELV 34:6 Na
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me-A
LPS
RFU
4000
3000
2000
1000
0
对照
LPS-30μg/mL
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A

图18A

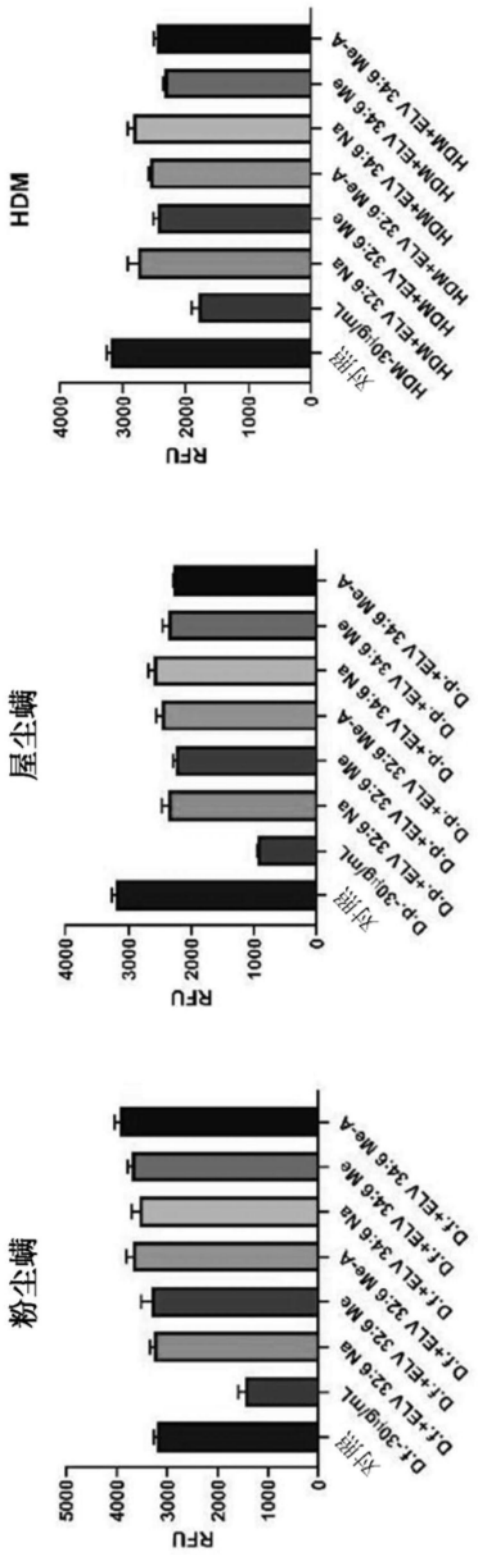

HDM
RFU
4000
3000
2000
1000
0
对照
HDM-30μg/mL
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
屋尘螨
RFU
4000
3000
2000
1000
0
对照
D.p.-30μg/mL
D.p.+ELV 32:6 Na
D.p.+ELV 32:6 Me
D.p.+ELV 32:6 Me-A
D.p.+ELV 34:6 Na
D.p.+ELV 34:6 Me
D.p.+ELV 34:6 Me-A
粉尘螨
RFU
5000
4000
3000
2000
1000
0
对照
D.f.-30μg/mL
D.f.+ELV 32:6 Na
D.f.+ELV 32:6 Me
D.f.+ELV 32:6 Me-A
D.f.+ELV 34:6 Na
D.f.+ELV 34:6 Me
D.f.+ELV 34:6 Me-A

图18B

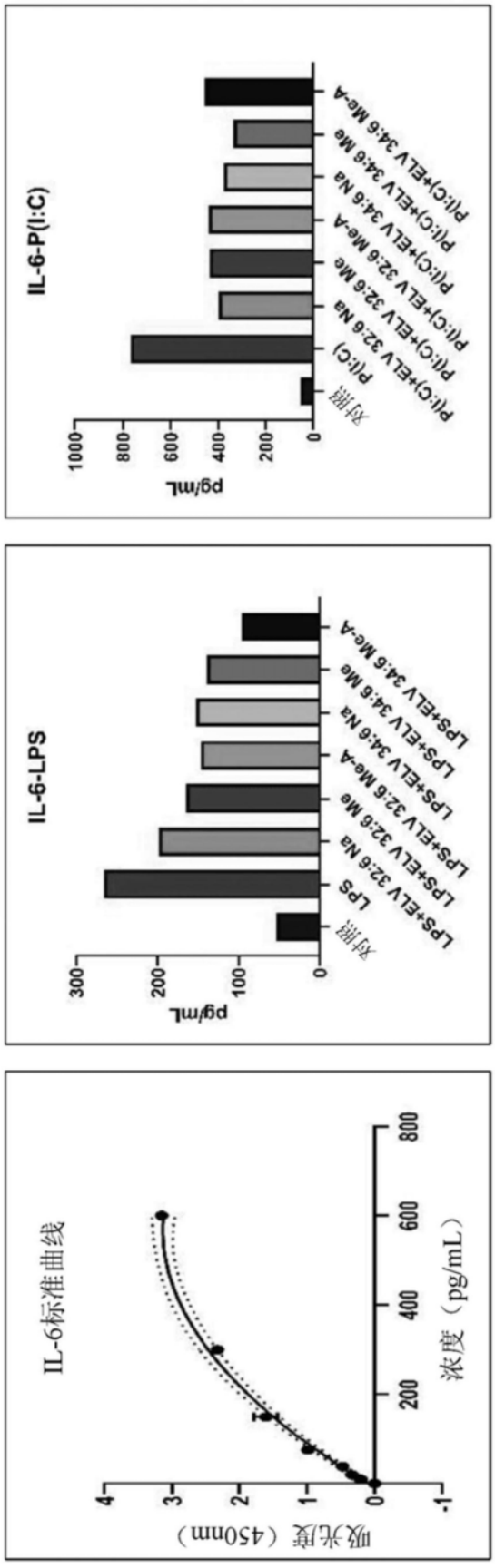

IL-6-P(I:C)
pg/mL
1000
800
600
400
200
0
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A
IL-6-LPS
pg/mL
300
200
100
0
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
IL-6标准曲线
吸光度（450nm）
4
3
2
1
0
-1
200
400
600
800
浓度（pg/mL）

图19A

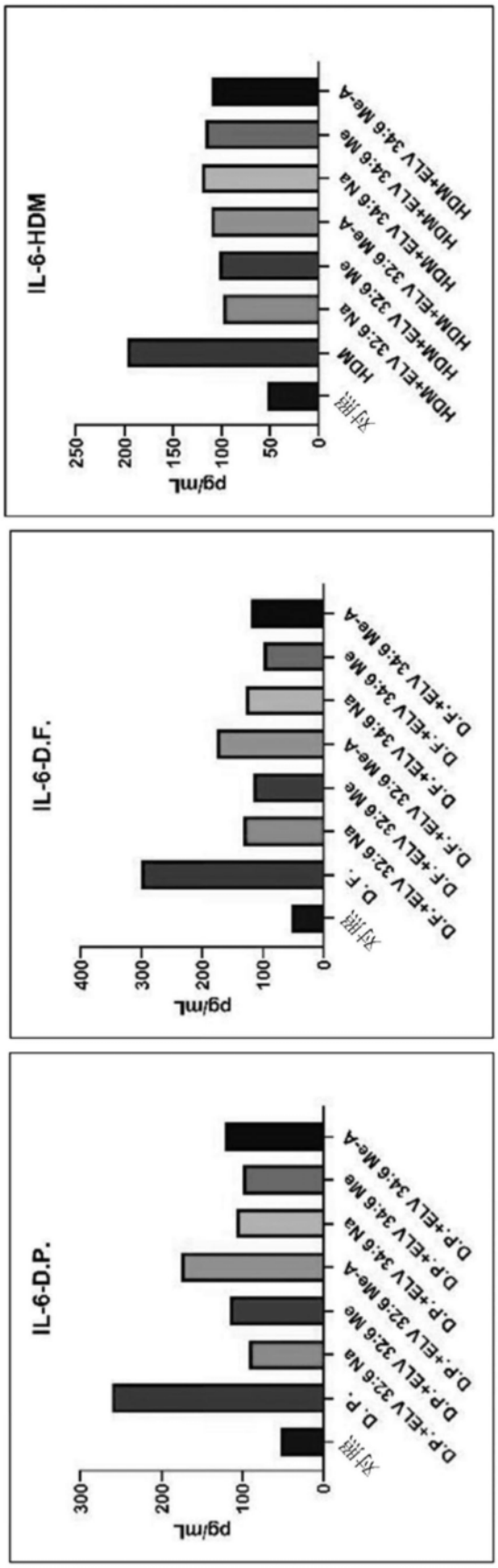

IL-6-HDM
pg/mL
250
200
150
100
50
0
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
IL-6-D.F.
pg/mL
400
300
200
100
0
对照
D.F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
IL-6-D.P.
pg/mL
300
200
100
0
对照
D.P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图19B

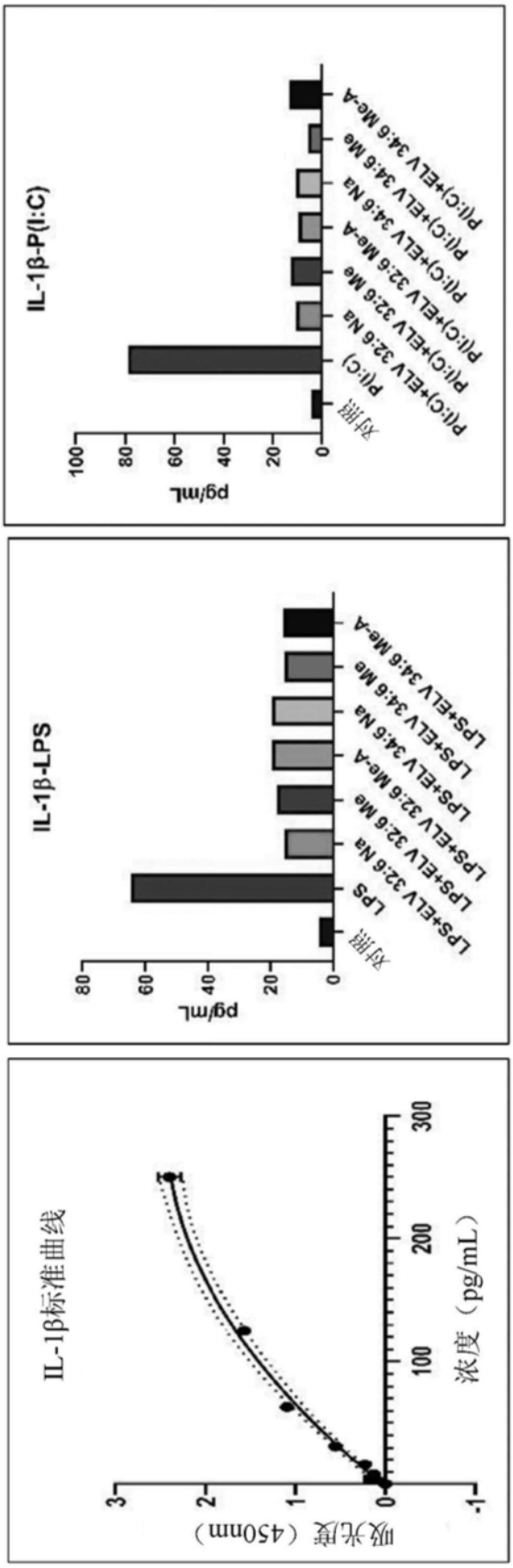

IL-1β-P(I:C)
pg/mL
100
80
60
40
20
0
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A
IL-1β-LPS
pg/mL
80
60
40
20
0
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
IL-1β标准曲线
吸光度（450nm）
3
2
1
0
-1
100
200
300
浓度（pg/mL）

图20A

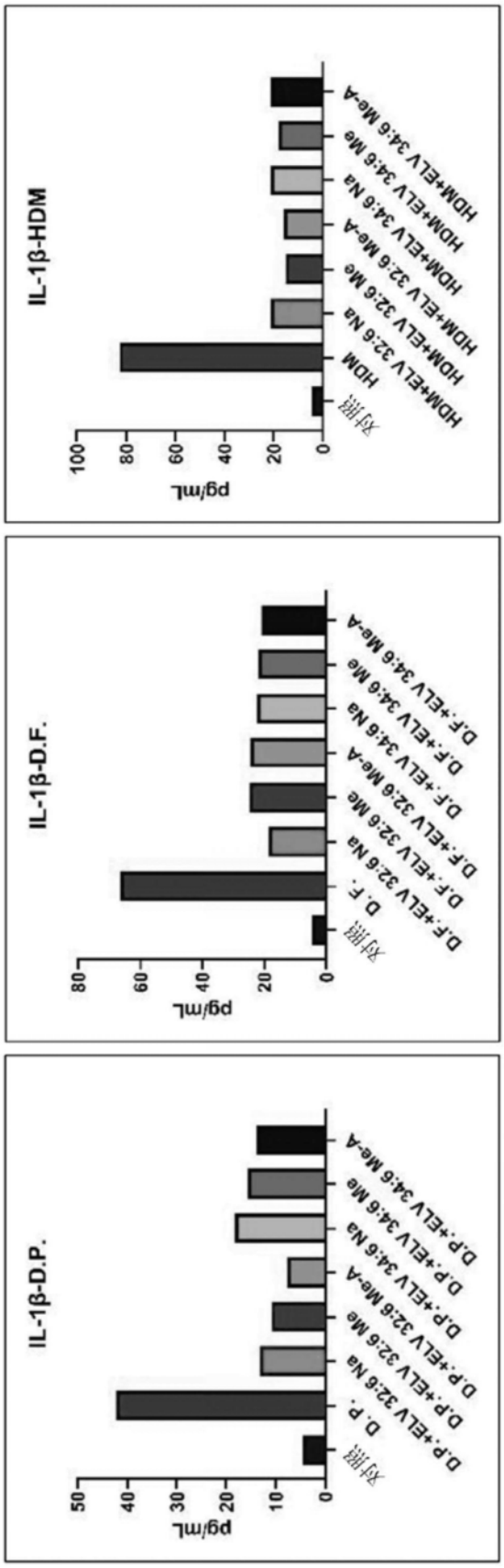

IL-1β-HDM
pg/mL
100
80
60
40
20
0
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
IL-1β-D.F.
pg/mL
80
60
40
20
0
对照
D.F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
IL-1β-D.P.
pg/mL
50
40
30
20
10
0
对照
D.P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图20B

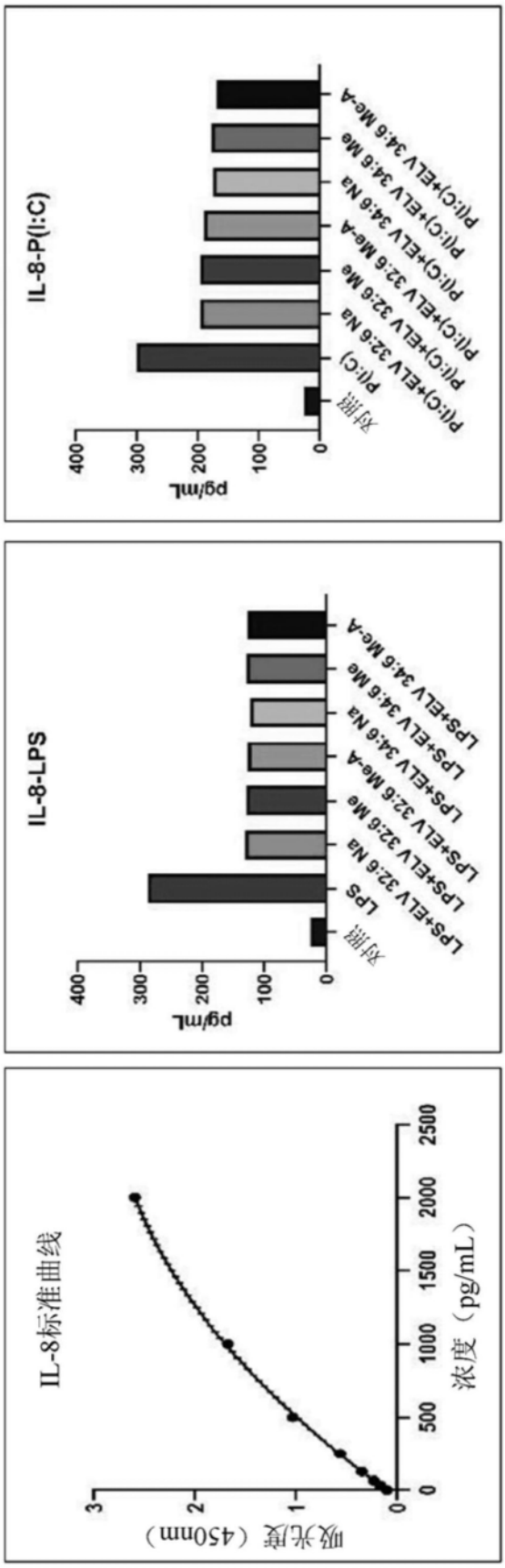

IL-8-P(I:C)
pg/mL
400
300
200
100
0
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A
IL-8-LPS
pg/mL
400
300
200
100
0
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
IL-8标准曲线
吸光度（450nm）
3
2
1
0
0
500
1000
1500
2000
2500
浓度（pg/mL）

图21A

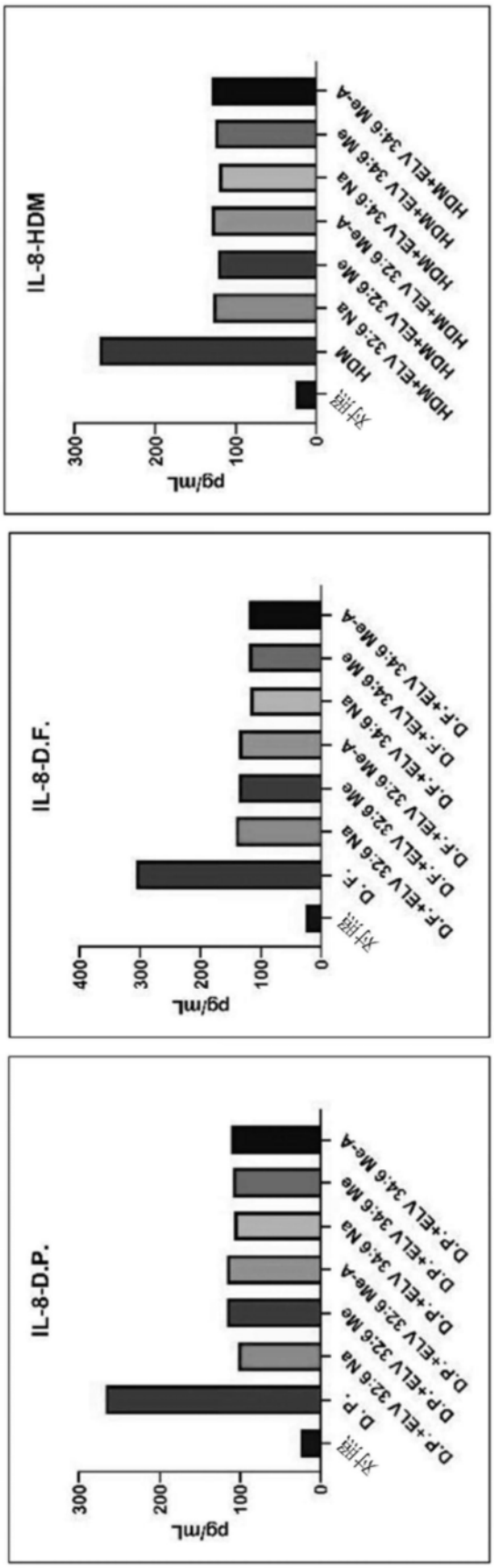

IL-8-HDM
pg/mL
300
200
100
0
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
IL-8-D.F.
pg/mL
400
300
200
100
0
对照
D.F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
IL-8-D.P.
pg/mL
300
200
100
0
对照
D.P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图21B

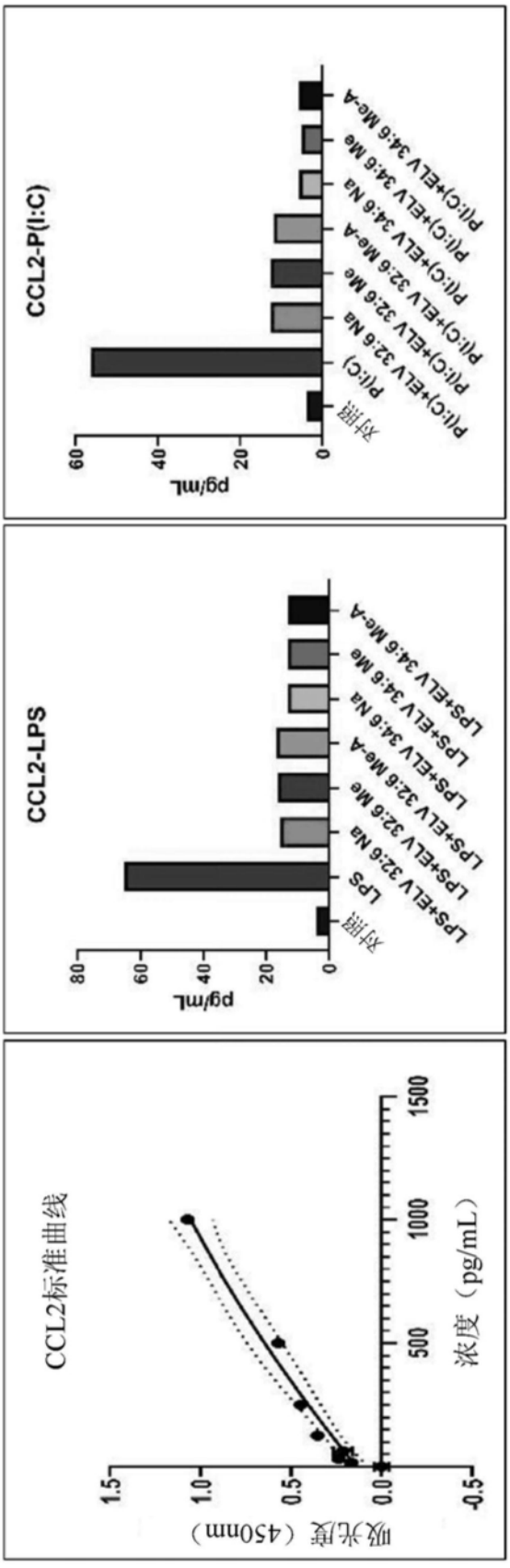

CCL2标准曲线
吸光度（450nm）
浓度（pg/mL）
CCL2-LPS
pg/mL
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
CCL2-P(I:C)
pg/mL
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A

图22A

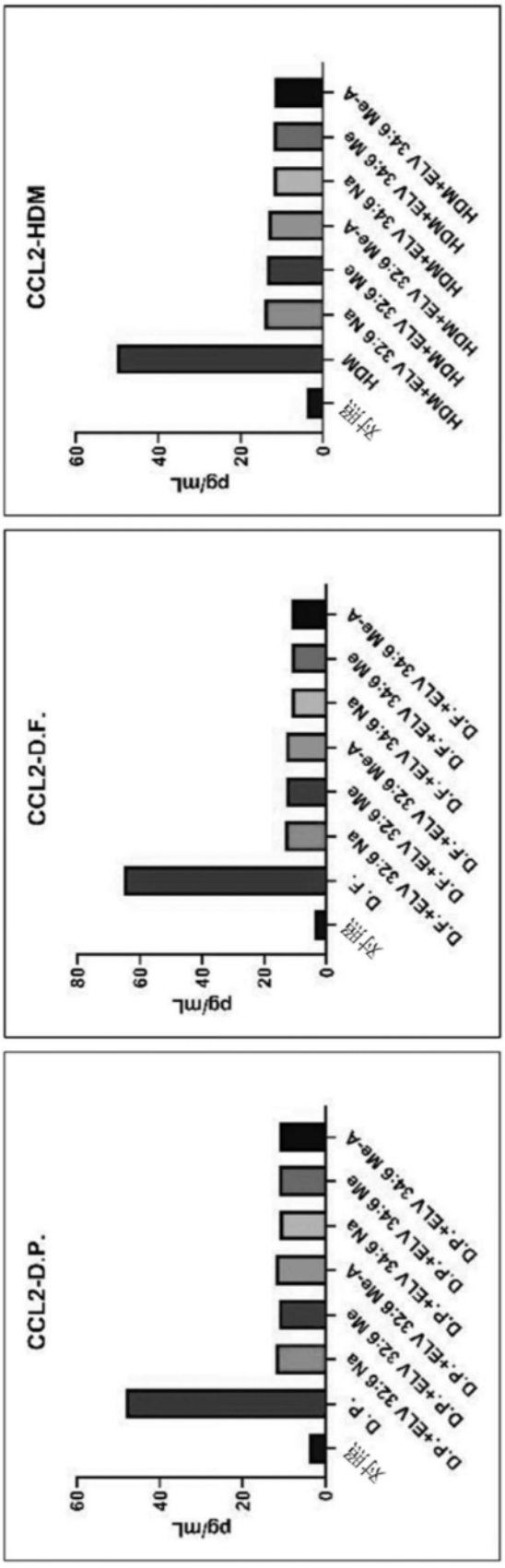

CCL2-HDM
pg/mL
0
20
40
60
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
CCL2-D.F.
pg/mL
0
20
40
60
80
对照
D. F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
CCL2-D.P.
pg/mL
0
20
40
60
对照
D. P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图22B

