



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115038434 A

(43) 申请公布日 2022.09.09

(21) 申请号 202080092916.8

B·君 N·A·佩塔西斯

(22) 申请日 2020.12.09

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

公司 11713

(30) 优先权数据

专利代理师 王建秀 刘小立

62/945,580 2019.12.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2022.07.12

A61K 31/202 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 9/08 (2006.01)

PCT/US2020/064042 2020.12.09

A61P 27/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/119146 EN 2021.06.17

(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 南加利福尼亚大学

(72) 发明人 H·巴赞 N·G·巴赞 T·L·彭

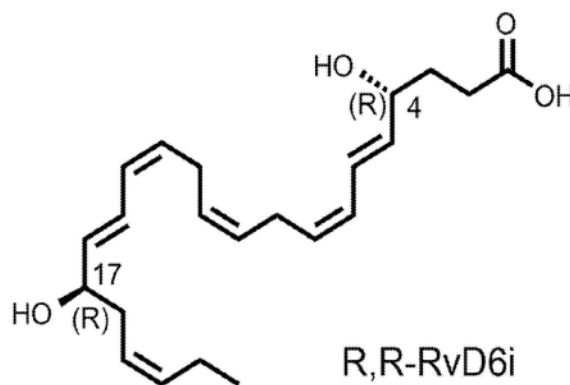
权利要求书1页 说明书39页 附图26页

(54) 发明名称

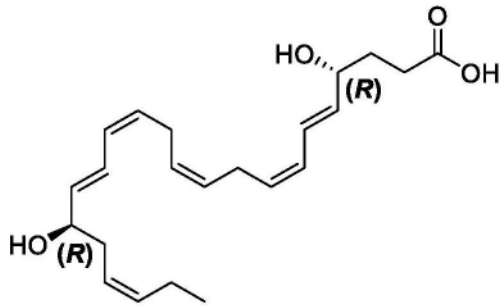
用于治疗角膜病变的生物分子

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗角膜病变的组合物和方法。具体而言,本发明的方面涉及一种生物分子和使用该生物分子治疗角膜病变的方法,所述病变影响组织神经支配。



1. 一种在有需要的受试者中治疗角膜病变的方法,所述方法包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物:



式 I。

2. 一种在有需要的受试者中保护角膜免受角膜病变的方法,所述方法包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物。

3. 一种促进有需要的受试者的角膜病变愈合的方法,所述方法包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中治疗角膜病变包括增加角膜神经密度、恢复角膜神经密度、修复轴突生长、诱导Rictor、诱导TIMP8基因表达、伤口愈合或其组合。

5. 根据权利要求1、2或3中任一项所述的方法,其中所述角膜病变包括干眼病(DED)、畏光、神经损伤、神经性疼痛、干眼样疼痛、角膜神经营养性溃疡、外伤、角膜创伤或神经营养性角膜炎。

6. 根据权利要求1、2或3中任一项所述的方法,其中所述组合物还包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂适用于局部施用。

8. 根据权利要求1、2或3所述的方法,其中所述组合物被配制用于局部施用。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述药物组合物被配制成滴眼剂。

10. 根据权利要求1、2或3中任一项所述的方法,其中所述组合物每小时、每天、每周或每月施用。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中治疗有效量包括约10ng至约1000ng的量。

## 用于治疗角膜病变的生物分子

[0001] 本申请要求2019年12月9日提交的美国临时申请第62/945,580号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 本文所引用的所有专利、专利申请和出版物均特此通过引用以其全文并入本文。这些出版物的公开内容特此通过引用以其全文并入本申请,以更全面地描述自本文所描述和要求保护的发明的日期起本领域技术人员已知的现有技术状态。

[0003] 本专利公开含有受版权保护的材料。版权所有人反对任何人对本专利文件或专利公开内容进行复制再现,因为其出现在美国专利与商标局的专利文档和记录中,但在其它方面保留任何和所有版权。

[0004] 政府利益

[0005] 本发明是根据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的批准号R01EY019465在政府支持下进行的。政府享有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0006] 本发明涉及用于治疗角膜病变的组合物和方法。具体而言,本发明的方面涉及一种生物分子和使用该生物分子治疗影响组织神经支配的角膜病变的方法。