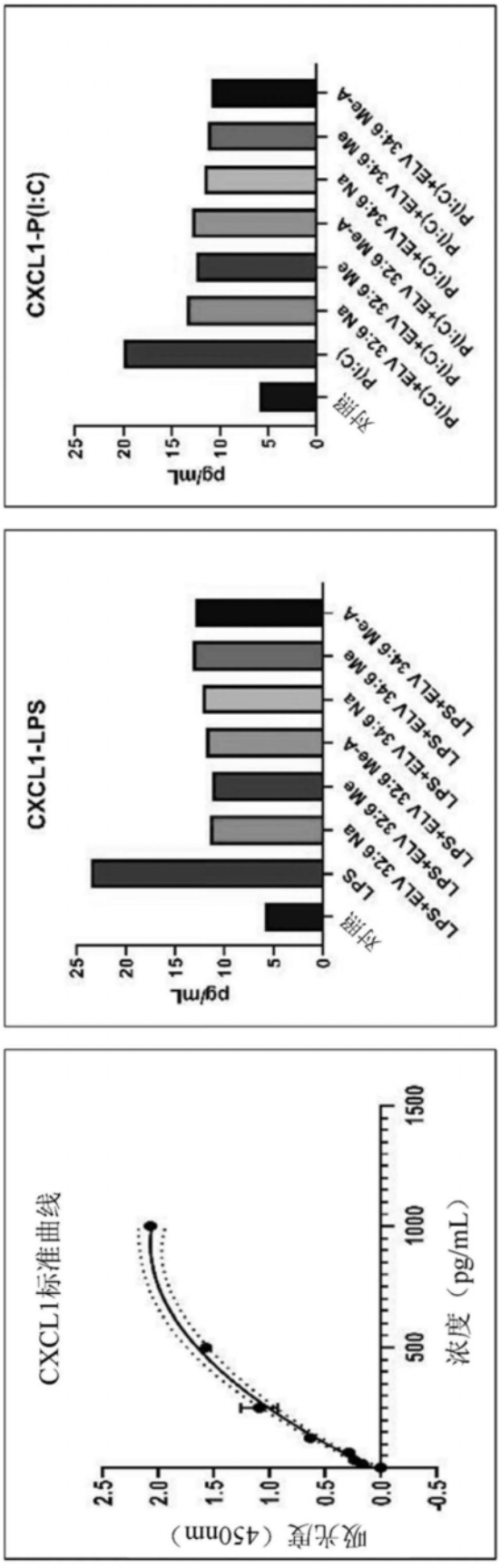

CXCL1-P(I:C)
pg/mL
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A
CXCL1-LPS
pg/mL
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
CXCL1标准曲线
吸光度（450nm）
浓度（pg/mL）

图23A

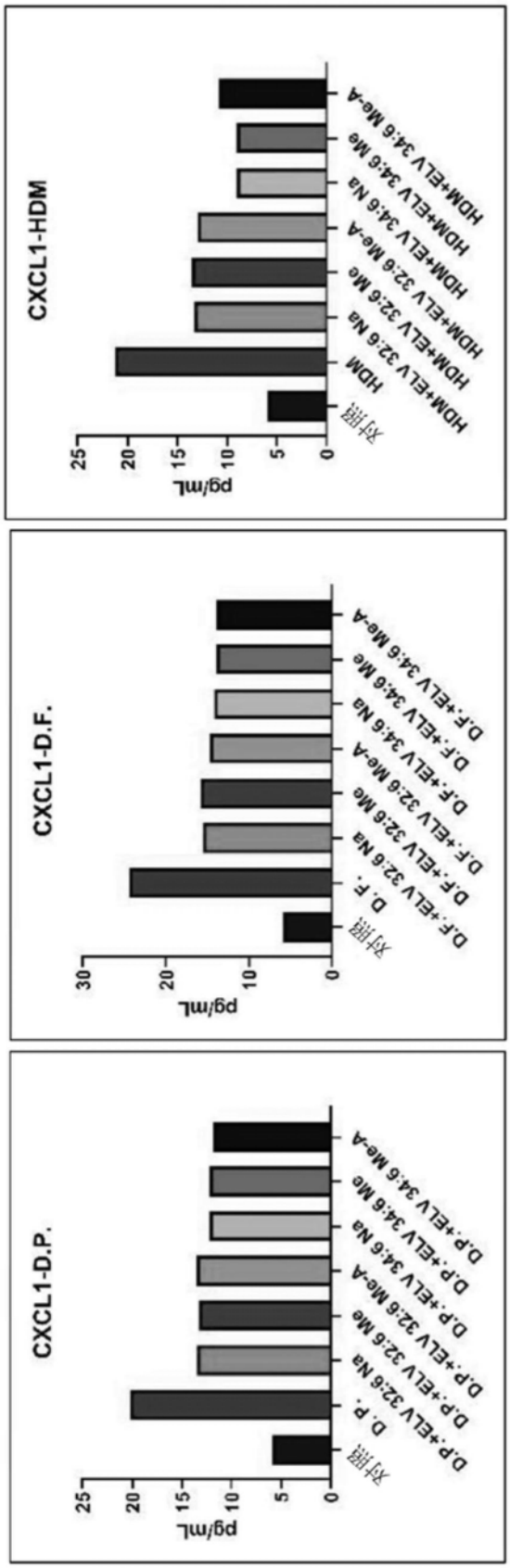

CXCL1-HDM
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
CXCL1-D.F.
pg/mL
0
10
20
30
对照
D.F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
CXCL1-D.P.
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
D.P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图23B

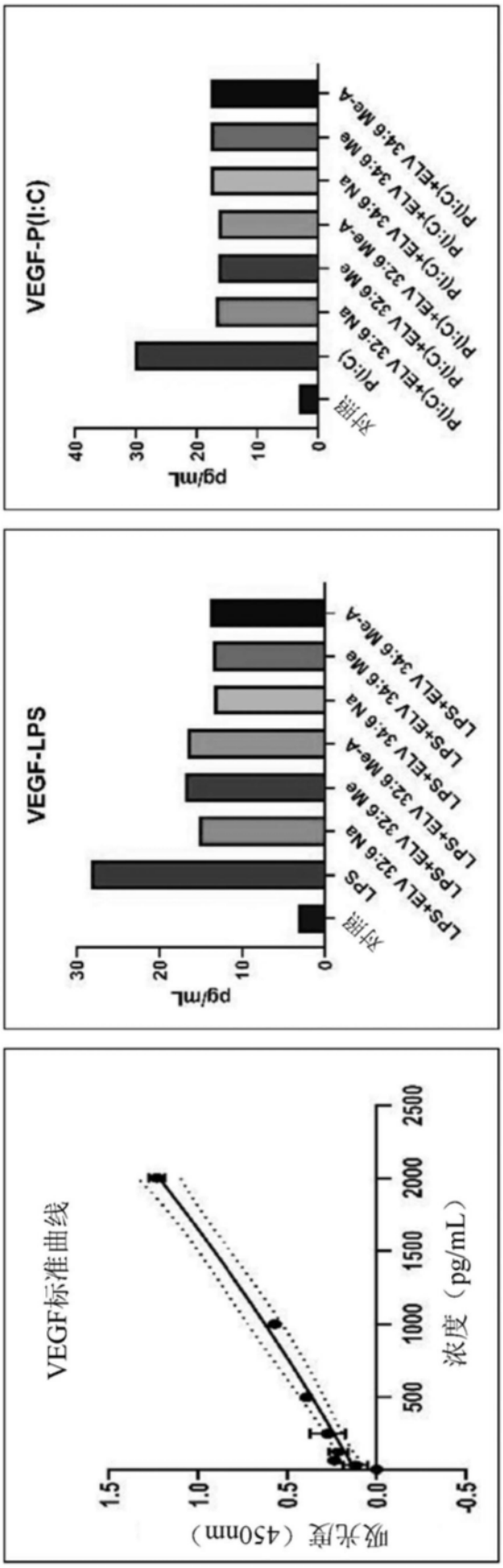

VEGF-P(I:C)
pg/mL
0
10
20
30
40
对照
Pl(I:C)
Pl(I:C)+ELV 32:6 Na
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me-A
Pl(I:C)+ELV 34:6 Na
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me-A
VEGF-LPS
pg/mL
0
10
20
30
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
VEGF标准曲线
吸光度（450nm）
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
浓度（pg/mL）
500
1000
1500
2000
2500

图24A

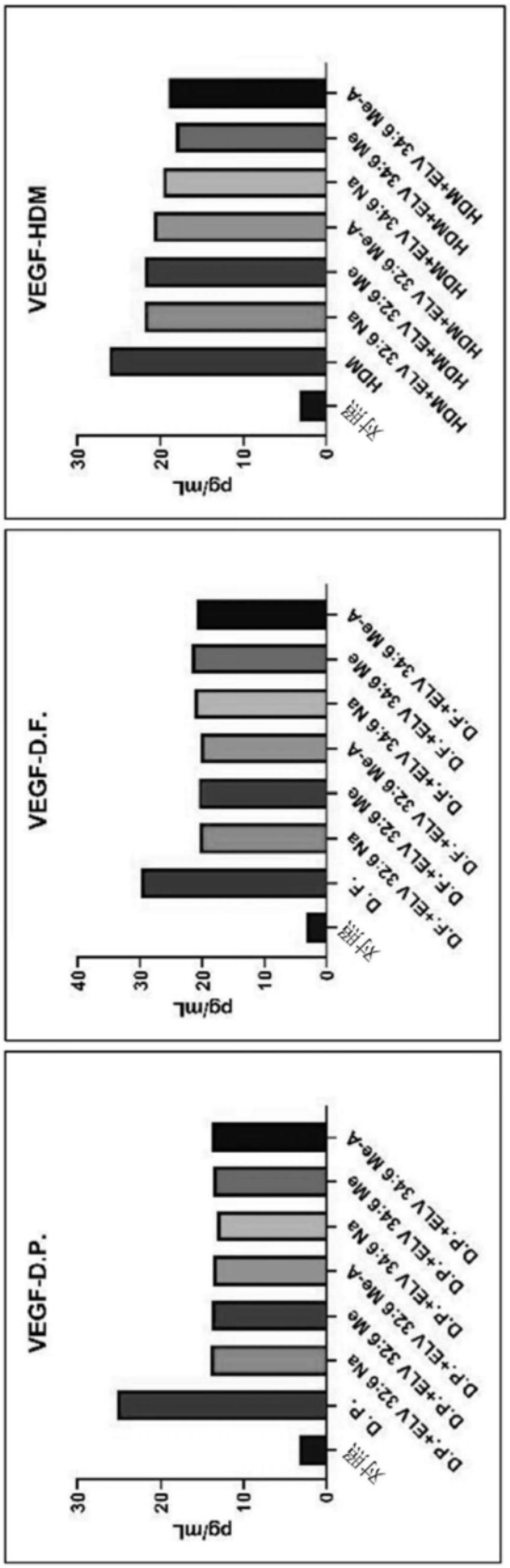

VEGF-HDM
pg/mL
0
10
20
30
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
VEGF-D.F.
pg/mL
0
10
20
30
40
对照
D. F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
VEGF-D.P.
pg/mL
0
10
20
30
对照
D. P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图24B

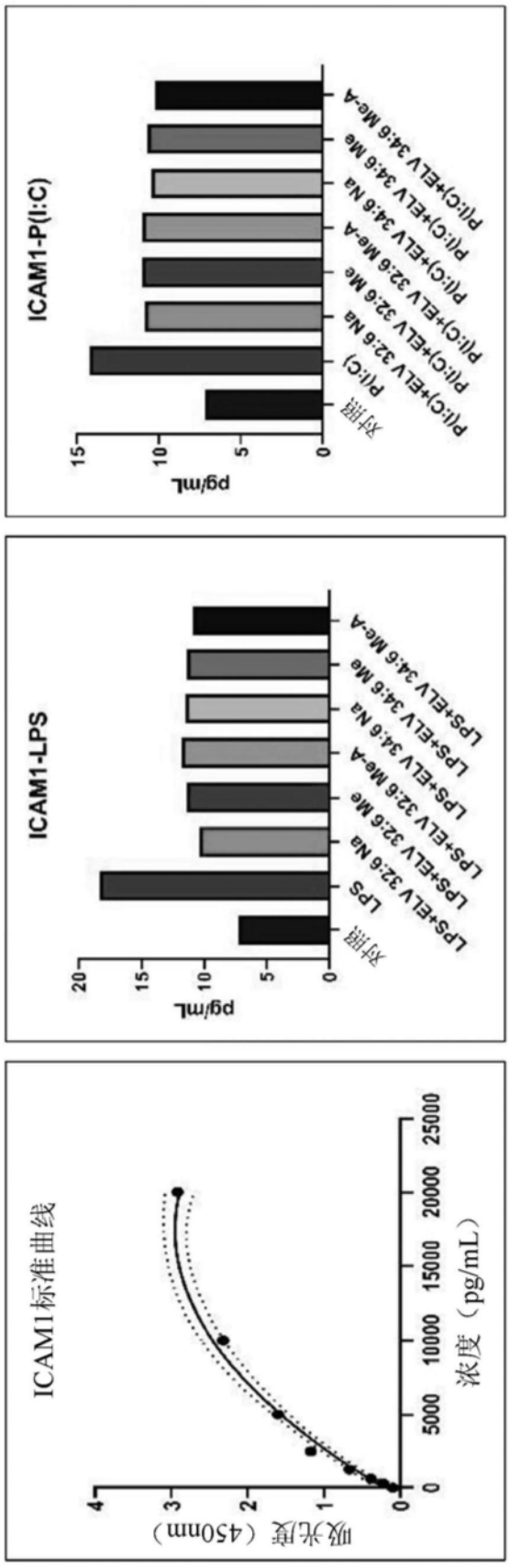

ICAM1标准曲线
吸光度（450nm）
浓度（pg/mL）
0
5000
10000
15000
20000
25000
ICAM1-LPS
pg/mL
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
ICAM1-P(I:C)
pg/mL
对照
Pl(I:C)
Pl(I:C)+ELV 32:6 Na
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me
Pl(I:C)+ELV 32:6 Me-A
Pl(I:C)+ELV 34:6 Na
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me
Pl(I:C)+ELV 34:6 Me-A

图25A

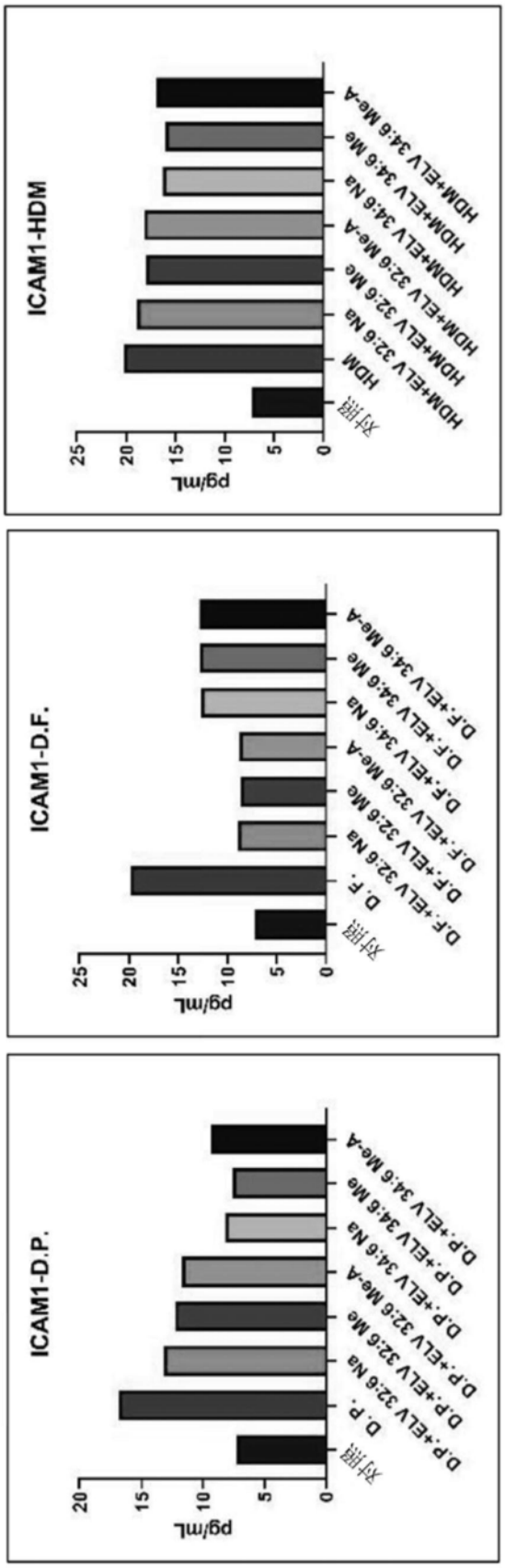

ICAM1-HDM
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
ICAM1-D.F.
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
D. F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
ICAM1-D.P.
pg/mL
0
5
10
15
20
对照
D. P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图25B

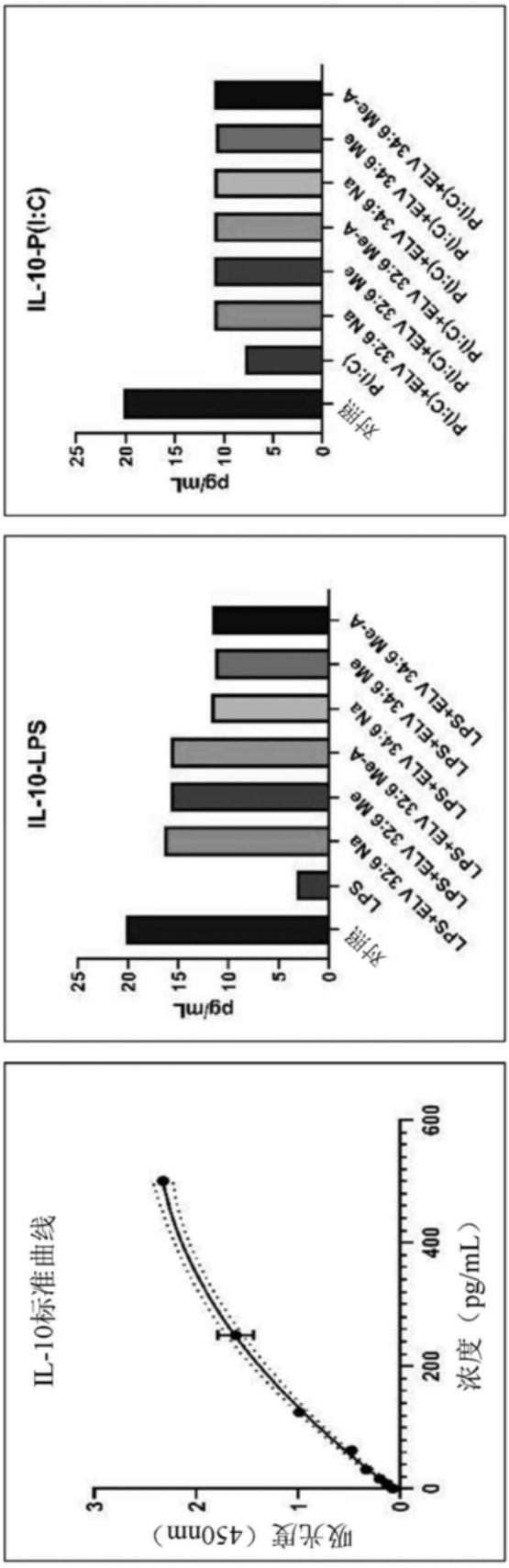

IL-10标准曲线
吸光度（450nm）
浓度（pg/mL）
0
200
400
600
1
2
3
IL-10-LPS
pg/mL
对照
LPS
LPS+ELV 32:6 Na
LPS+ELV 32:6 Me
LPS+ELV 32:6 Me-A
LPS+ELV 34:6 Na
LPS+ELV 34:6 Me
LPS+ELV 34:6 Me-A
IL-10-P(I:C)
pg/mL
对照
P(I:C)
P(I:C)+ELV 32:6 Na
P(I:C)+ELV 32:6 Me
P(I:C)+ELV 32:6 Me-A
P(I:C)+ELV 34:6 Na
P(I:C)+ELV 34:6 Me
P(I:C)+ELV 34:6 Me-A

图26A

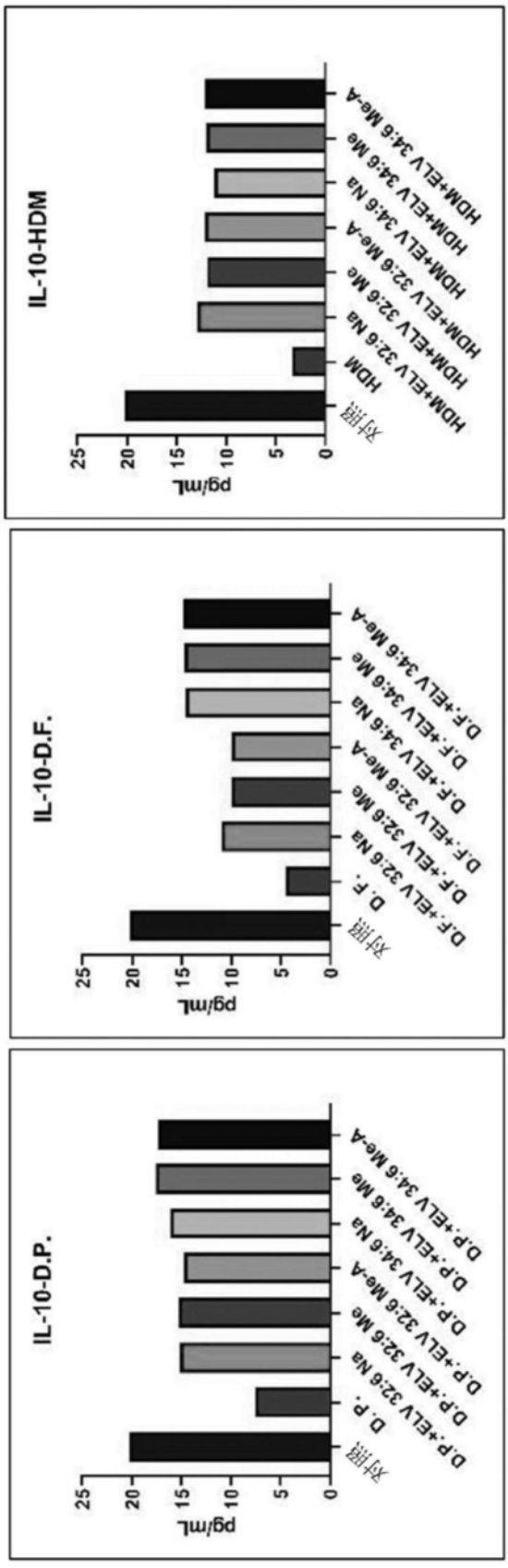

IL-10-HDM
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
HDM
HDM+ELV 32:6 Na
HDM+ELV 32:6 Me
HDM+ELV 32:6 Me-A
HDM+ELV 34:6 Na
HDM+ELV 34:6 Me
HDM+ELV 34:6 Me-A
IL-10-D.F.
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
D.F.
D.F.+ELV 32:6 Na
D.F.+ELV 32:6 Me
D.F.+ELV 32:6 Me-A
D.F.+ELV 34:6 Na
D.F.+ELV 34:6 Me
D.F.+ELV 34:6 Me-A
IL-10-D.P.
pg/mL
0
5
10
15
20
25
对照
D.P.
D.P.+ELV 32:6 Na
D.P.+ELV 32:6 Me
D.P.+ELV 32:6 Me-A
D.P.+ELV 34:6 Na
D.P.+ELV 34:6 Me
D.P.+ELV 34:6 Me-A

图26B

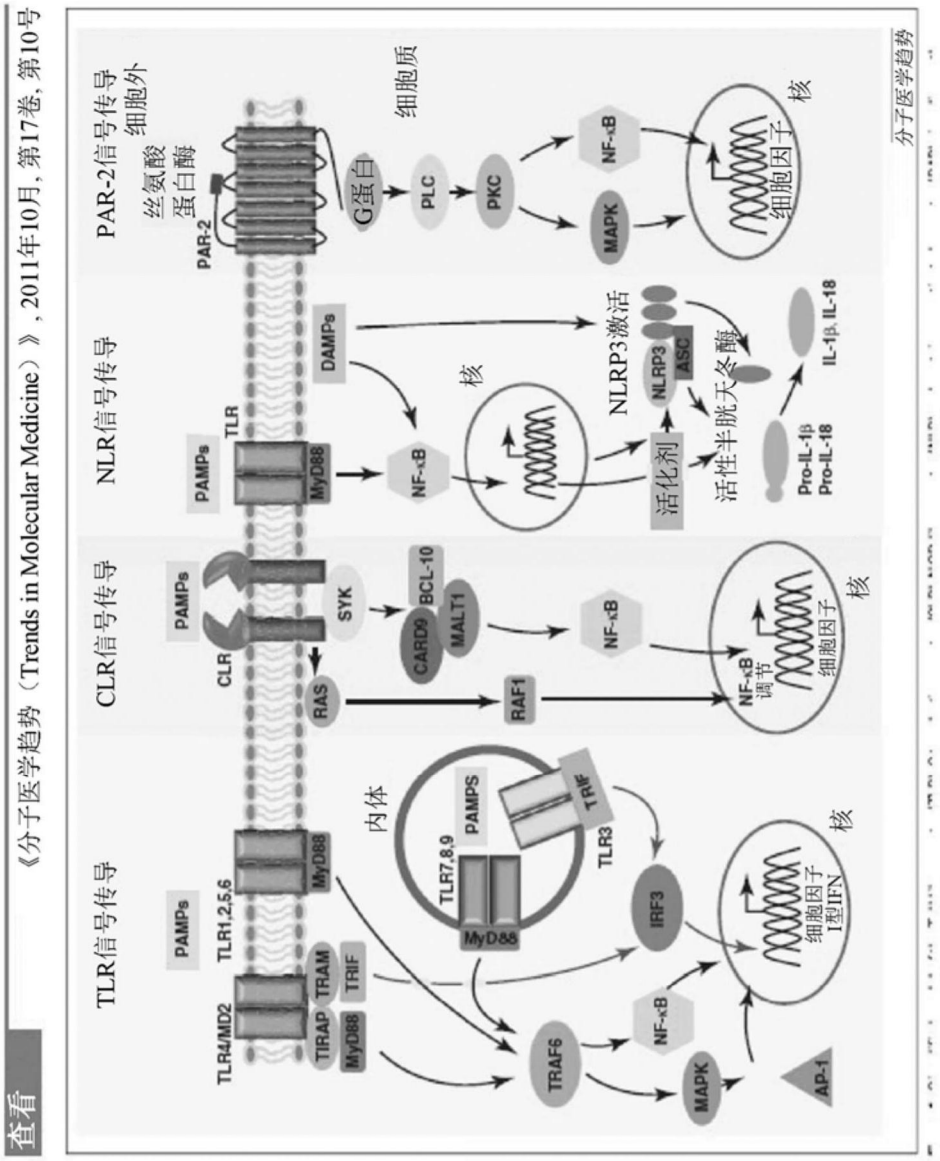

查看
《分子医学趋势（Trends in Molecular Medicine）》，2011年10月，第17卷，第10号
TLR信号传导
CLR信号传导
NLR信号传导
PAR-2信号传导
细胞外
丝氨酸蛋白酶
PAR-2
G蛋白
细胞质
PLC
PKC
NF-κB
MAPK
细胞因子
核
PAMPs
TLR
MyD88
DAMPs
NF-κB
核
NLRP3激活
NLRP3
ASC
活化剂
活性半胱天冬酶
Pro-IL-1β
Pro-IL-18
IL-1β, IL-18
CLR
SYK
CARD9
BCL-10
MALT1
RAS
RAF1
NF-κB
NF-κB调节细胞因子
核
TLR4/MD2
TLR1,2,5,6
TIRAP
TRAM
TRIF
MyD88
内体
TLR7,8,9
PAMPS
MyD88
TRIF
TLR3
IRF3
TRAF6
NF-κB
MAPK
AP-1
细胞因子I型IFN
核
分子医学趋势

图27

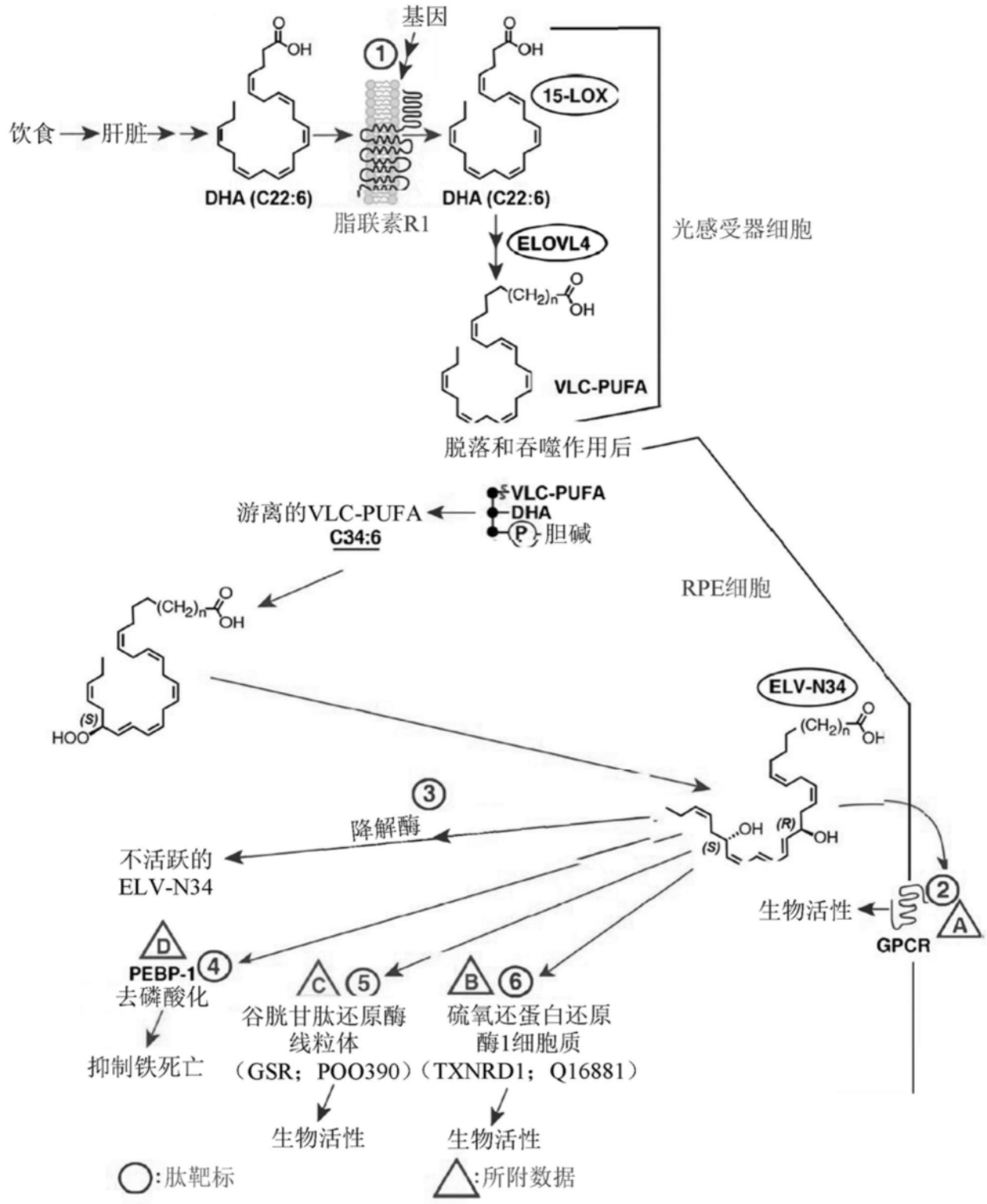

基因
饮食
肝脏
DHA (C22:6)
脂联素R1
DHA (C22:6)
15-LOX
ELOVL4
VLC-PUFA
光感受器细胞
脱落和吞噬作用后
游离的VLC-PUFA
C34:6
VLC-PUFA
DHA
胆碱
RPE细胞
ELV-N34
降解酶
不活跃的
ELV-N34
生物活性
GPCR
PEBP-1
去磷酸化
抑制铁死亡
谷胱甘肽还原酶
线粒体
（GSR；POO390）
硫氧还蛋白还原
酶1细胞质
（TXNRD1；Q16881）
生物活性
生物活性
:肽靶标
:所附数据

图28

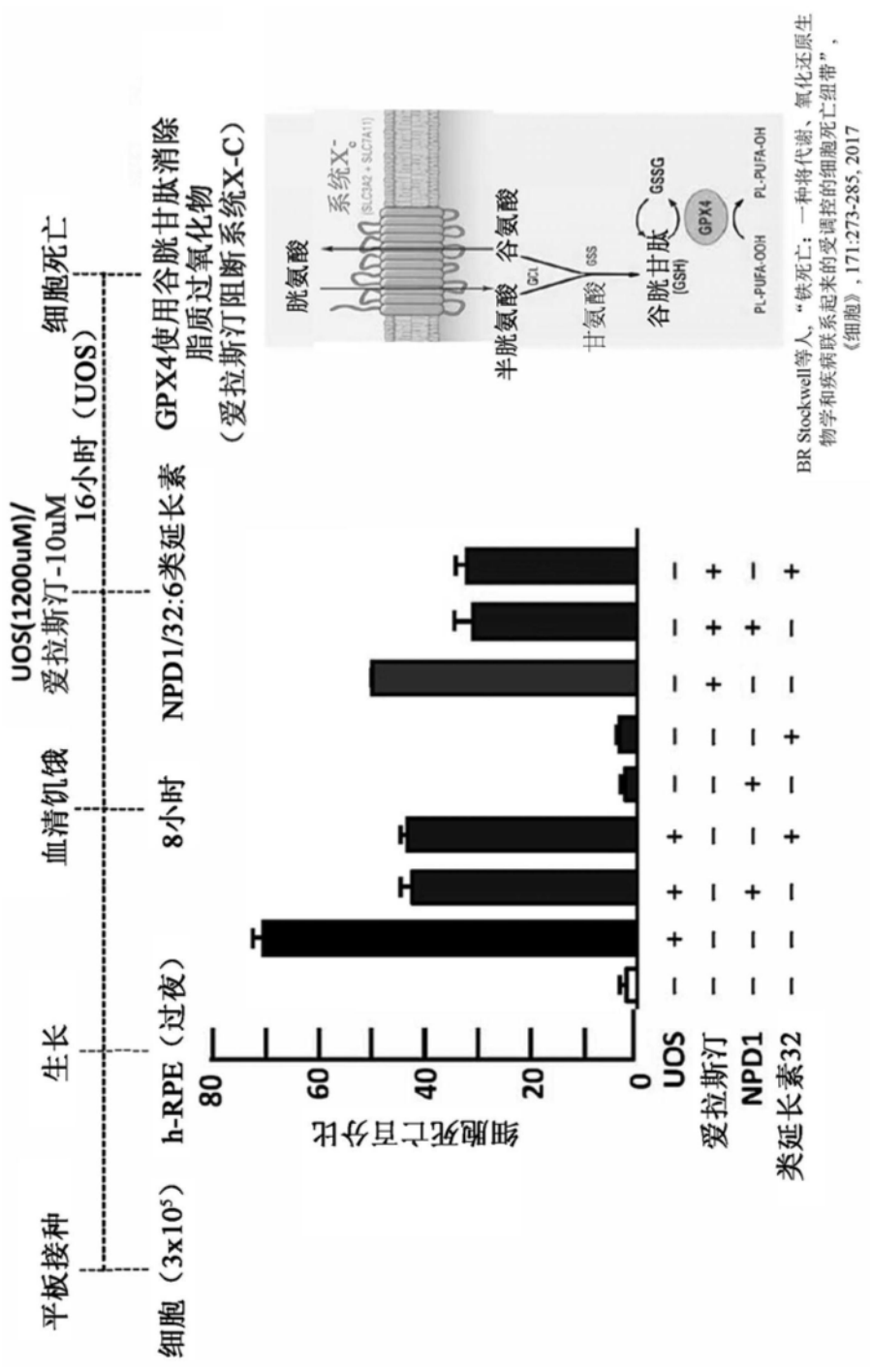

平板接种
生长
血清饥饿
UOS(1200uM)/
爱拉斯汀-10uM
16小时（UOS）
细胞死亡
细胞（3x10⁵）
h-RPE（过夜）
8小时
NPD1/32:6类延长素
GPX4使用谷胱甘肽消除
脂质过氧化物
（爱拉斯汀阻断系统X-C）
胱氨酸
系统X_c^-
(SLC3A2 + SLC7A11)
半胱氨酸
谷氨酸
GCL
甘氨酸
GSS
谷胱甘肽
(GSH)
GSSG
GPX4
PL-PUFA-OOH
PL-PUFA-OH
细胞死亡百分比
80
60
40
20
0
UOS
爱拉斯汀
NPD1
类延长素32
BR Stockwell等人，“铁死亡：一种将代谢、氧化还原生物学和疾病联系起来的受调控的细胞死亡纽带”，《细胞》，171:273-285, 2017

图29

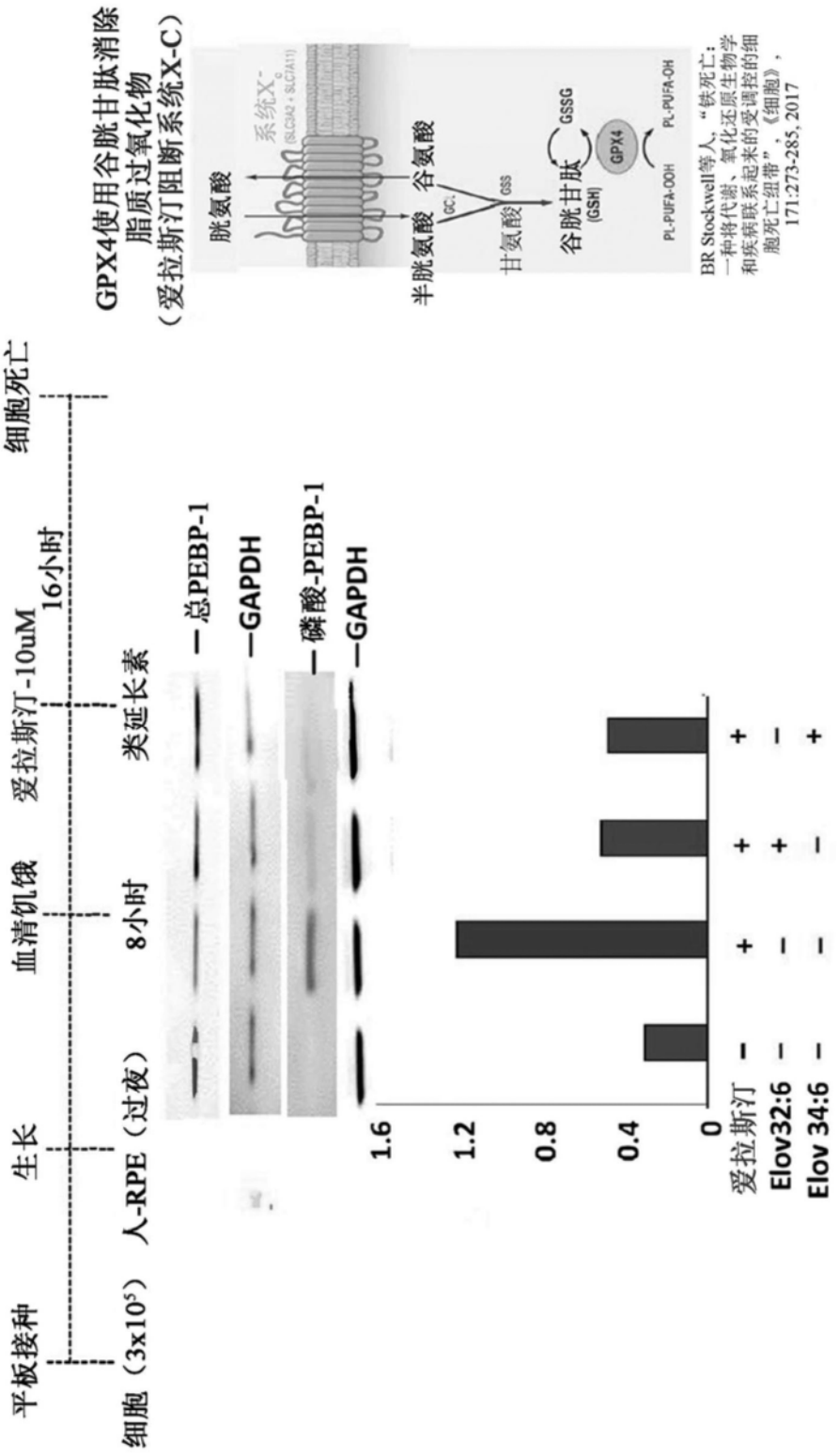

GPX4使用谷胱甘肽消除脂质过氧化物（爱拉斯汀阻断系统X-C）
胱氨酸
系统X⁻c
(SLC3A2 + SLC7A11)
半胱氨酸
谷氨酸
GC;
甘氨酸
GSS
谷胱甘肽
(GSH)
GSSG
GPX4
PL-PUFA-OOH
PL-PUFA-OH
BR Stockwell等人，“铁死亡：一种待代谢、氧化还原生物学和疾病联系起来的受调控的细胞死亡纽带”，《细胞》，171:273-285, 2017
细胞死亡
平板接种
生长
血清饥饿
爱拉斯汀-10uM
16小时
细胞（3x10⁵）
人-RPE（过夜）
8小时
类延长素
总PEBP-1
GAPDH
磷酸-PEBP-1
GAPDH
1.6
1.2
0.8
0.4
0
爱拉斯汀 – + + +
Elov32:6 – – + –
Elov 34:6 – – – +

图30

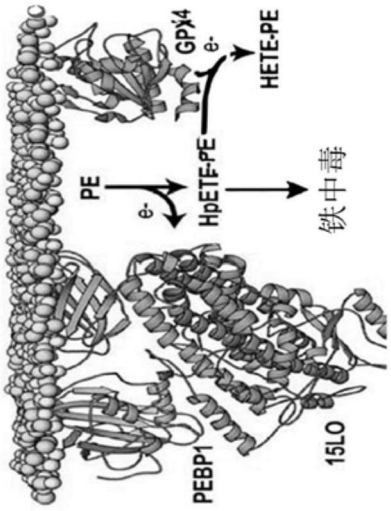


图30续

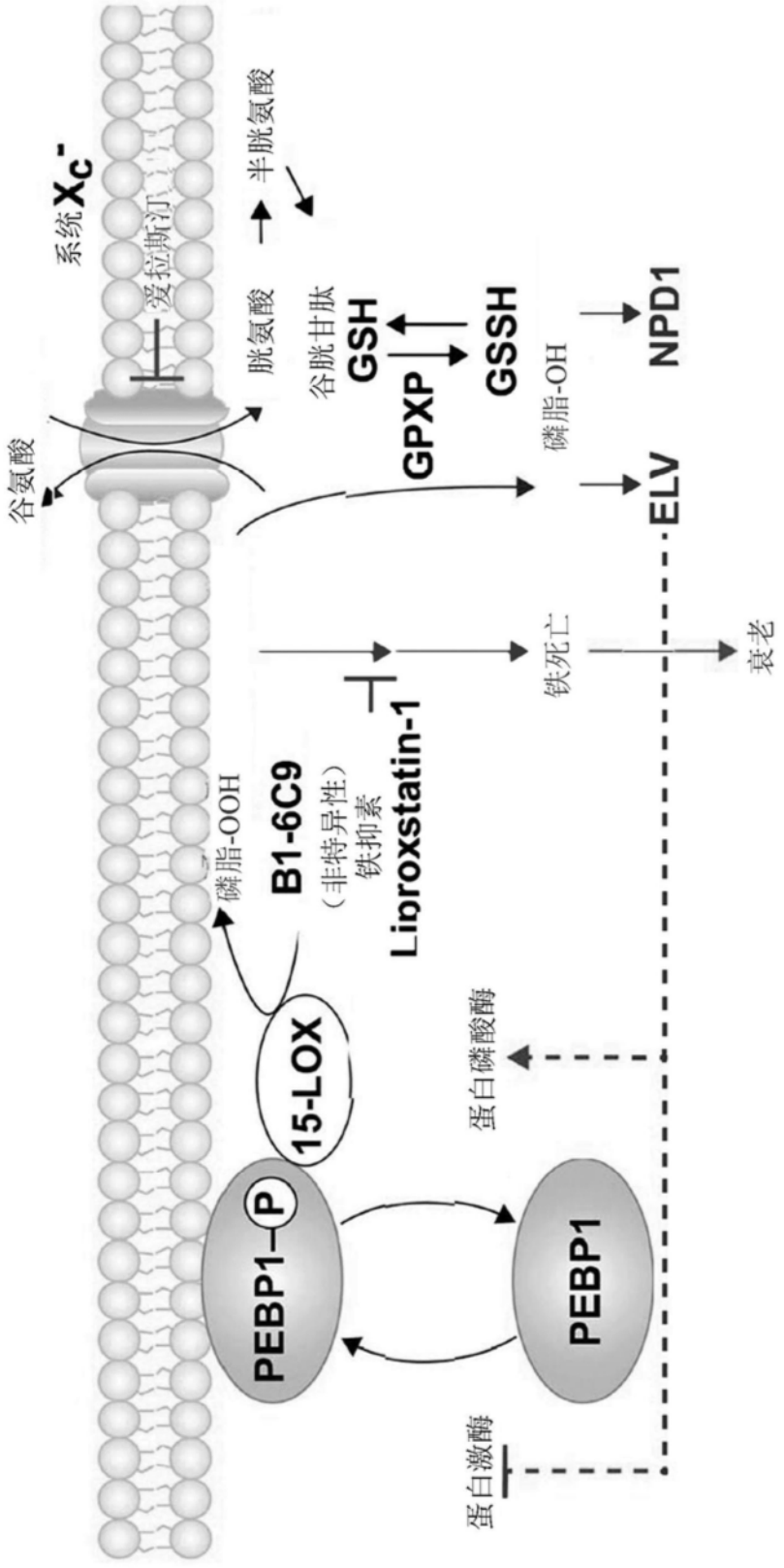

系统Xc-
爱拉斯汀
半胱氨酸
胱氨酸
谷氨酸
谷胱甘肽
GSH
GPXP
GSSH
磷脂-OH
NPD1
ELV
铁死亡
衰老
B1-6C9
（非特异性）
铁抑素
Liproxstatin-1
磷脂-OOH
15-LOX
蛋白磷酸酶
PEBP1–P
PEBP1
蛋白激酶