### 背景技术

[0007] 干眼症主要在衰老过程中干扰视力。它也发生在类风湿性关节炎、糖尿病、甲状腺病变、环境条件(例如,暴露于烟雾或污染物)、长期使用隐形眼镜和屈光手术后。这种眼部病变是由缺乏润滑、阻止感染、滋养和维持眼表清洁的眼泪引起的。角膜神经支配是维持眼表完整性所必需的,神经损伤会减少泪液产生、眨眼反射,并扰乱上皮伤口愈合,导致透明度和视力丧失。

[0008] 来自三叉神经节(TG)神经元眼科分支的感觉神经的轴突穿透角膜缘区域周围的角膜基质,并在到达角膜上皮之前分支为上皮下丛,最终形成游离神经末梢。

[0009] 屈光手术造成神经损伤后,可能需要3-15年才能恢复角膜神经的完整性。结果,角膜敏感性降低并可能发展为干眼症,导致神经性疼痛、角膜溃疡,并且在严重的情况下,需要进行角膜移植。此外,干眼症与冷受体功能有关,例如瞬时受体电位melastatin 8 (TRPM8)通道,其可控制角膜表面冷却速率并维持正常的泪液分泌。即使在实验性角膜手术后很长时间,也会发生TRPM8末端的减少,这表明这些变化会导致手术后神经性疼痛。

### 发明内容

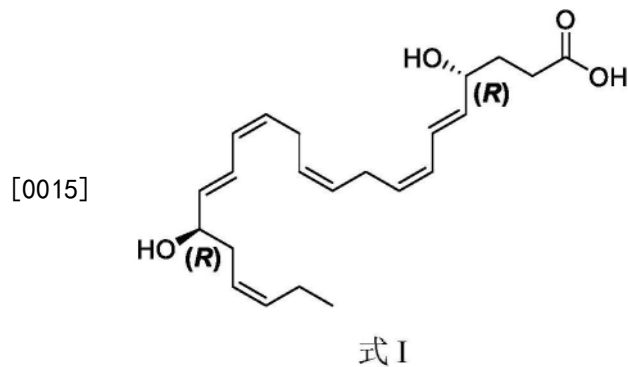
[0010] 本发明提供保护角膜免受角膜病变影响的方法。

[0011] 此外,本发明提供促进角膜伤口愈合的方法。

[0012] 最后,本发明提供了治疗角膜病变的方法。

[0013] 在实施方案中,该方法可以包括向眼睛表面施用包含治疗有效量的RvD6si的组合物。

[0014] 本发明的方面提供了在有需要的受试者中治疗角膜病变的方法。例如,该方法可以包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物:



[0016] 本发明的方面进一步提供了在有需要的受试者中保护角膜免受角膜病变影响的方法。例如,该方法可以包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物。

[0017] 更进一步,本发明的方面可以包括促进有需要的受试者的角膜病变愈合的方法。例如,方法可以包括向受试者眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物。

[0018] 在实施方案中,治疗角膜病变包括增加角膜神经密度、恢复角膜神经密度、修复轴突生长、诱导Rictor、诱导TIMP8基因表达、伤口愈合或其组合。

[0019] 在实施方案中,角膜病变包括干眼病(DED)、畏光、神经损伤、神经性疼痛、干眼样疼痛、角膜神经营养性溃疡、外伤、角膜创伤或神经营养性角膜炎。

[0020] 在实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0021] 在实施方案中,药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂适用于局部施用。

[0022] 在实施方案中,组合物被配制用于局部施用。

[0023] 在实施方案中,药物组合物被配制成滴眼剂。

[0024] 在实施方案中,所述组合物每小时、每天、每周或每月施用。

[0025] 在实施方案中,治疗有效量包括约10ng至约1000ng的量。

[0026] 本发明的其他目的和优点将从随后的描述中变得显而易见。

## 附图说明

[0027] 图1显示了来自用PEDF+DHA处理的小鼠泪液的峰1鉴定为RvD6si。(小图A)从16个角膜收集的损伤、治疗和撕裂样品的时间范围的实验设计。(小图B)样品中359m/z化合物(红色)在RT从7到9.5分钟内的总离子流(TIC)分析。检测到3个峰,m/z为359,被认为是二羟基-DHA产物。在本研究中,我们关注的是RT为8.20分钟的峰(峰1)。LTB4-d4内标(绿色)在8.25分钟洗脱。(小图C)所选峰1和RvD6标准的完整碎片分析。(小图D)峰1的结构解释,具有碰撞后碎片产物的质量(红色虚线表示断裂的键)。编号为1到6的碎片用于MRM检测。(小图E)峰1和RvD6的共注入。在本次运行中,峰1在8.10分钟洗脱,而RvD6在8.37分钟洗脱(蓝色 LTB4-d4内标在8.15分钟洗脱)。所有产物离子都匹配相同的RT差异。(小图F)峰1和RvD6的UV二极管阵列曲线,在238.09nm处具有最大吸光度。