图31

《元基因（Meta Gene）》2(1):164-175, 2014

糖基化TM蛋白，细胞外卷曲相关的富含半胱氨酸的结构域，其识别卷曲的Wnt受体

MFRP与CTRP5一起由双顺反子消息编码。

CTRP5突变与迟发性视网膜变性有关。

图32

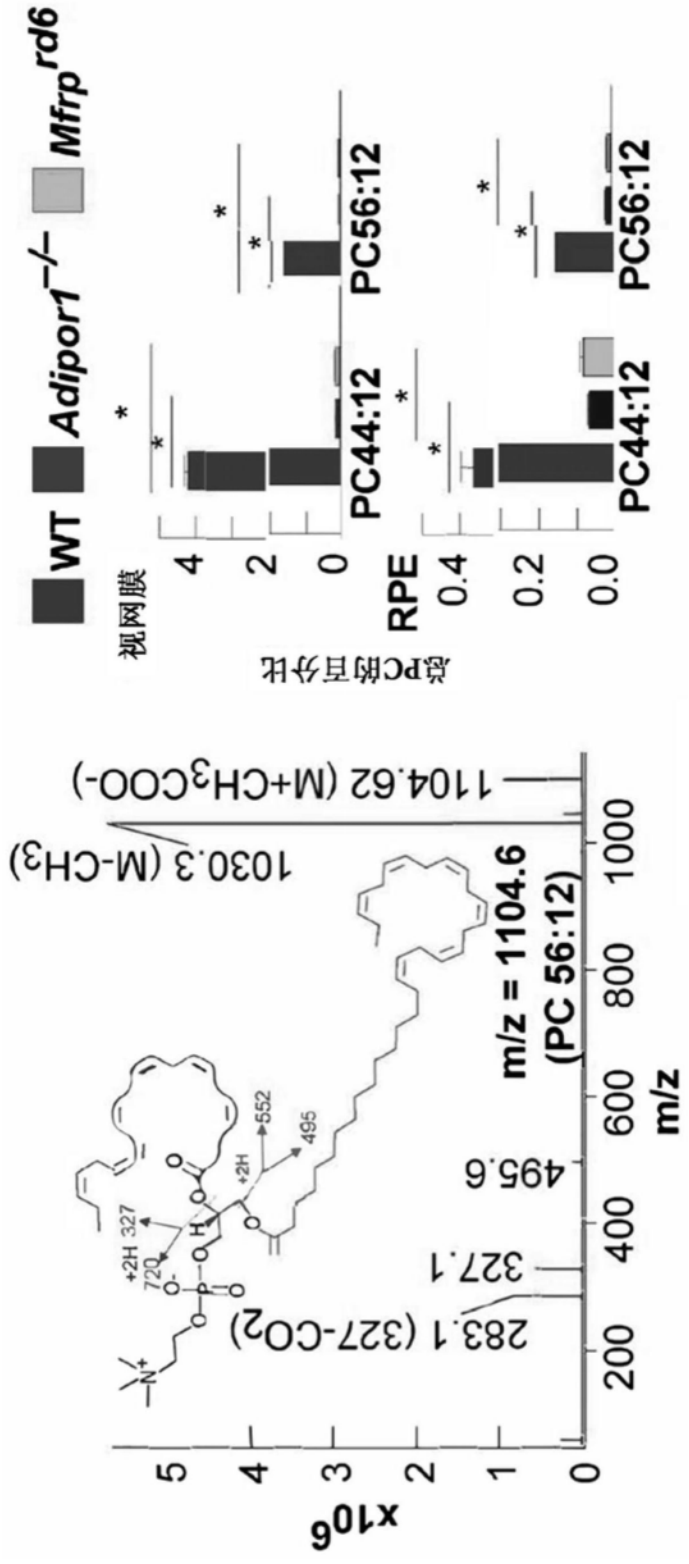

WT
Adipor1−/−
Mfrp rd6
视网膜
RPE
PC44:12
PC56:12
总PC的百分比
m/z = 1104.6
(PC 56:12)
1104.62 (M+CH3COO-)
1030.3 (M-CH3)
495.6
327.1
283.1 (327-CO2)
m/z
x10^6

图33

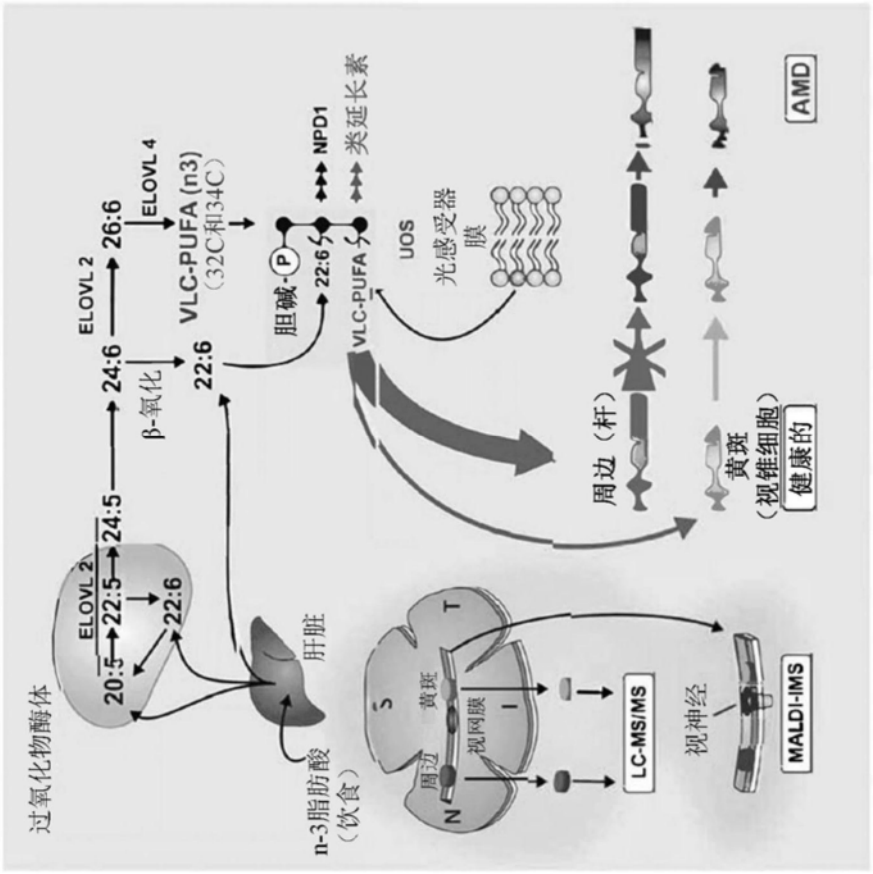

过氧化物酶体
ELOVL 2
20:5
22:5
24:5
22:6
肝脏
n-3脂肪酸
（饮食）
ELOVL 2
24:6
β-氧化
22:6
ELOVL 4
26:6
VLC-PUFA (n3)
（32C和34C）
胆碱-P
22:6
NPD1
类延长素
VLC-PUFA
UOS
光感受器
膜
周边（杆）
黄斑
（视锥细胞）
健康的
AMD
S
T
N
I
周边
黄斑
视网膜
LC-MS/MS
视神经
MALDI-IMS

图34

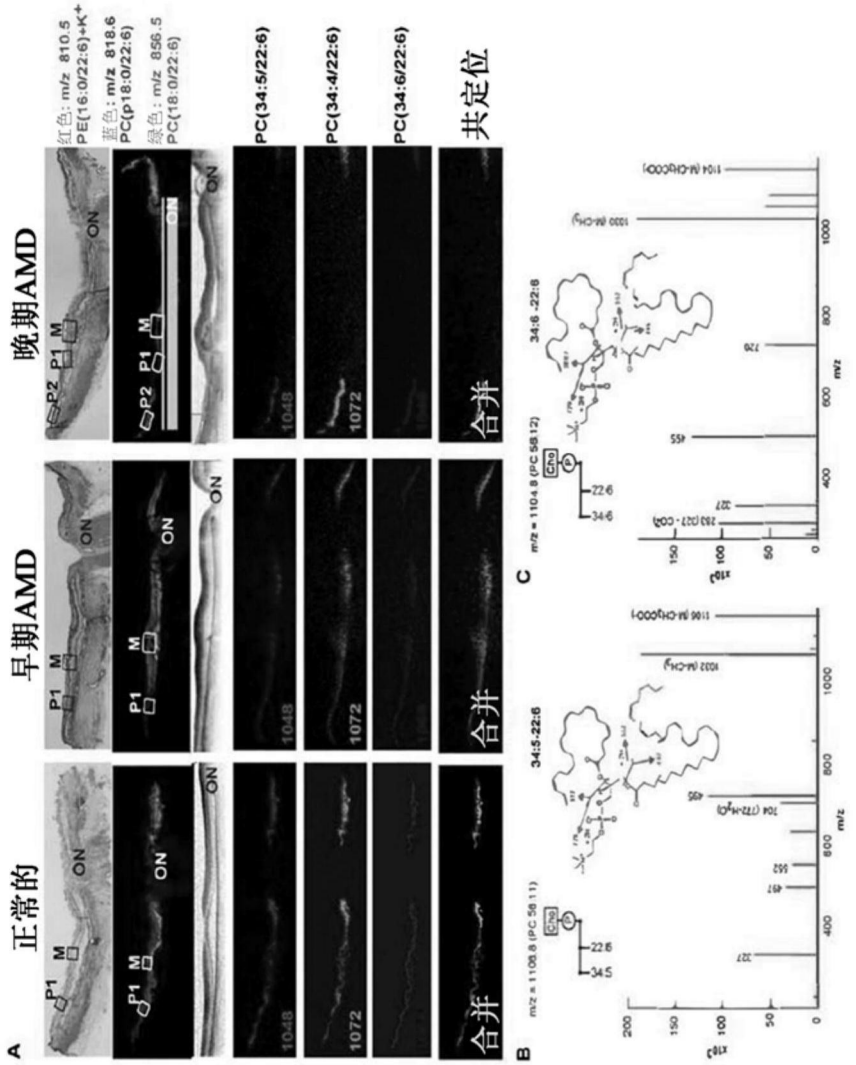

A
正常的
早期AMD
晚期AMD
红色：m/z 810.5
PE(16:0/22:6)+K+
蓝色：m/z 818.6
PC(p18:0/22:6)
绿色：m/z 856.5
PC(18:0/22:6)
P1
M
P2
ON
PC(34:5/22:6)
PC(34:4/22:6)
PC(34:6/22:6)
1048
1072
合并
共定位
正常84岁
m/z 810（红色）位于视神经和视网膜内层，m/z 818（蓝色）位于黄斑区（视锥细胞），并且m/z 856（绿色）位于光感受器层。
B
m/z = 1100.8 (PC 58:11)
34:5-22:6
C
m/z = 1104.8 (PC 58:12)
34:6-22:6
OCT图像显示中心附近的黄斑区域。

图35

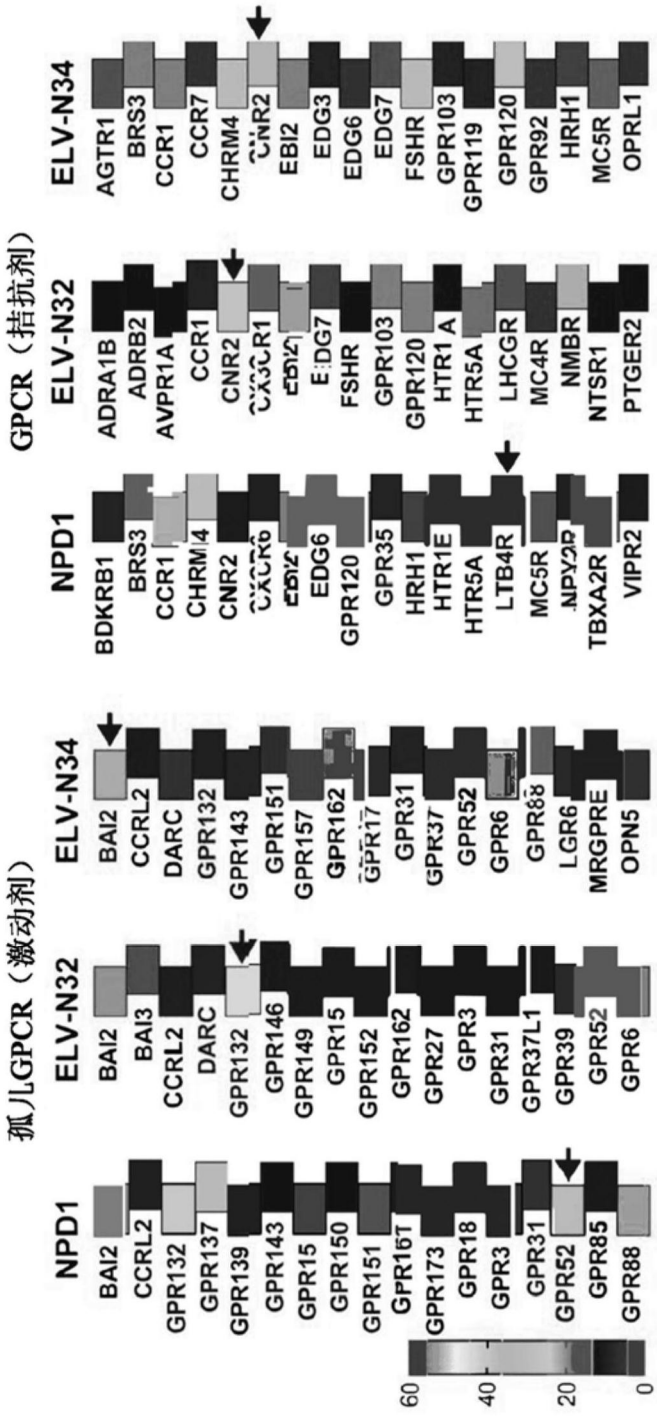

GPCR（拮抗剂）
ELV-N34
AGTR1
BRS3
CCR1
CCR7
CHRM4
CNR2
EBI2
EDG3
EDG6
EDG7
FSHR
GPR103
GPR119
GPR120
GPR92
HRH1
MC5R
OPRL1
ELV-N32
ADRA1B
ADRB2
AVPR1A
CCR1
CNR2
EDG7
FSHR
GPR103
GPR120
HTR1A
HTR5A
LHCGR
MC4R
NMBR
NTSR1
PTGER2
NPD1
BDKRB1
BRS3
CCR1
CHRM4
CNR2
EDG6
GPR120
GPR35
HRH1
HTR1E
HTR5A
LTB4R
MC5R
TBXA2R
VIPR2
孤儿GPCR（激动剂）
ELV-N34
BAI2
CCRL2
DARC
GPR132
GPR143
GPR151
GPR157
GPR162
GPR31
GPR37
GPR52
GPR6
GPR88
LGR6
MRGPRE
OPN5
ELV-N32
BAI2
BAI3
CCRL2
DARC
GPR132
GPR146
GPR149
GPR15
GPR152
GPR162
GPR27
GPR3
GPR31
GPR37L1
GPR39
GPR52
GPR6
NPD1
BAI2
CCRL2
GPR132
GPR137
GPR139
GPR143
GPR15
GPR150
GPR151
GPR161
GPR173
GPR18
GPR3
GPR31
GPR52
GPR85
GPR88
60
40
20
0

图36

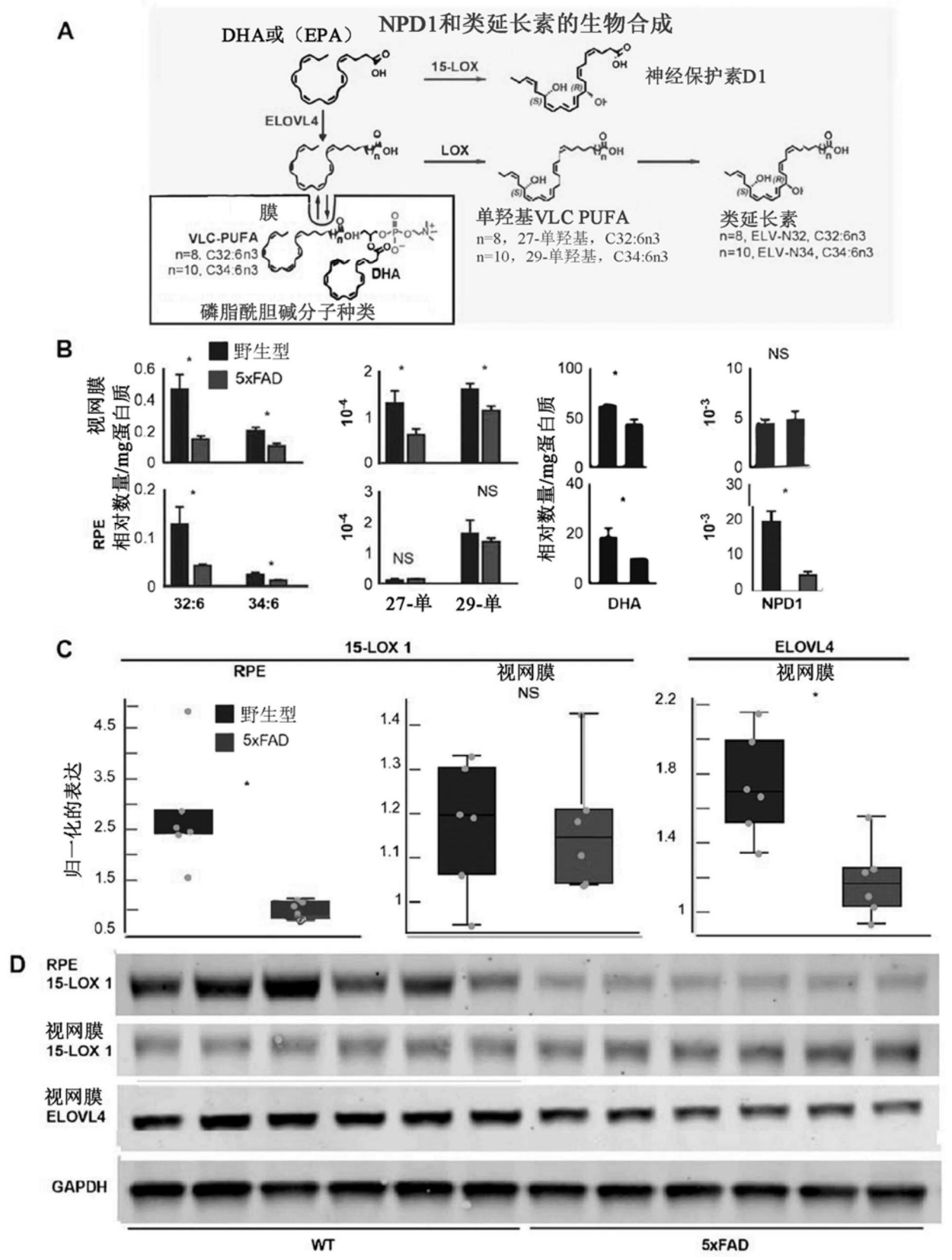

A
DHA或（EPA）
NPD1和类延长素的生物合成
15-LOX
神经保护素D1
ELOVL4
LOX
膜
VLC-PUFA
n=8, C32:6n3
n=10, C34:6n3
DHA
磷脂酰胆碱分子种类
单羟基VLC PUFA
n=8，27-单羟基，C32:6n3
n=10，29-单羟基，C34:6n3
类延长素
n=8, ELV-N32, C32:6n3
n=10, ELV-N34, C34:6n3
B
野生型
5xFAD
视网膜
RPE
相对数量/mg蛋白质
32:6
34:6
27-单
29-单
DHA
NPD1
NS
C
15-LOX 1
ELOVL4
RPE
视网膜
归一化的表达
野生型
5xFAD
D
RPE
15-LOX 1
视网膜
15-LOX 1
视网膜
ELOVL4
GAPDH
WT
5xFAD

图37

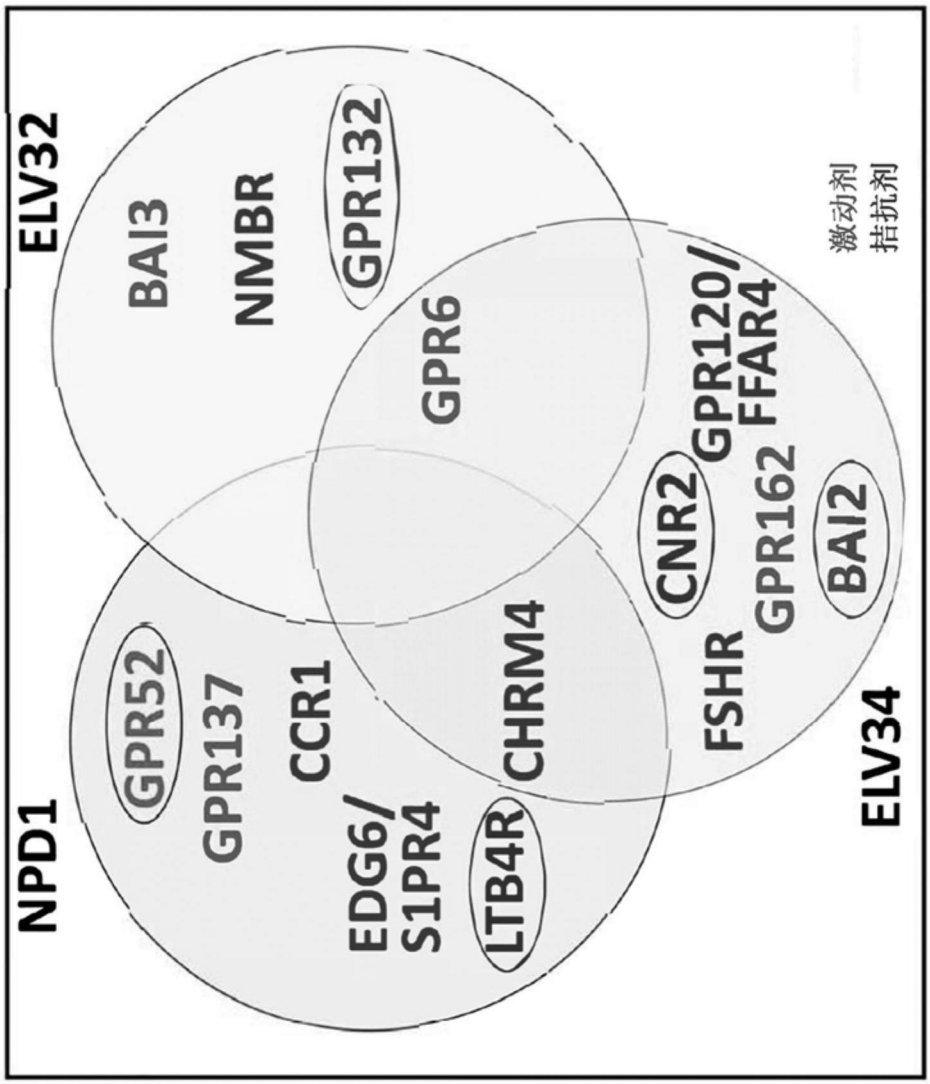

ELV32
BAI3
NMBR
GPR132
GPR6
GPR120/
FFAR4
激动剂
拮抗剂
NPD1
GPR52
GPR137
CCR1
EDG6/
S1PR4
LTB4R
CHRM4
CNR2
FSHR
GPR162
BAI2
ELV34

图38

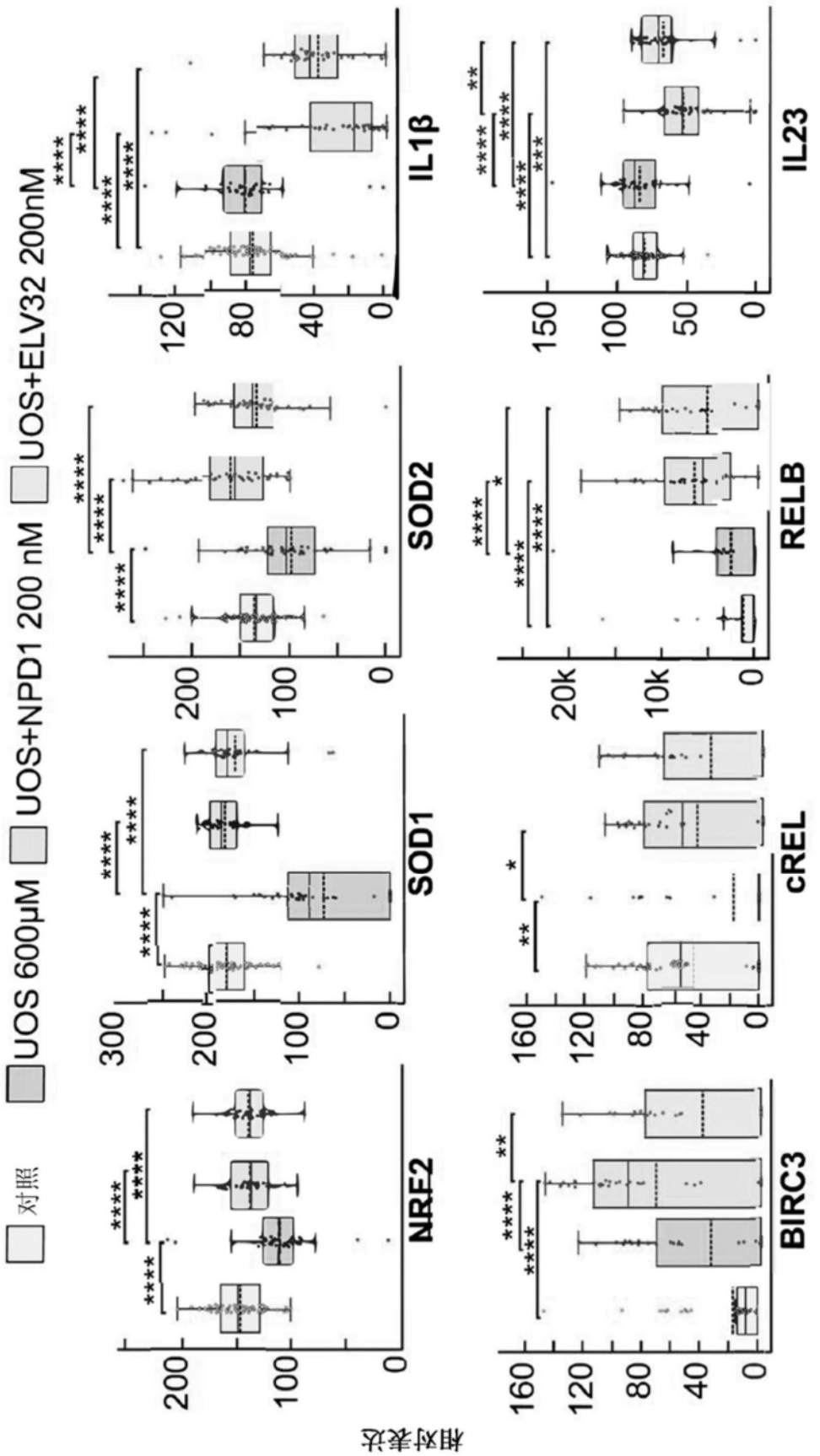

对照
UOS 600μM
UOS+NPD1 200 nM
UOS+ELV32 200nM
相对表达
NRF2
SOD1
SOD2
IL1β
BIRC3
cREL
RELB
IL23