[0028] 图2显示了源自添加的DHA的RvD6si。(小图A) RvD6si-d5的结构,具有碰撞后碎片产物的质量(红色虚线表示断裂的键)。源自DHA-d5的五个氘将RvD6的m/z从359(左列)移动到364(右列)。移位的产物离子在C21和C22处含有氘标记(蓝色)。对于MRM检测,使用了一种

移位产物离子和一种非移位产物离子(红色虚线框)。(小图B) RvD6si的MRM检测,源自DHA-d5(红色虚线框)或常规DHA(绿色虚线框)。跃迁MRM检测方法显示在每个图表的顶部。蓝色峰是LTB<sub>4</sub>-d<sub>4</sub>内标。合并窗口显示源自DHA-d<sub>5</sub>或DHA的RvD6si在相同的RT下洗脱,这意味着它们是相同的化合物。(小图C)来自B的RvD6si-d<sub>5</sub>的完整碎片分析。(小图D)在增加的DHA浓度对RvD6si的量化。游离DHA及其衍生物如14-HDHA、17-HDHA和RvD6si随着DHA浓度逐渐增加,而游离AA及其衍生物12-HETE和15-HETE则没有。

[0029] 图3显示了RvD6si的分离。(小图A)从分级洗脱中检测RvD6si。在通过LC-MS/MS分析合成RvD6si的存在之前,使用带有C18柱的UPLC系统在洗脱时间6到12分钟内每30秒收集一次来自泪液和培养基的样品。合并级分6、7和8。(小图B)组合级分6-8的质谱分析以确认RvD6si的分离。359m/z的TIC显示出独特的峰,而所有二羟基-DHA产物(359→297和359→279)的MRM扫描证实没有其他二羟基-DHA衍生物。此外,单氢-DHA(343→299和343→281)或三羟基-DHA(375→277)的MRM扫描没有显示分离的RvD6si的纯度的峰。

[0030] 图4显示RvD6增强角膜伤口愈合和敏感性。(小图A)伤口愈合实验的实验设计。(小图B)损伤后20小时用亚甲蓝染色的角膜受伤区域的代表性图像。(小图C)受伤和治疗后计算的伤口闭合。(小图D)角膜敏感性以及角膜和TG组织收集的实验图。(小图E)使用非接触式触觉计(N=40个角膜)在未受伤小鼠中记录的角膜敏感性分布。(小图F)每3天记录一次角膜敏感性。RvD6si治疗的小鼠在第3、6和9天具有显著更高的敏感性,而PEDF+DHA和RvD6治疗组仅在第9天表现出更高的角膜感觉。在第12天,测试的化合物和载体之间没有差异。统计p值来自单向ANOVA,然后是Tukey诚实显著性差异(HSD)多重成对比较。

[0031] 图5显示RvD6s增强角膜神经再生。(小图A)用总角膜神经的泛标记物抗PGP9.5和小鼠角膜中的主要神经肽SP染色的正常角膜神经的整体图像。在整体图像中用虚线框标记的插图显示了放大的角膜中心区域,具有双重PGP 9.5和SP染色,以及单独的PGP 9.5和SP。(小图B和C)在损伤和治疗后12天的代表性整体图像和计算的PGP 9.5(小图B)和SP(小图C)阳性轴突的神经密度。将数据归一化至基线(小图A中未受伤的角膜)。统计p值来自单向ANOVA,然后是Tukey诚实显著性差异(HSD)多重成对比较。

[0032] 图6显示了角膜损伤和RvD6s处理后TG转录组的变化。(小图A)TG RNA测序数据的主成分分析显示了三组分析样品的良好聚簇的转录谱。(小图B)RvD6(粉红色)和RvD6si(绿色)之间共享上调和下调基因的维恩图,以载体样品作为参考。输入的基因从RvD6s到载体组有显著差异(FDR<0.05)。(小图C)轴突生长锥分类(GO-0044295)中两个显著增加基因的箱线图。(小图D)涉及炎症和疼痛的基因变化。(小图E和G)Rictor基因参与RvD6si神经再生机制的证据。(小图E)RvD6si\_vs\_载体和RvD6\_std\_vs\_载体的上游分析热图显示出显著的基因变化。RICTOR标有黑色粗体箭头。(小图F)RvD6si\_vs\_载体比较中RICTOR的详细信号通路显示在中间小图中。蓝色的钝箭头代表抑制的交互,红色尖端的箭头代表激活的交互,黄色箭头代表IPA分析的冲突交互。(小图G)Rictor基因表达的箱线图。统计p值来自单向ANOVA,然后是Tukey诚实显著性差异(HSD)多重成对比较。

[0033] 图7显示了从生物生产中分离的RvD6si的高纯度。将来自级分6至8的样品合并并使用具有特定MRM窗口的LC-MS/MS进行分析,以检测DHA、EPA和AA及其衍生物,包括HETE、LXA<sub>4</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α。所有MRM窗口均显示痕量目标化合物,表明分离的RvD6是纯的。

[0034] 图8显示来自Enrichr分析的细胞成分的基因本体。有许多组基因位于特定的细胞

区室。在这些组中,靶向轴突生长锥(GO:0044295)组。

[0035] 图9显示没有针对干眼和眼神经性疼痛的有效疗法。

[0036] 图10显示了一种新的RvD6立体异构体(RvD6si,局部应用)修复了小鼠受伤的角膜。

[0037] 图11显示了一种新的RvD6立体异构体(RvD6si)触发角膜神经再生。

[0038] 图12显示了RvD6异构体降低了三叉神经节中疼痛相关基因的表达并增加了TRPM8。

[0039] 图13显示了角膜结构和神经支配。小图A显示了苏木精和伊红组织学染色后人角膜的解剖结构。显示了所有五层:上皮、鲍曼层、基质、后弹力层和内皮。小图B显示了从45岁男性供体的左眼获得的完整人类角膜上皮神经网络的整体视图。小图C显示了从周边延伸到角膜中心会聚的上皮神经束的详细过程(小图B和C经许可从“Elsevier”参考文献5复制)

[0040] 图14显示在DHA局部治疗具有受损基质神经的小鼠角膜1小时后将DHA掺入PC和PE中。小图A显示小鼠角膜受损并用DHA局部治疗1小时,然后提取脂质并通过LC-MS/MS分析(27)。在sn-1中含有油酸(18:1)和在sn-2位置中含有DHA的PC和PE的比例。PE比PC更富含DHA。小图B显示了在角膜损伤和用PEDF+DHA局部治疗三小时后DHA的释放和单羟基-DHA衍生物的合成。通过基于质谱的脂质组学分析,分析角膜脂质谱。

[0041] 图15显示源自磷脂的sn-2位酯化的三种最丰富的必需脂肪酸AA、EPA和DHA的脂质介质。取决于主要的催化酶环氧合酶-2(COX-2)以及5和15脂氧合酶(5-LOX、15-LOX),可以合成多种参与炎症以及缓解消炎应答的生物活性脂质。来自AA的介质以橙色突出显示,EPA以绿色突出显示,DHA以蓝色突出显示。

[0042] 图16显示了RvD6i的结构。这种新的异构体是在用PEDF+DHA局部刺激小鼠受伤的角膜后合成的,并在眼泪中释放出来。通过LC-MS/MS对其进行分析,并且显示至少6个与RvD6标准匹配的子离子,但保留时间更早(40)。后验研究表明,峰保留时间与手性色谱柱中化学合成的R,R-RvD6i一致。