图39

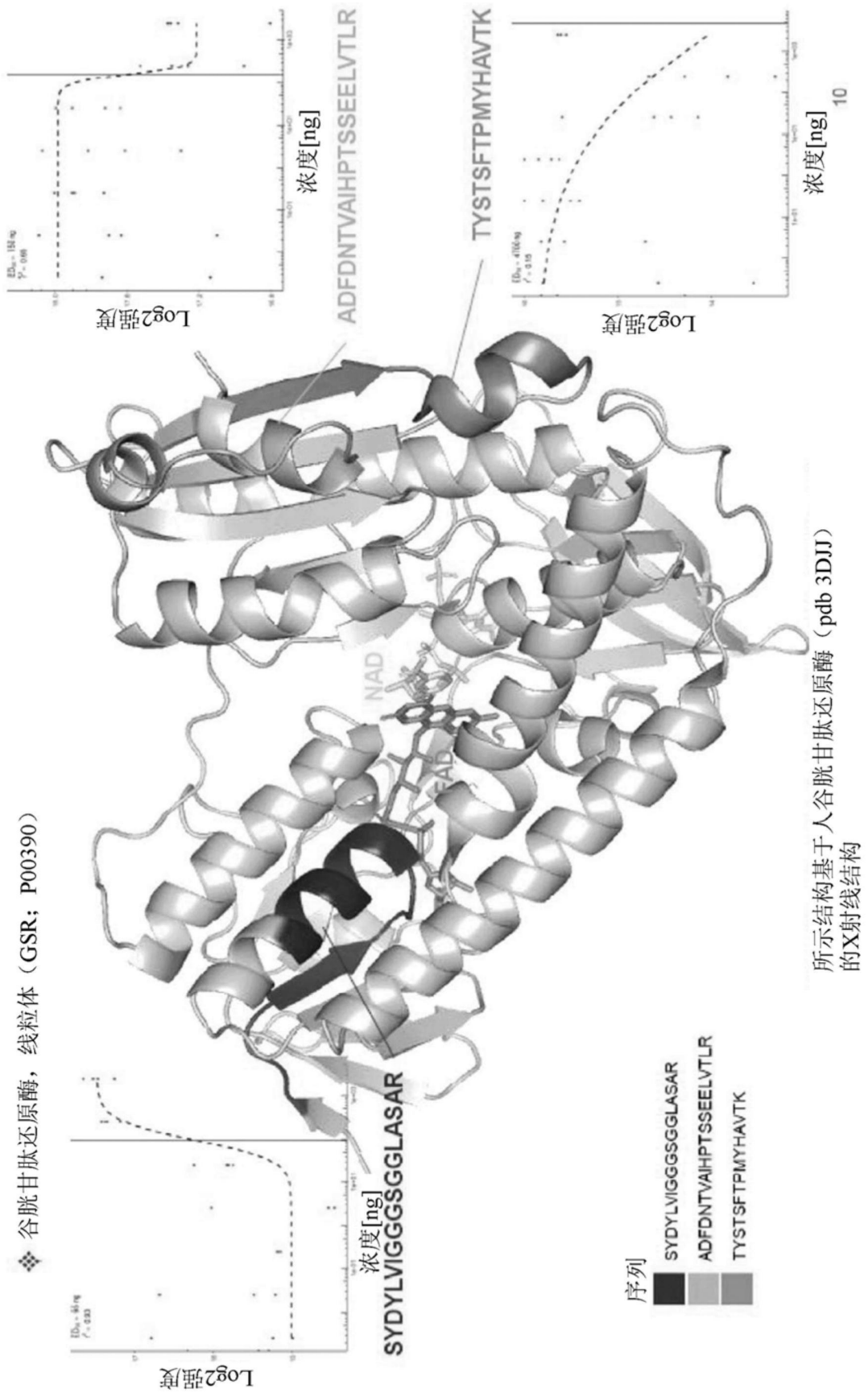

谷胱甘肽还原酶，线粒体（GSR；P00390）
SYDYLVIGGGSGGLASAR
ADFDNTVAIHPTSSEELVTLR
TYSTSFTPMYHAVTK
NAD
FAD
Log2强度
浓度[ng]
序列
SYDYLVIGGGSGGLASAR
ADFDNTVAIHPTSSEELVTLR
TYSTSFTPMYHAVTK
所示结构基于人谷胱甘肽还原酶（pdb 3DJJ）的X射线结构

图40

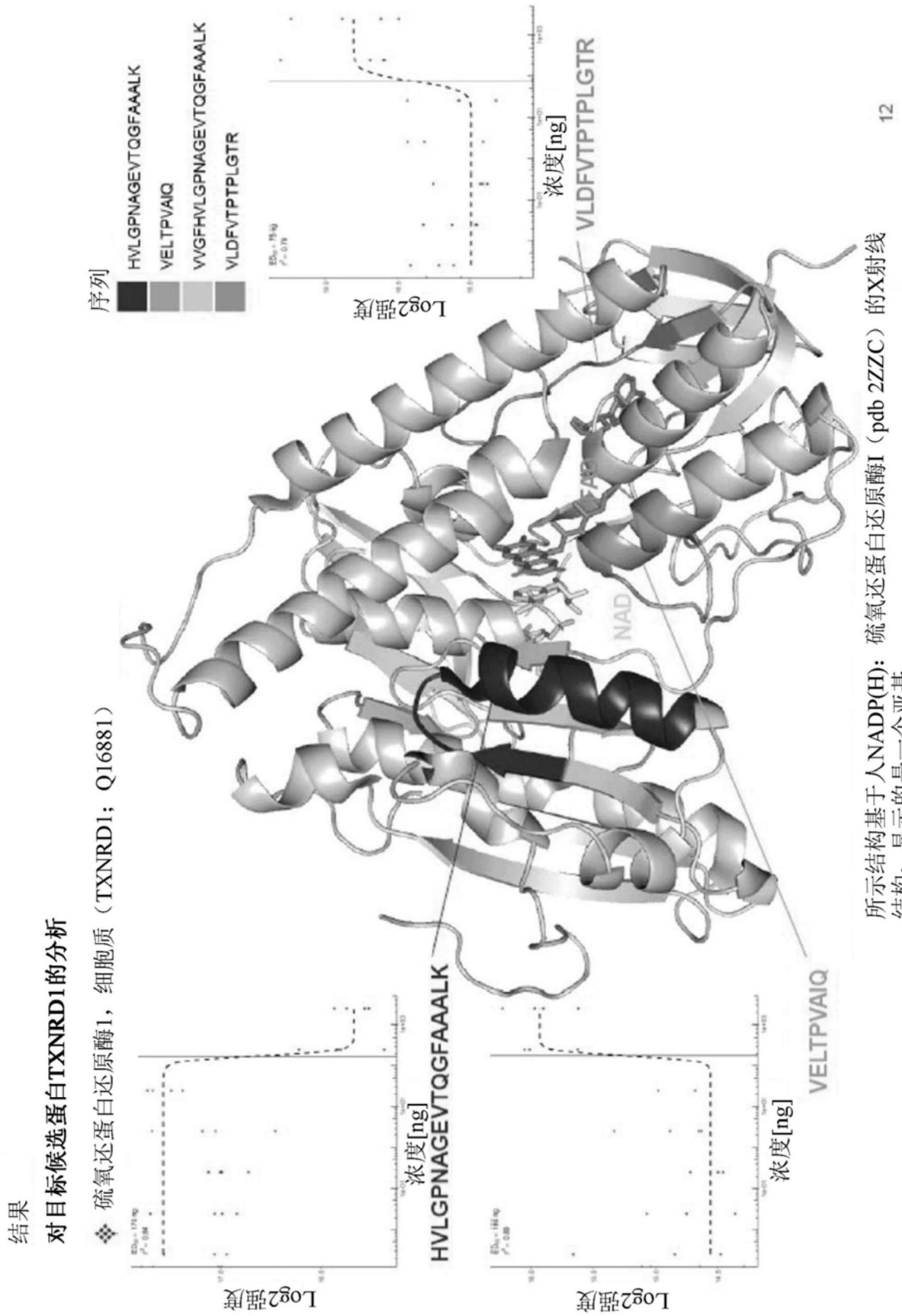

结果
对目标候选蛋白TXNRD1的分析
硫氧还蛋白还原酶1，细胞质（TXNRD1；Q16881）
序列
HVLGPNAGEVTQGFAAALK
VELTPVAIQ
VVGFHVLGPNAGEVTQGFAAALK
VLDFVTPTPLGTR
Log2强度
浓度[ng]
HVLGPNAGEVTQGFAAALK
VELTPVAIQ
VLDFVTPTPLGTR
NAD
所示结构基于人NADP(H)：硫氧还蛋白还原酶I（pdb 2ZZC）的X射线
结构；显示的是一个亚基
12

图41

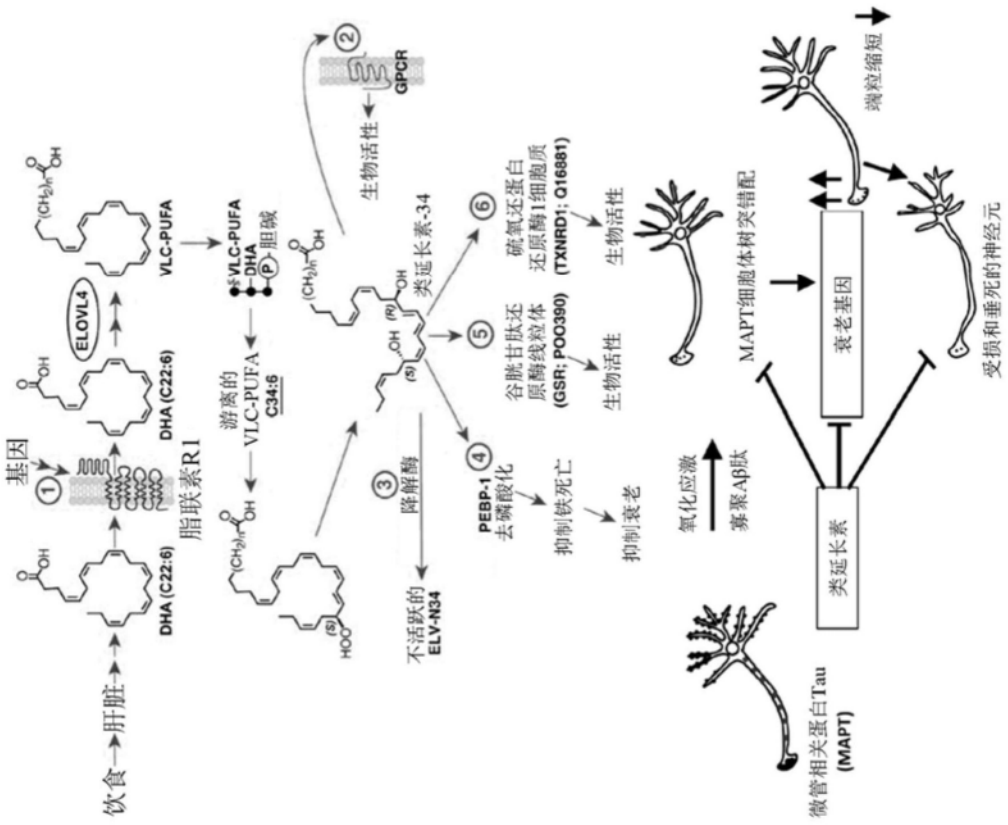

饮食→肝脏→
DHA (C22:6)
脂联素R1
基因
ELOVL4
VLC-PUFA
游离的
VLC-PUFA
C34:6
VLC-PUFA
DHA
胆碱
GPCR
生物活性
类延长素-34
降解酶
不活跃的
ELV-N34
PEBP-1
去磷酸化
抑制铁死亡
抑制衰老
谷胱甘肽还原酶线粒体
(GSR; POO390)
生物活性
硫氧还蛋白还原酶1细胞质
(TXNRD1; O16881)
生物活性
氧化应激
寡聚Aβ肽
MAPT细胞体树突错配
衰老基因
类延长素
端粒缩短
受损和垂死的神经元
微管相关蛋白Tau
(MAPT)

图42

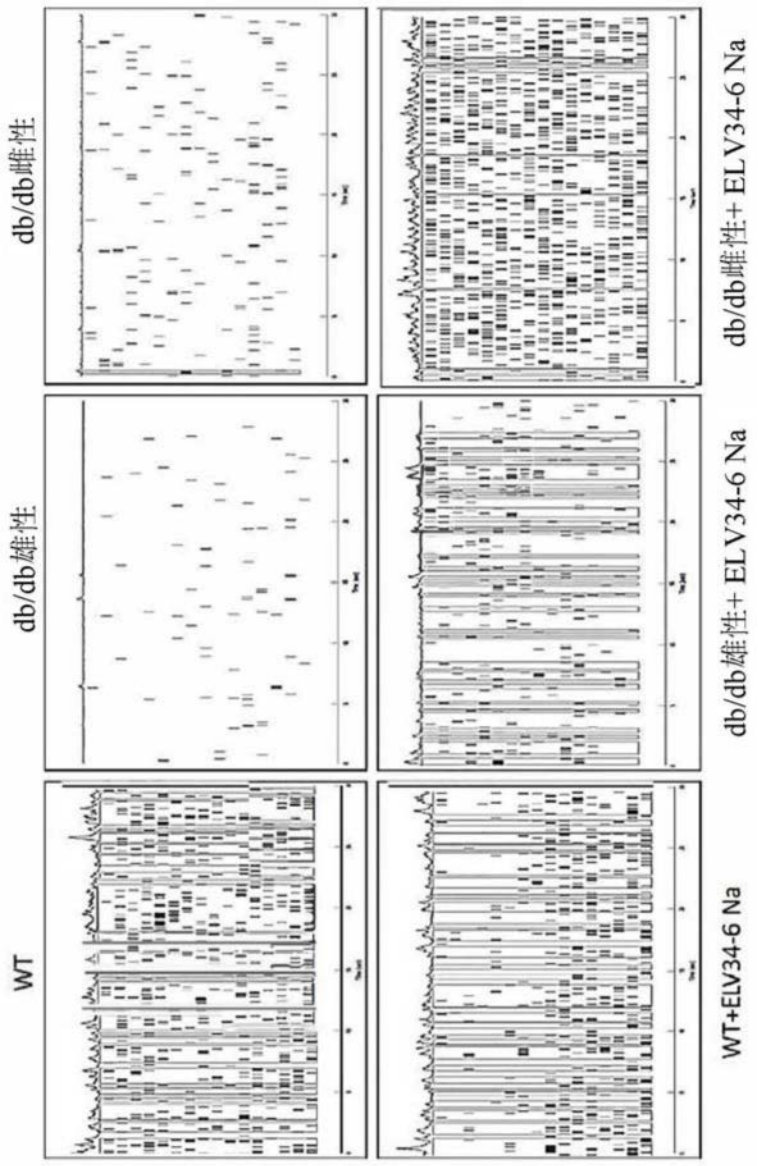

WT
db/db雄性
db/db雌性
WT+ELV34-6 Na
db/db雄性+ ELV34-6 Na
db/db雌性+ ELV34-6 Na

图43

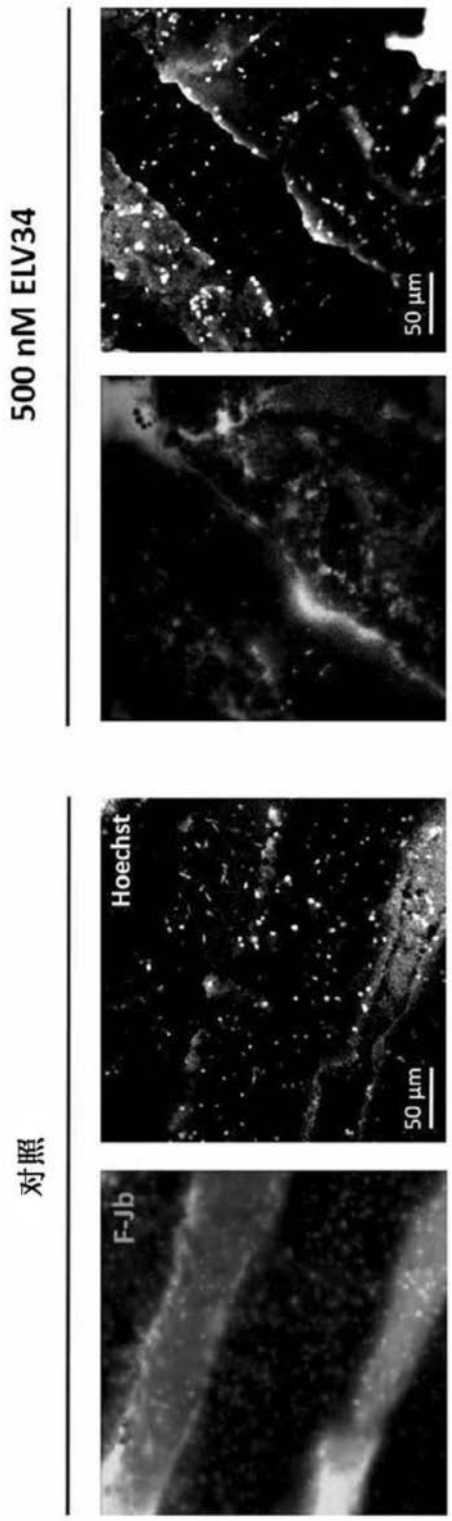


图44

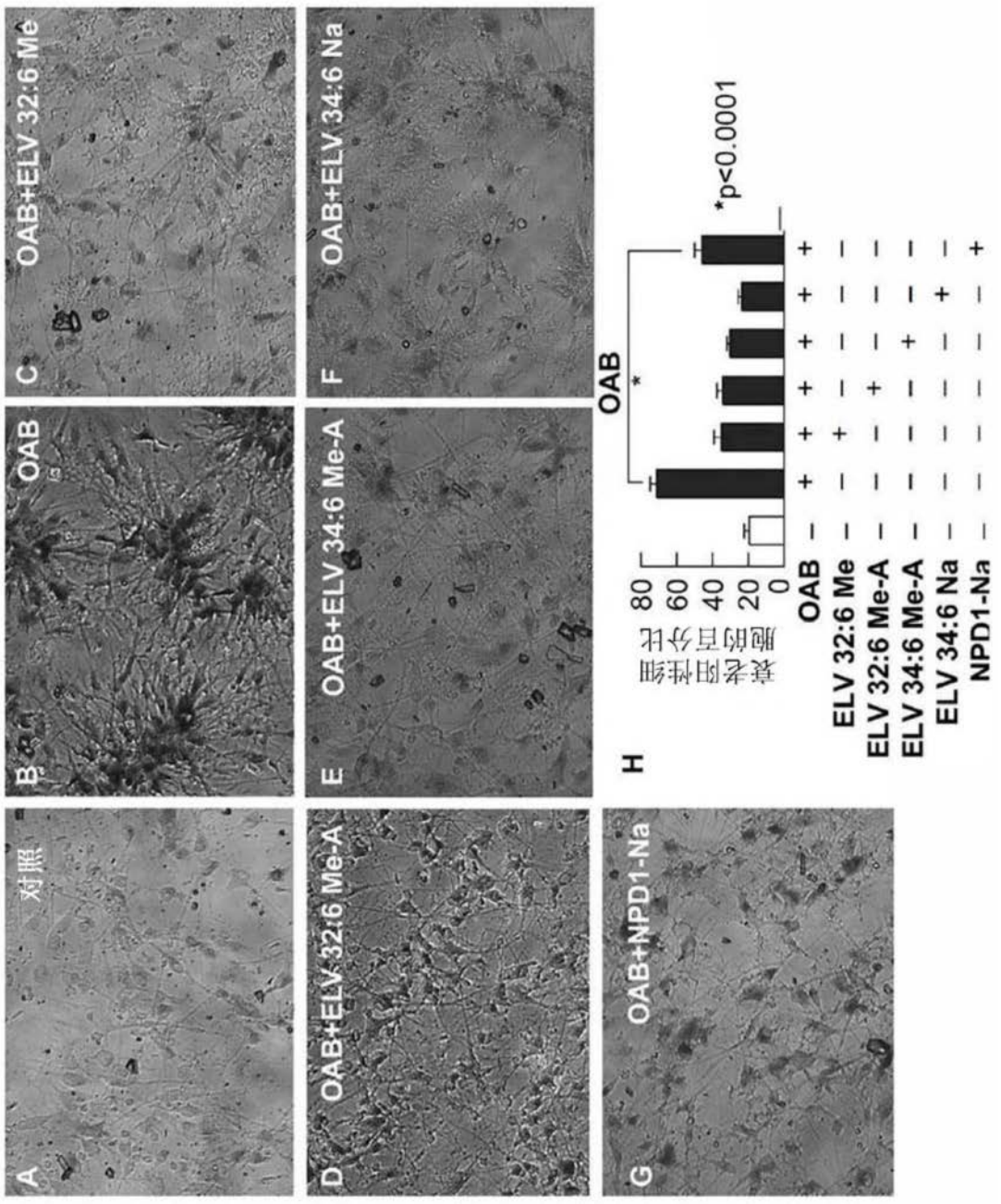

A
对照
B
OAB
C
OAB+ELV 32:6 Me
D
OAB+ELV 32:6 Me-A
E
OAB+ELV 34:6 Me-A
F
OAB+ELV 34:6 Na
G
OAB+NPD1-Na
H
衰老阳性细胞的百分比
0
20
40
60
80
*
*p<0.0001
OAB
ELV 32:6 Me
ELV 32:6 Me-A
ELV 34:6 Me-A
ELV 34:6 Na
NPD1-Na

图45

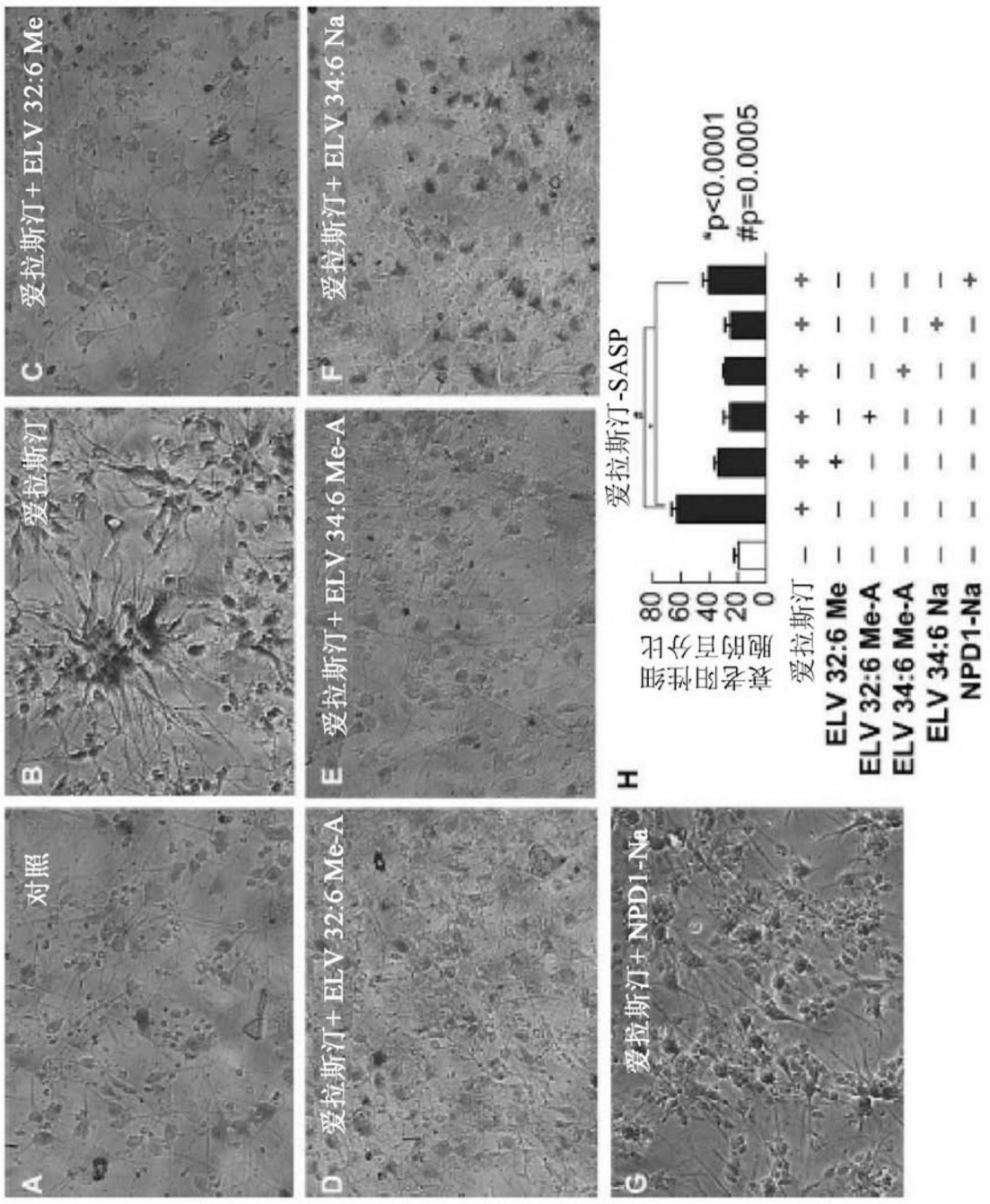

A 对照
B 爱拉斯汀
C 爱拉斯汀+ ELV 32:6 Me
D 爱拉斯汀+ ELV 32:6 Me-A
E 爱拉斯汀+ ELV 34:6 Me-A
F 爱拉斯汀+ ELV 34:6 Na
G 爱拉斯汀+ NPD1-Na
H
爱拉斯汀-SASP
*p<0.0001
#p=0.0005
衰老表型的百分比
80
60
40
20
0
爱拉斯汀
ELV 32:6 Me
ELV 32:6 Me-A
ELV 34:6 Me-A
ELV 34:6 Na
NPD1-Na

图46

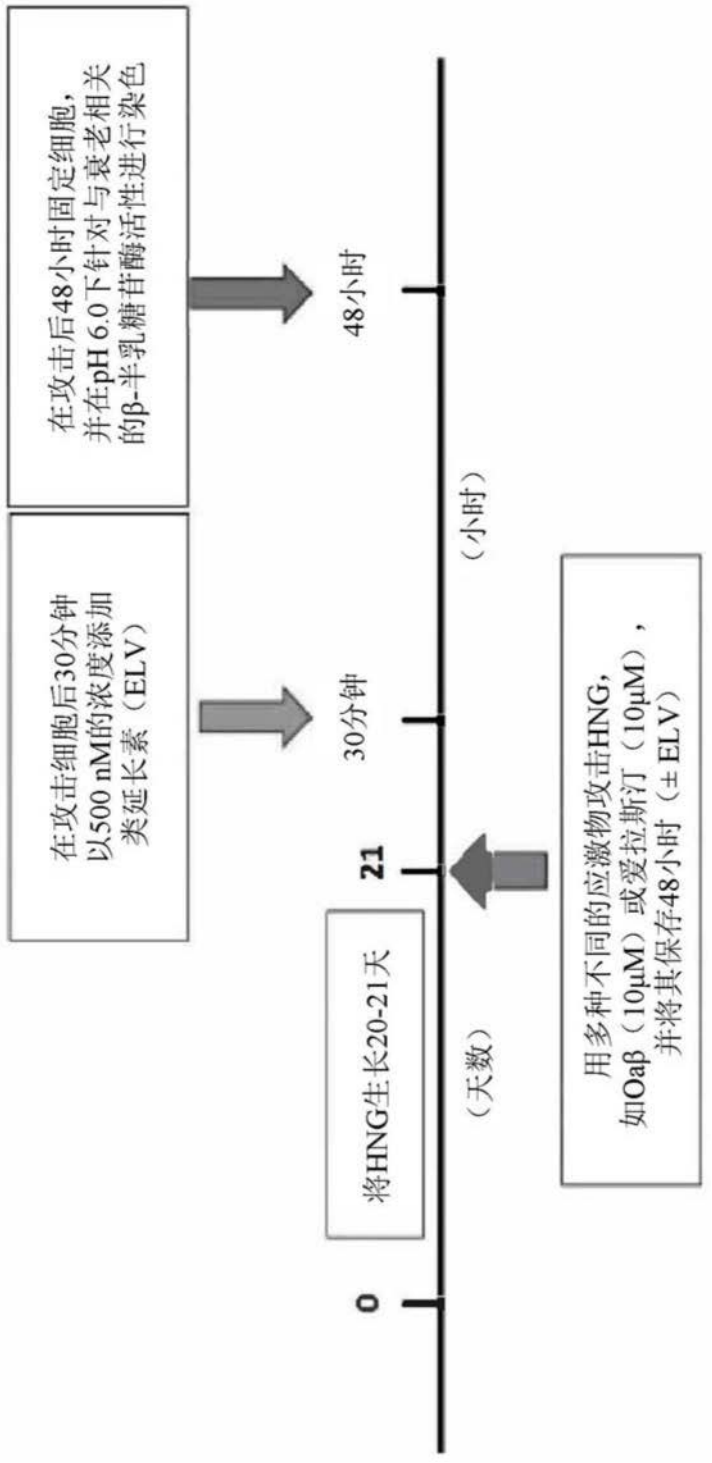

在攻击后48小时固定细胞，
并在pH 6.0下针对与衰老相关
的β-半乳糖苷酶活性进行染色
在攻击细胞后30分钟
以500 nM的浓度添加
类延长素（ELV）
将HNG生长20-21天
用多种不同的应激物攻击HNG，
如OAβ（10μM）或爱拉斯汀（10μM），
并将其保存48小时（± ELV）
0
21
30分钟
48小时
（天数）
（小时）

图47

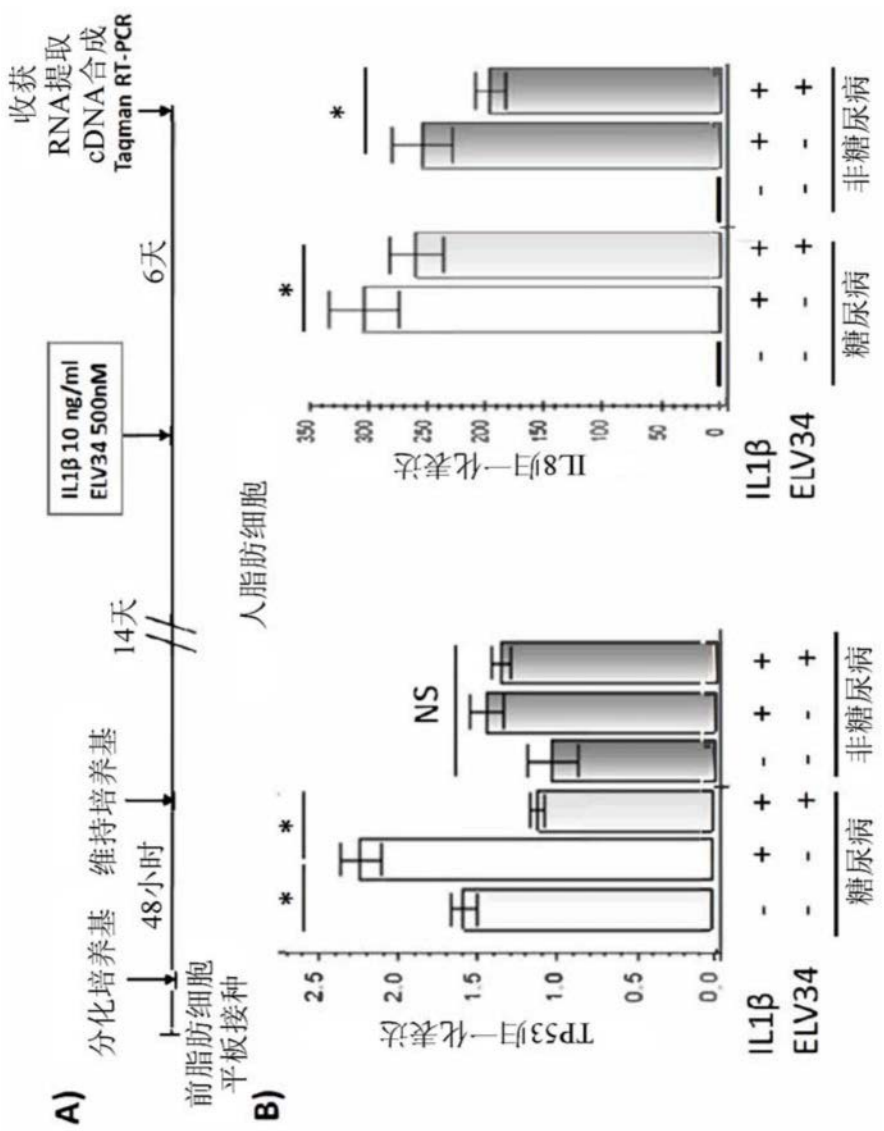

A)
分化培养基
维持培养基
48小时
14天
6天
前脂肪细胞
平板接种
IL1β 10 ng/ml
ELV34 500nM
收获
RNA提取
cDNA合成
Taqman RT-PCR
B)
人脂肪细胞
TP53基因表达
IL8基因表达
NS
IL1β
ELV34
糖尿病
非糖尿病

图48

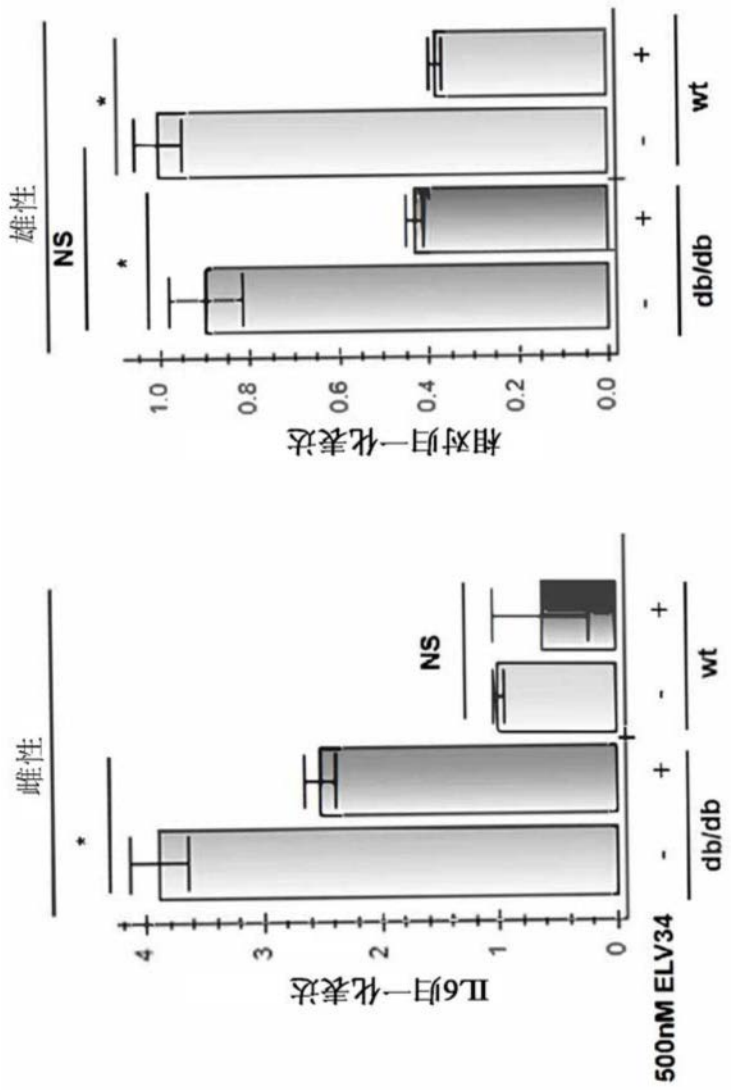

雄性
NS
*
*
相对归一化表达
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
db/db
wt
雌性
*
NS
IL6归一化表达
4
3
2
1
0
500nM ELV34
db/db
wt

图49

样品ID	动物	体重	年龄	性别	治疗	离体时间	血糖
1	db/db	44 g	16周	雄性	无	24小时	232 mg/dl
2	wt	27 g		雄性		24小时	148 mg/dl
3	db/db	54 g		雌性		24小时	>600 mg/dl
4	wt	22g		雌性		24小时	109 mg/dl
5	db/db	44 g		雄性	500nM ELV34 24小时	24小时	232 mg/dl
6	wt	27 g		雄性		24小时	148 mg/dl
7	db/db	54 g		雌性		24小时	>600 mg/dl
8	wt	22g		雌性		24小时	109 mg/dl

图50

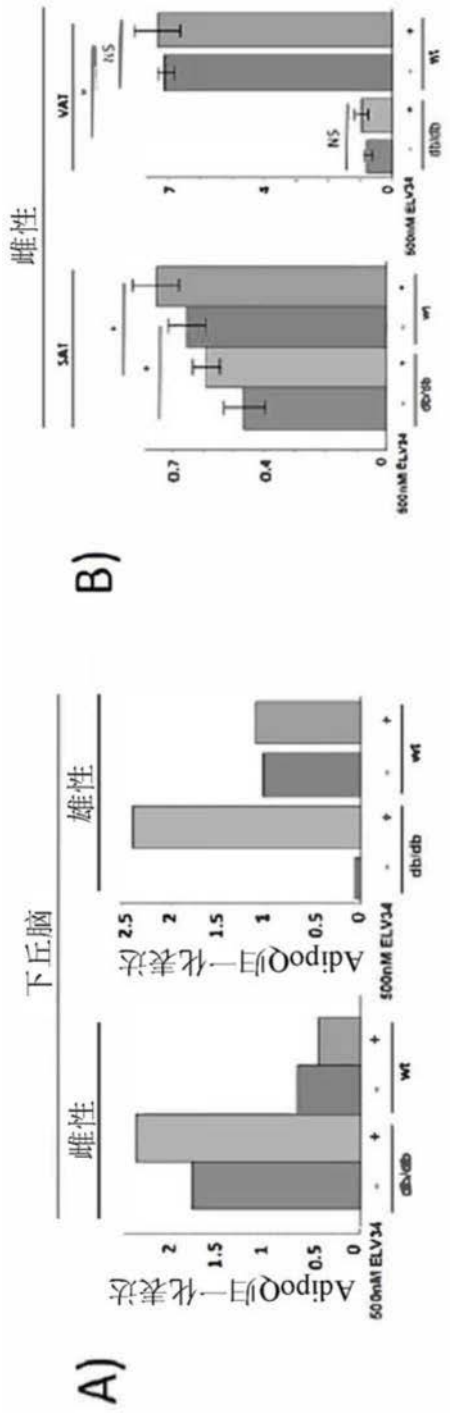

A)
下丘脑
雌性
雄性
AdipoQ归一化表达
500nM ELV34
db/db
wt
B)
雌性
SAT
VAT
NS
500nM ELV34
db/db
wt

图51

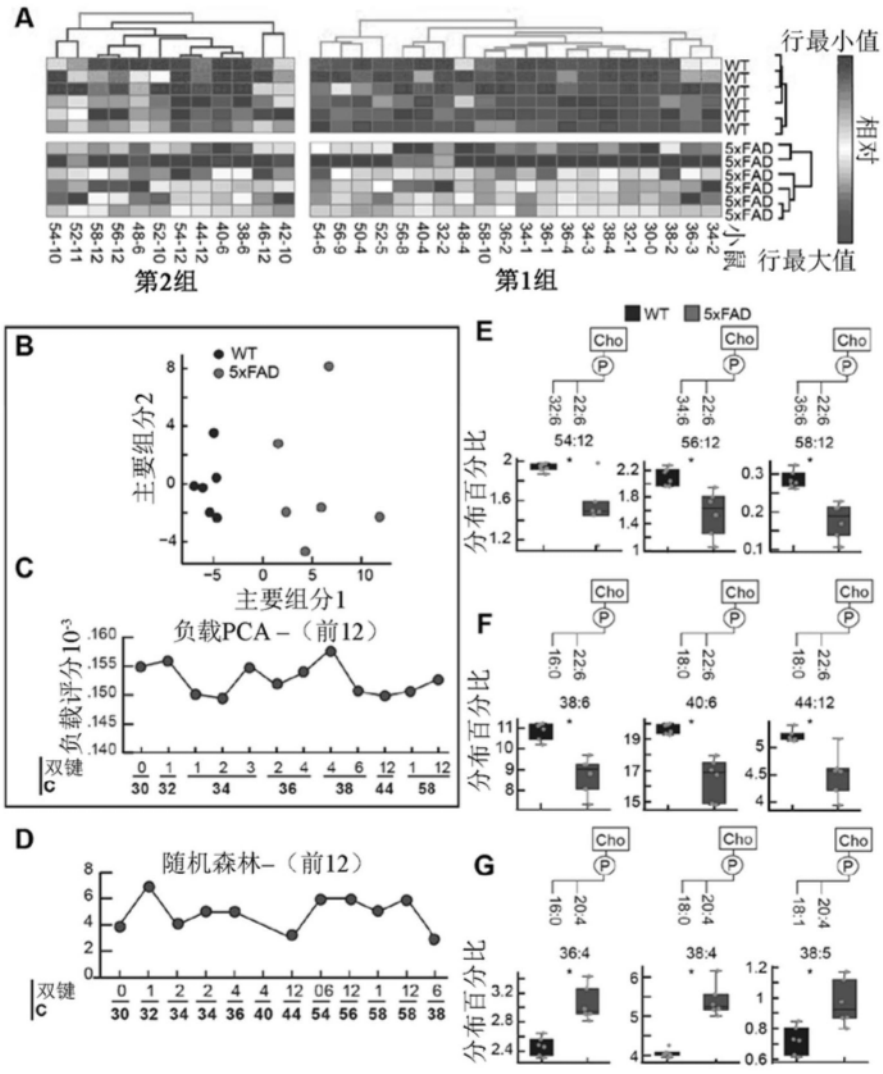

A
行最小值
相对
行最大值
WT
5xFAD
小鼠
第2组
第1组
B
WT
5xFAD
主要组分2
主要组分1
C
负载PCA –（前12）
负载评分10-3
双键
C
D
随机森林–（前12）
双键
C
E
WT
5xFAD
Cho
P
54:12
56:12
58:12
分布百分比
F
38:6
40:6
44:12
分布百分比
G
36:4
38:4
38:5
分布百分比

图52

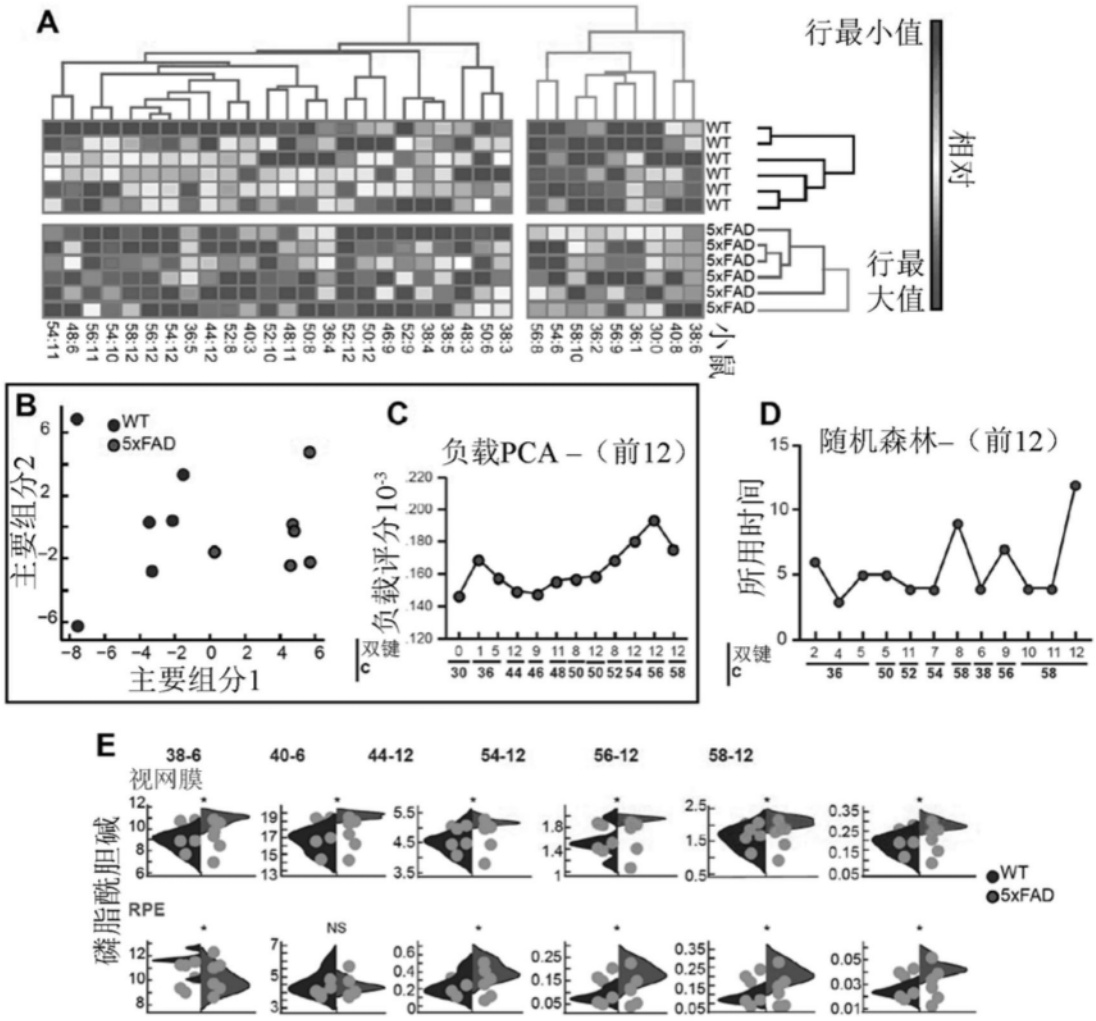

A
行最小值
相对
行最大值
WT
5xFAD
小鼠
B
WT
5xFAD
主要组分2
主要组分1
C
负载PCA –（前12）
负载评分10-3
双键
D
随机森林–（前12）
所用时间
双键
E
38-6
40-6
44-12
54-12
56-12
58-12
视网膜
RPE
磷脂酰胆碱
NS
WT
5xFAD