[0043] 图17显示RvD6i加速角膜伤口愈合和敏感性。小图A显示了在损伤上皮和前部基质神经20小时后用亚甲蓝染色的小鼠角膜受伤区域的代表性图像。这些动物每天接受三次含有相似浓度PEDF+DHA或RvD6i的滴眼液。用解剖显微镜拍摄图像并使用Photoshop软件进行量化(40)。小图B显示损伤后3、6和9天角膜敏感性的恢复,并使用非接触式触觉计进行PEDF+DHA或RvD6i(3次/天)治疗。RvD6i处理的小鼠比PEDF+DHA处理的角膜更快恢复敏感性。小图C显示了在RvD6i的TG中与炎症和疼痛相关的基因的表达,并通过RNA测序进行了分析(40)。Calcb和Tac1基因被下调,而(小图D)Trpm8和Rictor基因通过RvD6i治疗角膜在TG神经元中上调。

[0044] 图18显示了由PEDF+DHA的组合刺激的信号传导的示意模型。DHA迅速掺入角膜上皮的膜磷脂中,然后在PEDF-R的PEDF刺激后释放,具有iPLA2 $\zeta$ 活性。然后,游离DHA是类二十二烷(docosanoid)(如NPD1和新型RvD6i)的底物。然后这些类二十二烷被释放到眼泪中,并通过自分泌刺激到未定义的GPCR受体,该受体诱导神经营养因子NGF、BDNF和Sema7A的基因和蛋白质表达,这些营养因子分泌到眼泪中并增强轴突生长。RvD6i刺激角膜伤口愈合、角膜感觉和神经恢复以及泪液分泌。该机制涉及TG转录组的变化,激活与神经发生相关的基因和调节与神经性疼痛有关的基因。单独使用PEDF或DHA治疗不会激活这些途径,因此角膜

神经再生没有增加(19)。

### 具体实施方式

[0045] 本文描述的是发现泪液中释放的立体特异性消退素D6 (Resolvin D6) 异构体 (RvD6si), 其在角膜损伤时由神经营养因子色素上皮衍生因子 (PEDF) 和二十二碳六烯酸 (DHA) 激活。该新RvD6si通过恢复维持眼表完整性的高密度神经支配, 促进角膜伤口愈合、敏感性、神经再生和功能恢复。在感知角膜神经损伤并接受RvD6si治疗后, 三叉神经节 (TG) 的转录组增强了Rictor即mTOR的雷帕霉素不敏感复合物2 (mTORC2) 的基因表达, 以及参与轴突生长的基因的表达, 而与神经性疼痛相关的基因减少。该新RvD6异构体刺激信号返回三叉神经节神经元。该新RvD6异构体在三叉神经节中诱导了一个基因程序, 其修复轴突生长并减少神经性疼痛。结果, 发生眼部神经性疼痛和干眼症的减轻。因此, RvD6si为角膜病变开辟了新的治疗途径, 例如影响组织神经支配的角膜病变, 包括但不限于神经营养性角膜炎和干眼样疼痛。

[0046] 本文提供一个或多个实施方案的具体实施方式。然而, 应当理解, 本发明可以用各种形式来体现。因此, 本文所公开的具体细节不应被解释为限制性的, 而是作为权利要求书的基础并且作为教导本领域技术人员以任何适当的方式来采用本发明的代表性基础。

[0047] 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通常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。

[0048] 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公开的公开内容, 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。

[0049] 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方案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方案的特征分离或组合。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。

[0050] 除非另有说明, 否则本公开的实施方案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。

[0051] 除非上下文另外清楚地指明, 否则单数形式“一个 (a)”、“一种 (an)”和“所述 (the)”包含复数指示物。在权利要求书和/或说明书中, 当结合术语“包括 (comprising)”使用时, 词语“一个”或“一种”的使用可以指“一个/一种 (one)”, 但是还与“一个或多个/一种或多种 (one or more)”、“至少一个/至少一种 (at least one)”、以及“一个或多于一个/一种或多于一种 (one or more than one)”一致。