图53

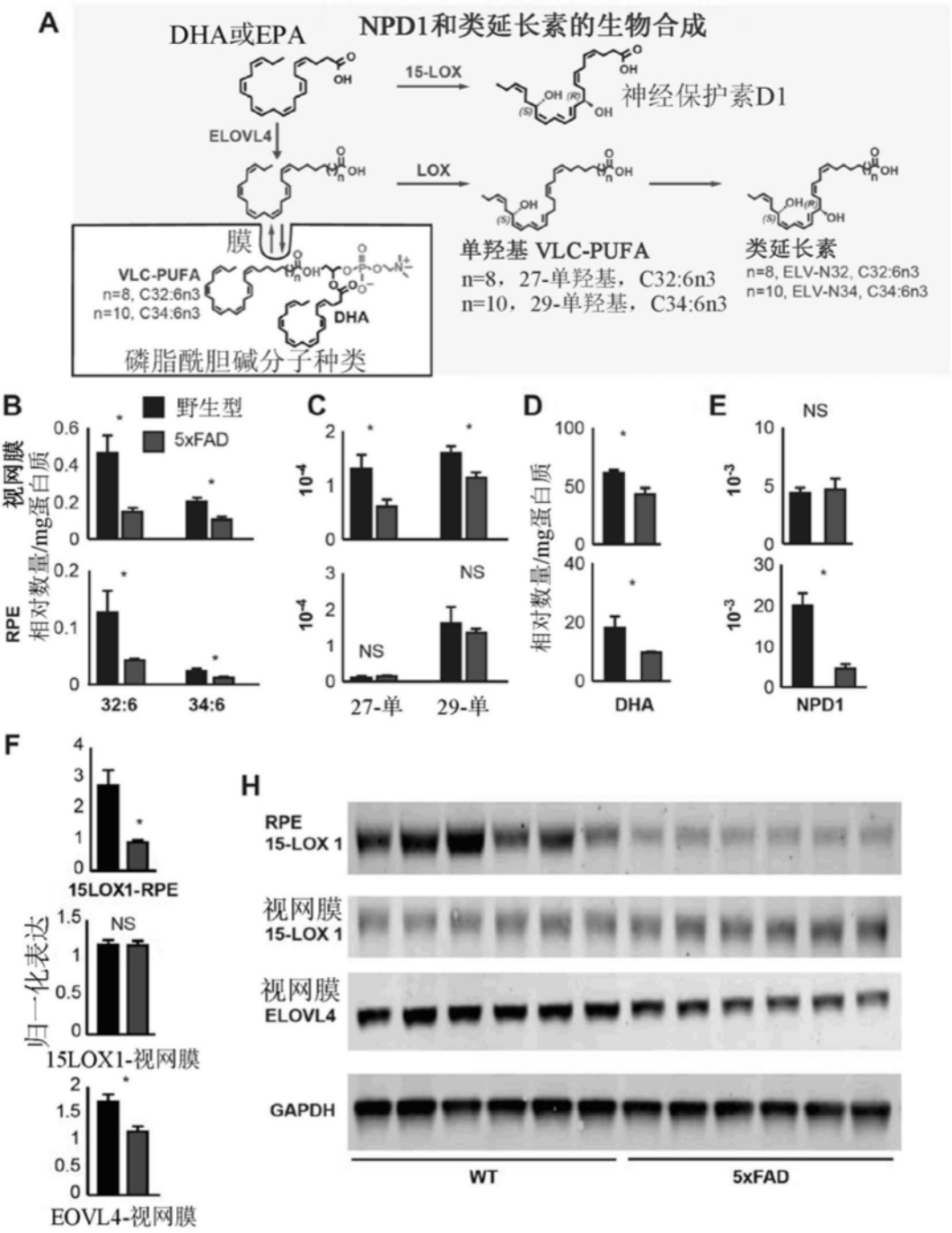

A
DHA或EPA
NPD1和类延长素的生物合成
15-LOX
神经保护素D1
ELOVL4
LOX
膜
VLC-PUFA
n=8, C32:6n3
n=10, C34:6n3
DHA
磷脂酰胆碱分子种类
单羟基 VLC-PUFA
n=8，27-单羟基，C32:6n3
n=10，29-单羟基，C34:6n3
类延长素
n=8, ELV-N32, C32:6n3
n=10, ELV-N34, C34:6n3
B
野生型
5xFAD
视网膜
RPE
相对数量/mg蛋白质
32:6
34:6
C
NS
27-单
29-单
D
DHA
E
NPD1
F
15LOX1-RPE
归一化表达
15LOX1-视网膜
EOVL4-视网膜
H
RPE
15-LOX 1
视网膜
15-LOX 1
视网膜
ELOVL4
GAPDH
WT
5xFAD

图54

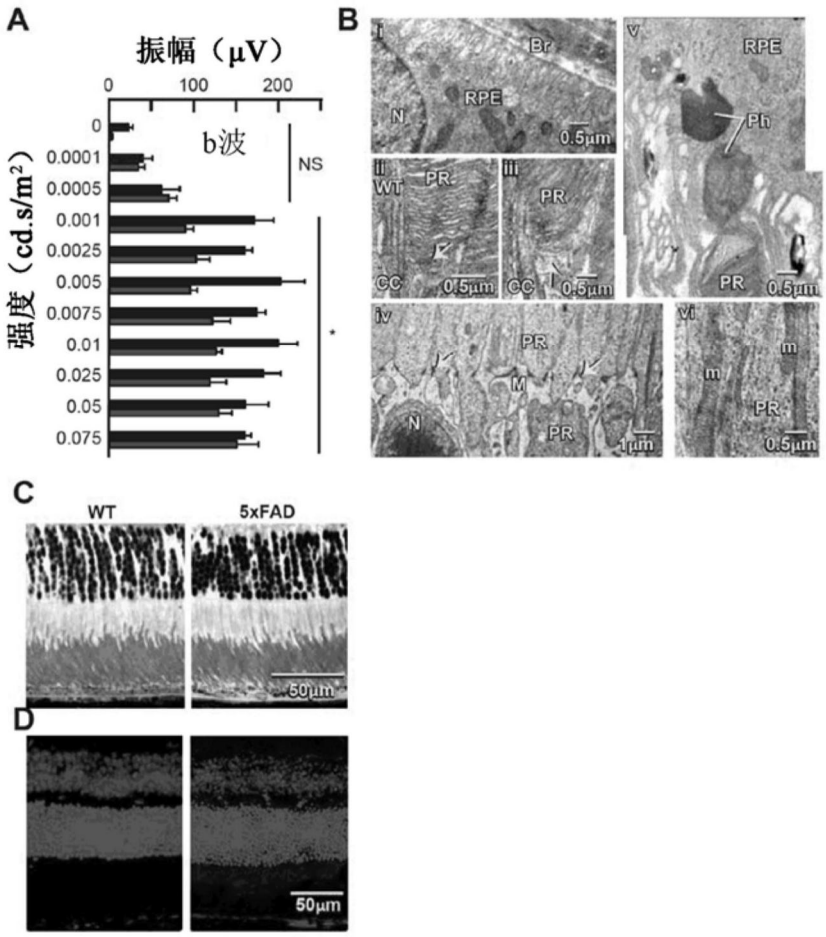

A
振幅（μV）
0
100
200
b波
NS
*
强度（cd.s/m²）
0
0.0001
0.0005
0.001
0.0025
0.005
0.0075
0.01
0.025
0.05
0.075
B
i
Br
RPE
N
0.5μm
v
RPE
Ph
PR
0.5μm
ii
WT
PR
CC
0.5μm
iii
PR
CC
0.5μm
iv
PR
M
N
PR
1μm
vi
m
m
PR
0.5μm
C
WT
5xFAD
50μm
D
50μm

图55

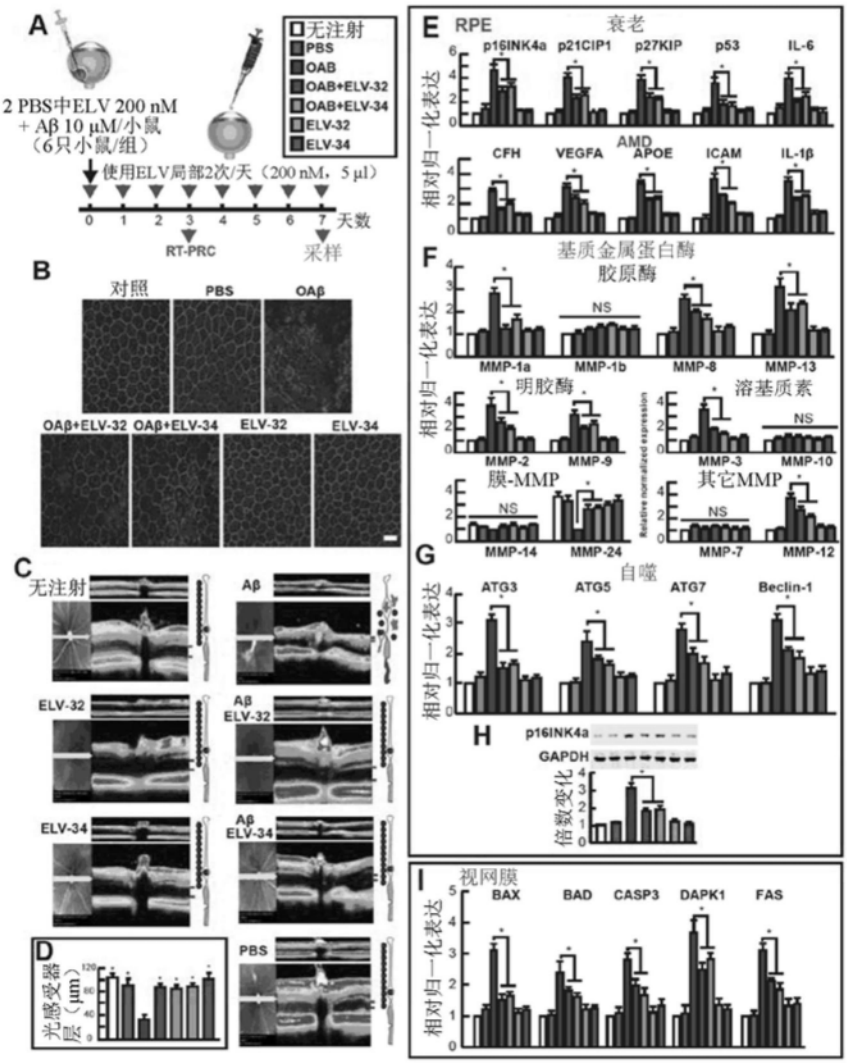

A
2 PBS中ELV 200 nM
+ Aβ 10 μM/小鼠
（6只小鼠/组）
使用ELV局部2次/天（200 nM，5 μl）
0 1 2 3 4 5 6 7 天数
RT-PRC
采样
无注射
PBS
OAB
OAB+ELV-32
OAB+ELV-34
ELV-32
ELV-34
B
对照
PBS
OAβ
OAβ+ELV-32
OAβ+ELV-34
ELV-32
ELV-34
C
无注射
Aβ
ELV-32
Aβ ELV-32
ELV-34
Aβ ELV-34
PBS
D
光感受器层（μm）
E
RPE
衰老
p16INK4a
p21CIP1
p27KIP
p53
IL-6
AMD
CFH
VEGFA
APOE
ICAM
IL-1β
相对归一化表达
F
基质金属蛋白酶
胶原酶
NS
MMP-1a
MMP-1b
MMP-8
MMP-13
明胶酶
溶基质素
MMP-2
MMP-9
MMP-3
MMP-10
膜-MMP
其它MMP
MMP-14
MMP-24
MMP-7
MMP-12
G
自噬
ATG3
ATG5
ATG7
Beclin-1
H
p16INK4a
GAPDH
倍数变化
I
视网膜
BAX
BAD
CASP3
DAPK1
FAS

图56

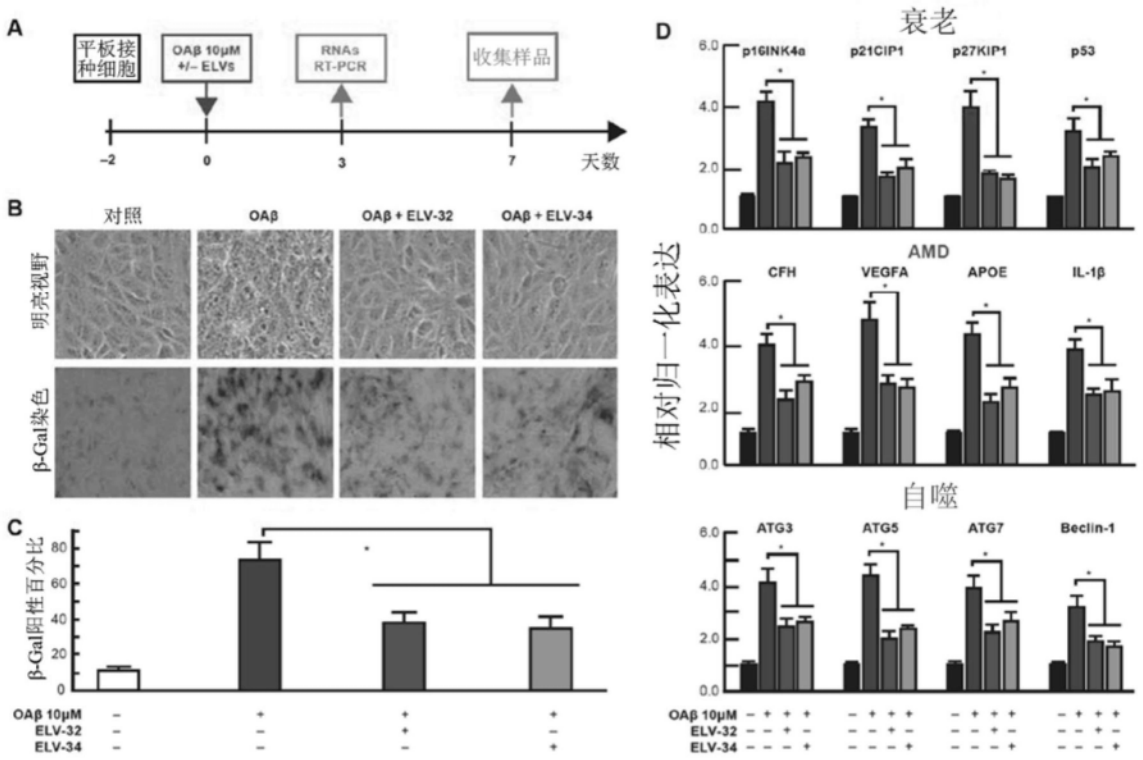

A
平板接种细胞
OAβ 10μM +/- ELVs
RNAs RT-PCR
收集样品
-2
0
3
7
天数
B
对照
OAβ
OAβ + ELV-32
OAβ + ELV-34
明亮视野
β-Gal染色
C
β-Gal阳性百分比
OAβ 10μM
ELV-32
ELV-34
D
衰老
p16INK4a
p21CIP1
p27KIP1
p53
AMD
CFH
VEGFA
APOE
IL-1β
自噬
ATG3
ATG5
ATG7
Beclin-1
相对归一化表达

图57

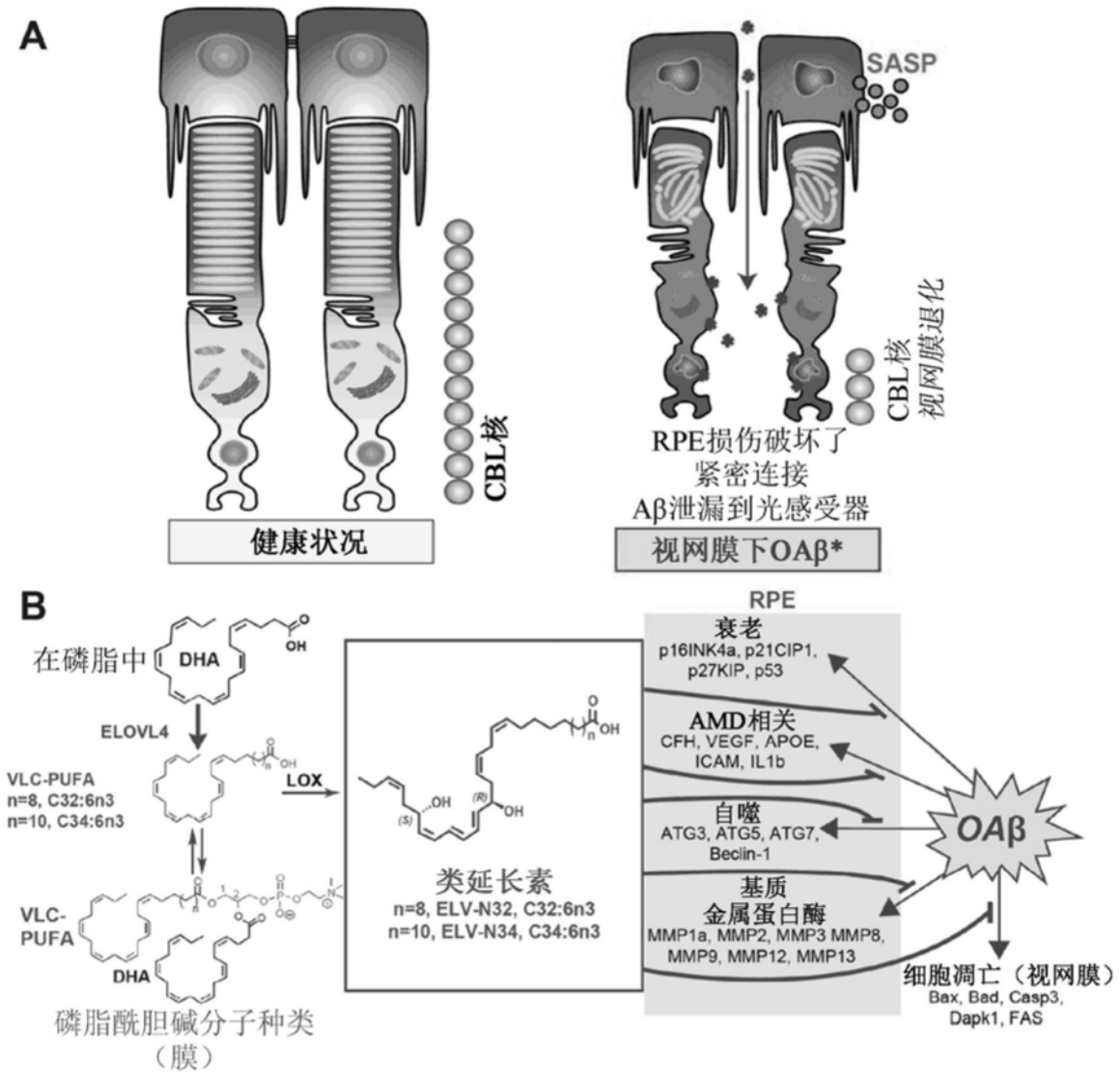

A
CBL核
健康状况
SASP
CBL核
视网膜退化
RPE损伤破坏了
紧密连接
Aβ泄漏到光感受器
视网膜下OAβ*
B
在磷脂中
DHA
OH
ELOVL4
VLC-PUFA
n=8, C32:6n3
n=10, C34:6n3
LOX
VLC-
PUFA
DHA
磷脂酰胆碱分子种类
（膜）
类延长素
n=8, ELV-N32, C32:6n3
n=10, ELV-N34, C34:6n3
RPE
衰老
p16INK4a, p21CIP1,
p27KIP, p53
AMD相关
CFH, VEGF, APOE,
ICAM, IL1b
自噬
ATG3, ATG5, ATG7,
Beclin-1
基质
金属蛋白酶
MMP1a, MMP2, MMP3 MMP8,
MMP9, MMP12, MMP13
OAβ
细胞凋亡（视网膜）
Bax, Bad, Casp3,
Dapk1, FAS

图58

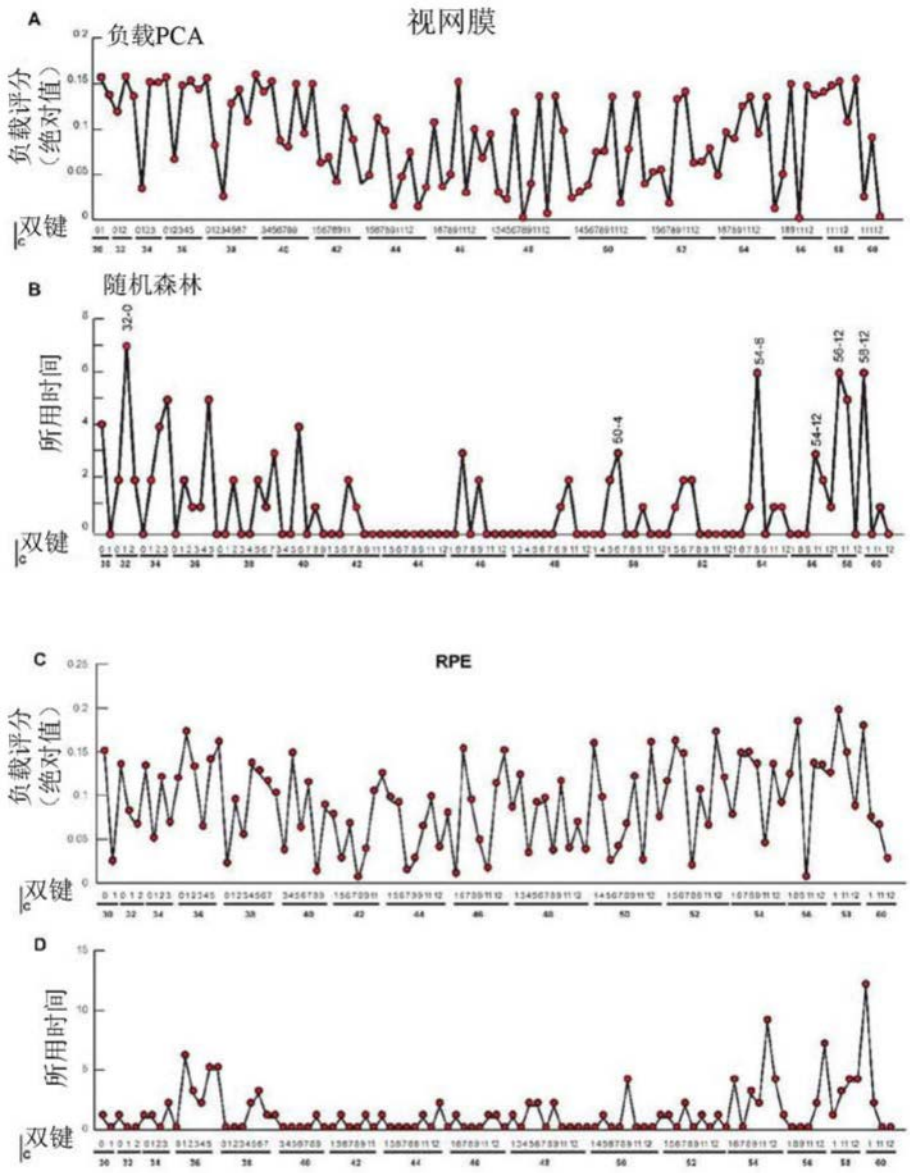

A
视网膜
负载PCA
负载评分（绝对值）
双键
B
随机森林
所用时间
双键
32-0
60-4
54-8
54-12
56-12
58-12
C
RPE
负载评分（绝对值）
双键
D
所用时间
双键

图59

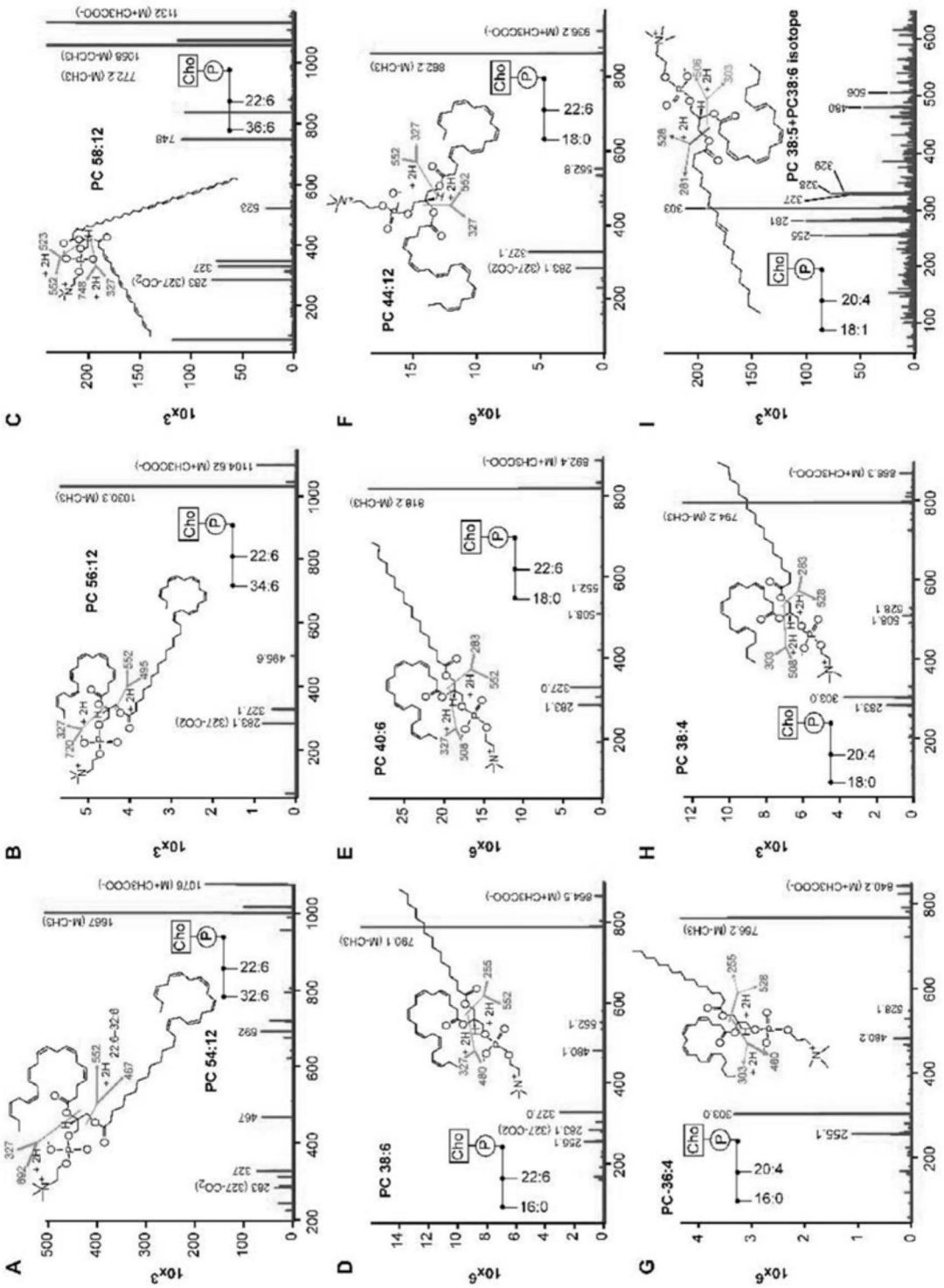

A
PC 54:12
Cho
22:6
32:6
B
PC 56:12
Cho
22:6
34:6
C
PC 58:12
Cho
22:6
36:6
D
PC 38:6
Cho
22:6
16:0
E
PC 40:6
Cho
22:6
18:0
F
PC 44:12
Cho
22:6
18:0
G
PC-36:4
Cho
20:4
16:0
H
PC 38:4
Cho
20:4
18:0
I
PC 38:5+PC38:6 isotope
Cho
20:4
18:1

图60

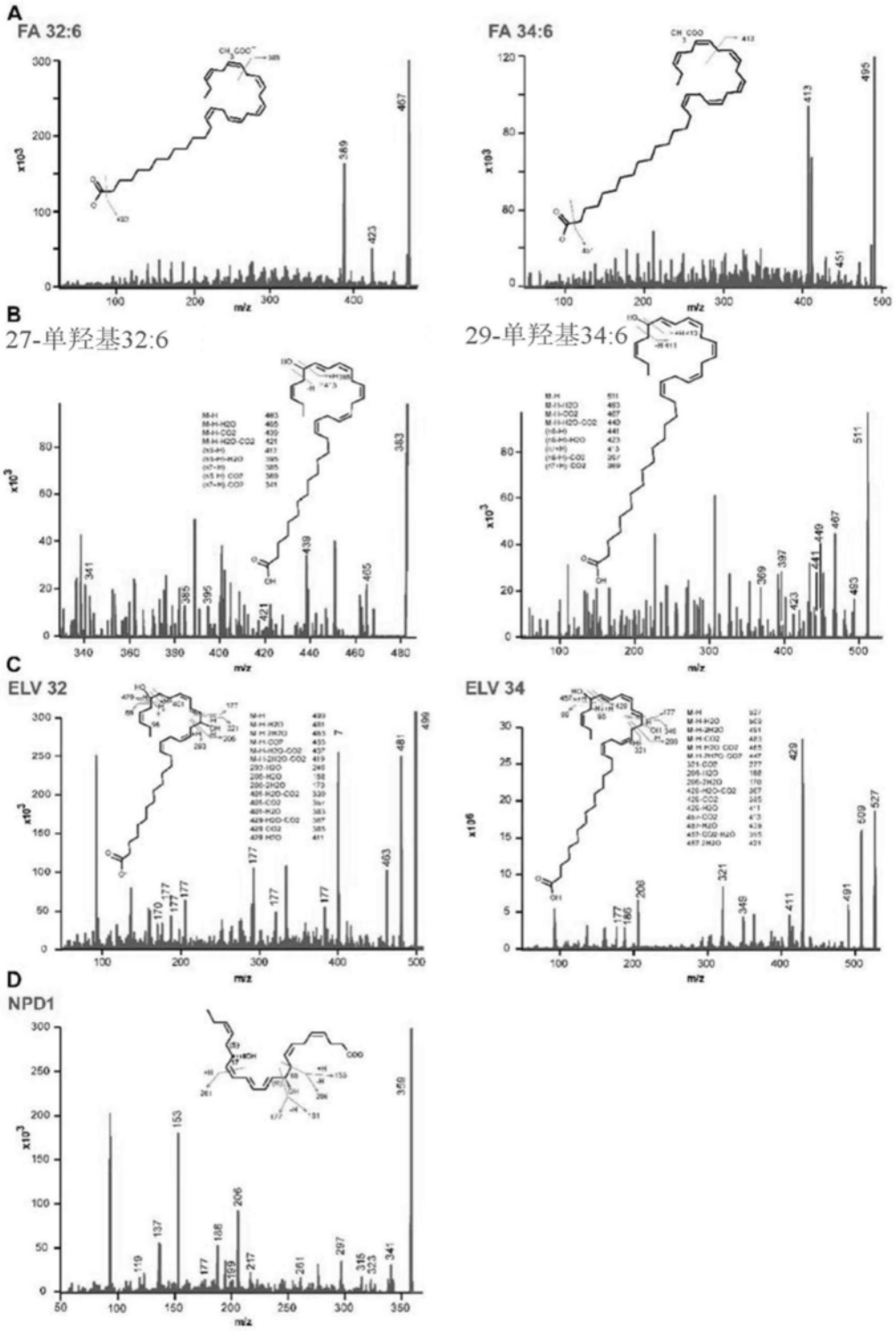


图61

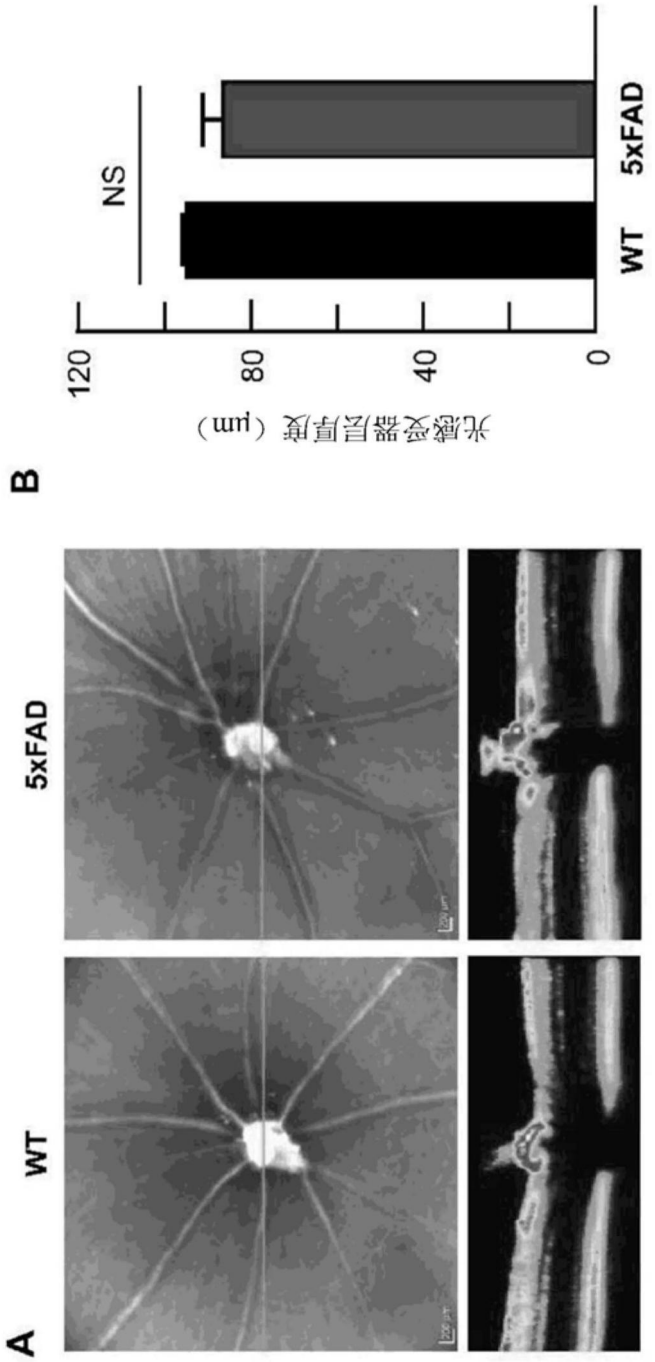


图62

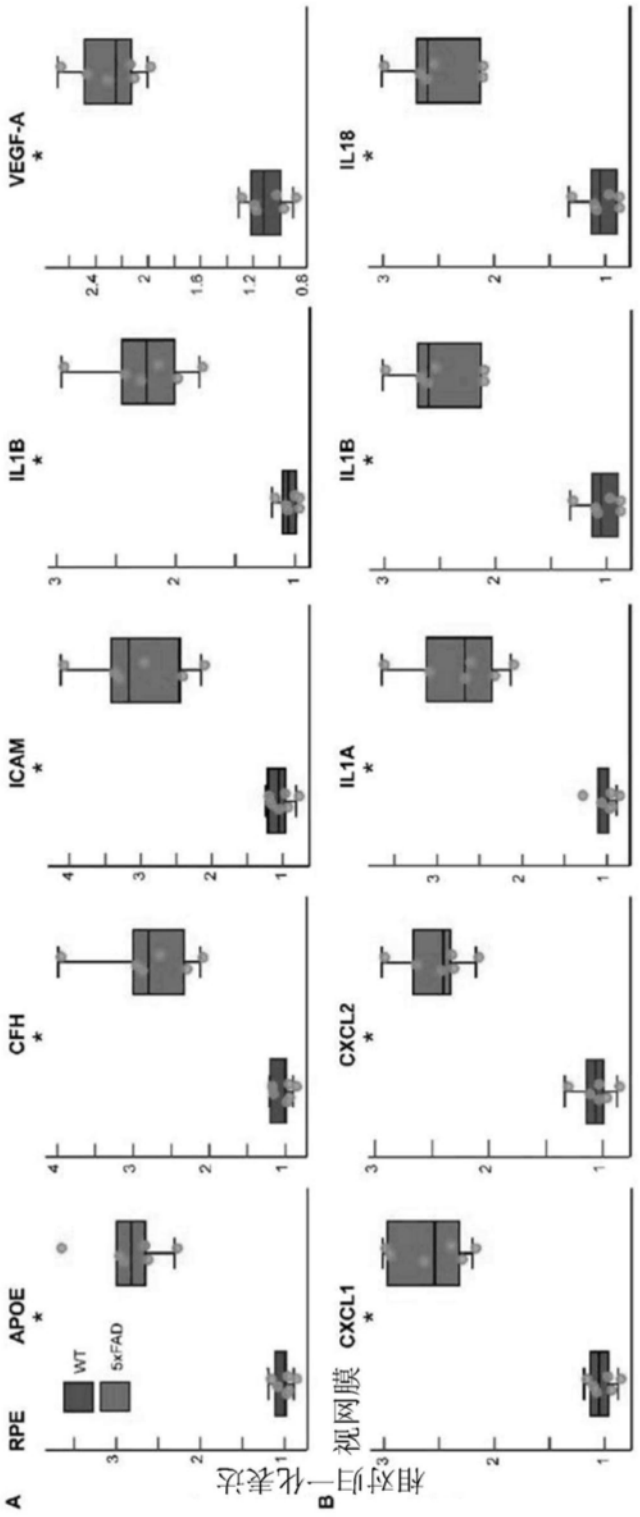

A
RPE
APOE
WT
5xFAD
CFH
ICAM
IL1B
VEGF-A
B
视网膜
CXCL1
CXCL2
IL1A
IL1B
IL18
相对归一化表达

图63

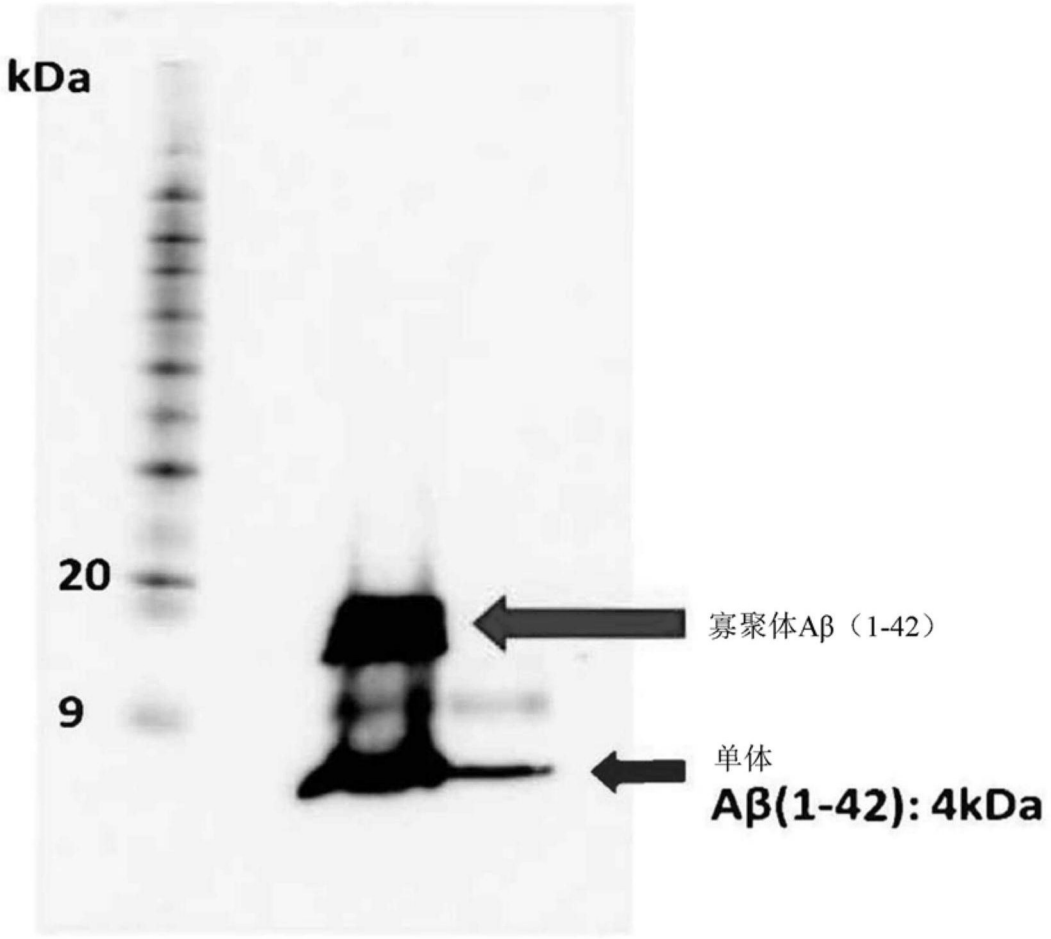


图64

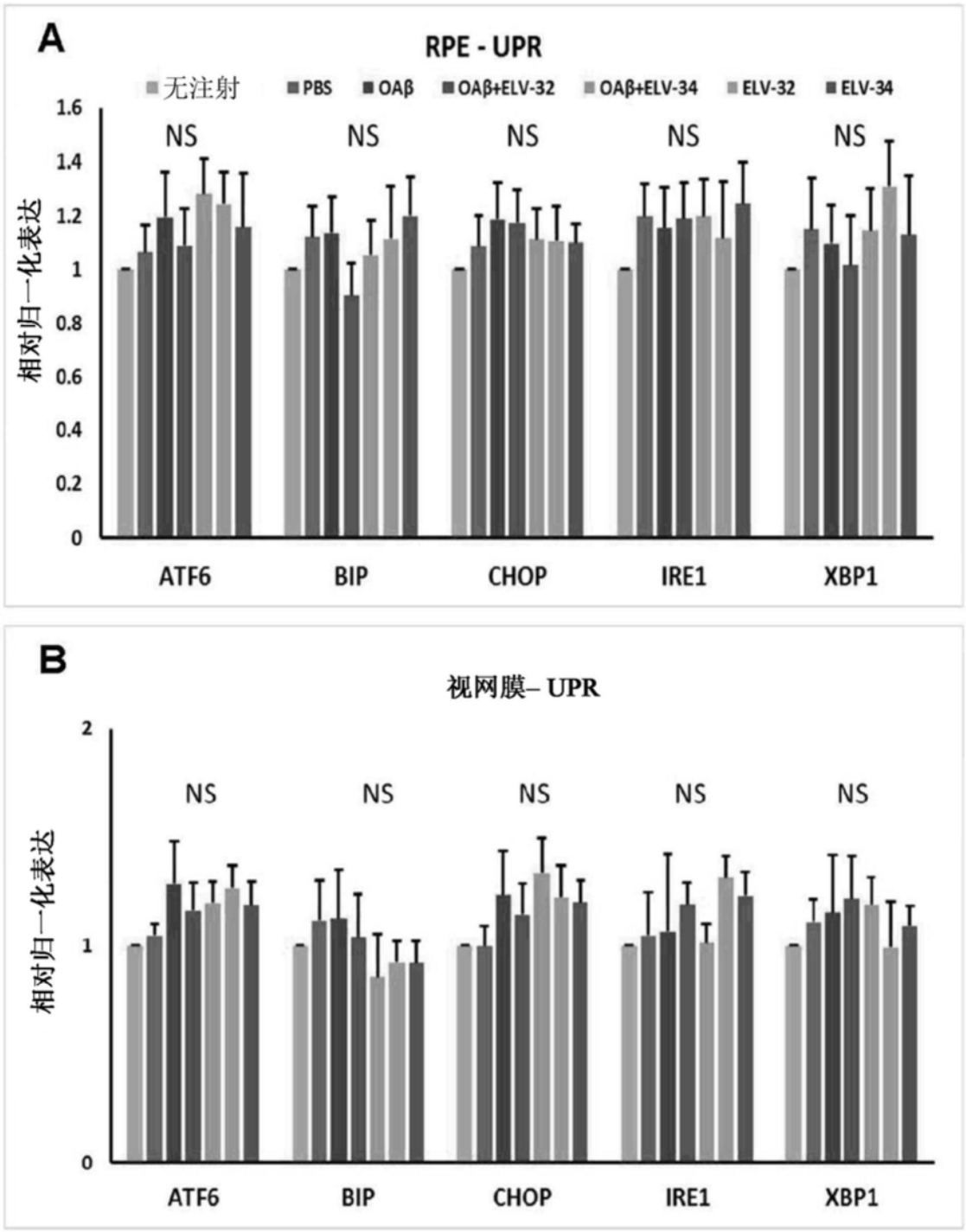

A
RPE - UPR
无注射
PBS
OAβ
OAβ+ELV-32
OAβ+ELV-34
ELV-32
ELV-34
相对归一化表达
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NS
ATF6
BIP
CHOP
IRE1
XBP1
B
视网膜– UPR
相对归一化表达
2
1
0

图65

	公司	目录号	应用	稀释	备注
p16INK4a	ABCAM	ab108349 ab211542 ab80221	蛋白质印迹	1/2000	特异于人类
p16INK4a	ABCAM		蛋白质印迹	1/1000	特异于小鼠 两者
15-Lox-1 ELOVL4	ABCAM		蛋白质印迹	1/500	
	GENETEX	GTX14924	蛋白质印迹	1/1000	两者
β淀粉样蛋白	BioLegend	SIG-39320	蛋白质印迹	1/500	人类
ZO-1	Invitrogen	18-7430	免疫荧光	1/250	两者

图66

基因	物种	正向	反向
p16Ink4a	小鼠	GCTCAACTACGGTGCAGATTC	GCACGATGTCTTGATGTCCC
p21Cip	小鼠	CGAGAACGGTGGAACTTTGAC	CCAGGGCTCAGGTAGACCTT
p27Kip	小鼠	TCAAACGTGAGAGTGTCTAACG	CCGGGCCGAAGAGATTTCTG
p53	小鼠	GCGTAAACGCTTCGAGATGTT	TTTTTATGGCGGGAAGTAGACTG
Il-6	小鼠	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
Cfh	小鼠	AGGCTCGTGGTCAGAACAAC	GTTAGACGCCACCCATTTTCC
Vegfa	小鼠	CCTGGTAATGGCCCCTCCTC	CCCCATTGCTCTGTGCCTTG
Apoe	小鼠	CTGACAGGATGCCTAGCCG	CGCAGGTAATCCCAGAAGC
Icam	小鼠	GTGATGCTCAGGTATCCATCCA	CACAGTTCTCAAAGCACAGCG
Il-1β	小鼠	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
Bax	小鼠	GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC	TTGCTGATGGCAACTTCAAC
Bad	小鼠	CTCCTCCTCCATCCCTTCAT	GAGCAACATTCATCAGCAGG
Casp3	小鼠	TGTACGCGCACAAGCTAGAATT	TGGAAAGTGGAGTCCAGGGAGA
Dapk1	小鼠	GATGAACTTGGCCGCATACT	ATGACTGTGTTCAGGCAGGA
Fas	小鼠	GATGCACACTCTGCGATGAAG	CAGTGTTCACAGCCAGGAGAAT
MMP1a	小鼠	GGTAAATAGATTCATGCCAGAAC	CCATGTACTAGAATCACGGG
MMP1b	小鼠	AGTCTTTGAGGAGGAAGGCGATA	CAAACCTAGGCCTGGCAGAA
MMP8	小鼠	AATCCTTGCCCATGCCTTTCAACC	CCAAATTCATGAGCAGCCACGAGA
MMP13	小鼠	TTCTGGTCTTCTGGCACACGCTTT	CCAAGCTCATGGGCAGCAACAATA
MMP2	小鼠	CCTTAAAAGTATGGAGCGACGTCA	AGCGTTCCCATACTTTACGCG
MMP9	小鼠	ACGACATAGACGGCATCCAGTATC	AGGTATAGTGGGACACATAGTGGG
MMP3	小鼠	ACCAACCTATTCCTGGTTGCTGCT	ATGGAAACGGGACAAGTCTGTGGA
MMP10	小鼠	CACTCCCTGGGTCTCTTTCA	TTTGTCTGGGGTCTCAGGTC
MMP14	小鼠	CCGCCATGCAAAAGTTCTAT	GCCCACCTTAGGGGTGTAAT
MMP24	小鼠	TGCAGATCGAACAGTTCTGG	TCGTTCGCCTTTGAAGAAGT
MMP7	小鼠	TGAATTTGGCCACTCTCTGGGTCT	TCTGAATGCCTGCAATGTCGTCCT
MMP12	小鼠	TAGAAGCAACTGGGCAACTGGACA	ACCGCTTCATCCATCTTGACCTCT
Atg3	小鼠	CATGTTGGACAGTGGTGGAC	GAAGTGGCCGAGTACCTGAC
Atg5	小鼠	ACAGCTTCTGGATGAAAGGC	TGGGACTGCAGAATGACAGA
Atg7	小鼠	TGTGGTTGCTTGCTTCAGAC	GAAGGATTCACCTTCCTAGCG
Beclin-1	小鼠	GGCGAGTTTCAATAAATGGC	CCAGGAACTCACAGCTCCAT
Actb	小鼠	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GCCGGACTCATCGTACTCC
Gapdh	小鼠	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Tfrc	小鼠	ATGCCGACAATAACATGAAGGC	ACACGCTTACAATAGCCCAGG
Tbp	小鼠	AGAACAATCCAGACTAGCAGCA	GGGAACTTCACATCACAGCTC
p16Ink4a	人类	GGGGGCACCAGAGGCAGT	GGTTGTGGCGGGGGCAGTT
p21Cip	人类	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC
p27Kip	人类	TAATTGGGGCTCCGGCTAACT	TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC
p53	人类	CCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTC	GCAGCGCCTCACAACCTCCGTCAT
Cfh	人类	CACACAAGATGGATGGTCGC	GGATGGCAGGCAACGTCTAT

图67

Vegfa	人类	ACTGCCATCCAATCGAGACC	GATGGCTTGAAGATGTACTCGATCT
Apoe	人类	TTCCTGGCAGGATGCCAGGC	GGTCAGTTGTTCCTCCAGTTC
Il-1β	人类	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA
Atg3	人类	GATGGCGGATGGGTAGATACA	TCTTCACATAGTGCTGAGCAATC
Atg5	人类	AGAAGCTGTTTCGTCCTGTGG	AGGTGTTTCCAACATTGGCTC
Atg7	人类	ATGATCCCTGTAACTTAGCCCA	CACGGAAGCAAACAACTTCAAC
Beclin-1	人类	GGTGTCTCTCGCAGATTCATC	TCAGTCTTCGGCTGAGGTTCT
Actb	人类	AGCCTCGCCTTTGCCGA	CTGGTGCCTGGGGCG
Gapdh	人类	TGGACCTGACCTGCCGTCTA	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC
ATF6	小鼠	GACTCACCCATCCGAGTTGTG	CTCCCAGTCTTCATCTGGTCC
BiP	小鼠	ACTTGGGGACCACCTATTCCT	ATCGCCAATCAGACGCTCC
CHOP	小鼠	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT
IRE1	小鼠	ACACCGACCACCGTATCTCA	CTCAGGATAATGGTAGCCATGTC
XBP1	小鼠	GACAGAGAGTCAAACTAACGTGG	GTCCAGCAGGCAAGAAGGT

图67续