[0052] 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。

[0053] 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。

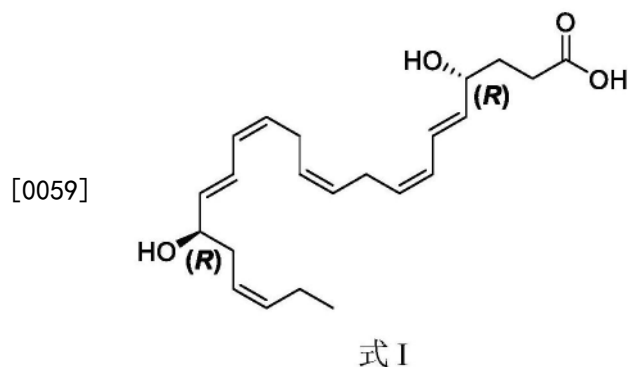
[0054] 术语“包括(comprising)”和“包含(including)”和“具有(having)”和“涉及(involving)”(和类似地“包括(comprises)”、“包含(includes)”、“具有(has)”和“涉及(involves)”)等可互换使用且具有相同含义。具体地,所述术语中的每个术语被定义成与“包括”的通用美国专利法定义一致,并且因此应被解释为意指“至少以下”的开放术语,并且还应被解释为不排除另外的特征、限制、方面等。因此,例如,“涉及步骤a、b和c的过程”意指包含至少步骤a、b和c的过程。无论在何处使用术语“一个”或“一种”,应理解为“一个或多个/一种或多种”,除非此种解释在上下文中是无意义的。

[0055] 如本文所用,本文中使用的术语“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,本文中使用的术语“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。

[0056] 本发明的一些方面涉及保护受试者角膜的方法。例如,在一个实施方案中,该方法包括向受试者的眼睛表面施用包含治疗有效量的RvD6si的组合物。

[0057] 化合物

[0058] 本文所述的生物分子的一个实施方案具有以下式I的结构:



[0060] 式I指(4R,5E,7Z,10Z,13Z,15E,17R,19Z)-4,17-二羟基二十二碳-5,7,10,13,15,19-六烯酸。在实施方案中,术语消退素D6(Resolvin D6)立体特异性异构体(RvD6si)、RvD6异构体、RvD6s、RvD6i或立体特异性消退素D6-异构体、4R,17R-二羟基-DHA可以互换使用,并且可以指例如式I的生物分子。然而,应理解,此类术语不必仅限于根据式I的生物分子。在实施方案中,例如,术语“RvD6异构体”或“RvD6立体特异性异构体”可指消退素D6的除了式I之外的其他异构体。

[0061] 如本文所用,术语“异构体”可以指具有相同分子式的不同化合物。如本文所用,术语“立体异构体”可以指其原子以相同顺序键合但原子在空间中的排列不同的异构体。立体异构体可以指“对映异构体”或“非对映异构体”。如本文所用,术语“对映异构体”可以指彼此不可重叠镜像的立体异构体。如本文所用,术语“非对映异构体”可以指不是彼此镜像的立体异构体。如本文所用,术语“立体特异性”可以指在化学或酶促反应中一种立体异构体相对于另一种立体异构体的转化。

[0062] 角膜是眼睛前部的透明外层。角膜帮助受试者的眼睛聚焦光线,使受试者可以清楚地看到。

[0063] 本发明的方面可以防止(即预防)或治疗角膜疾病或角膜损伤,以及由此造成的损

害。“角膜疾病”可以指角膜的任何疾病或损伤,例如由各种因素引起的,例如由物理/化学损伤、刺激、过敏、细菌/真菌/病毒感染、角膜溃疡引起的角膜炎。也可指角膜上皮损伤(如脱离、角膜糜烂)、角膜上皮水肿、角膜烧伤、化学品引起的角膜腐蚀、干眼症等。“角膜损伤”可以指角膜上的擦伤(划痕)。在某些情况下,小伤可以自行愈合;然而,更深的划痕或其他伤害会导致角膜疤痕和视力问题。“角膜损伤”可以指对角膜的任何损伤,例如由例如病原体、炎症、物理刺激(例如隐形眼镜或紫外线)、化学刺激(例如药物)、神经损伤、累积疲劳引起的损伤,但不限于此。可伴有疼痛、红眼、角膜混浊、眩目、异物感等症状。如本文所用,术语“疾病”、“损伤”和“功能障碍”可与“病变”互换使用。

[0064] 本发明的方面可以避免(即预防)或治疗角膜病变。

[0065] 本发明的其他方面可以促进角膜病变的愈合。术语“促进愈合”或“加速愈合”可以指与不治疗相比产生有利的结果。有利的结果包括,例如,减少瘢痕形成、减少炎症、正常组织再生或瘢痕组织生长、神经再生、神经支配、伤口闭合、感染减少和与潜在病变相关的死亡率/发病率降低。

[0066] 角膜病变的实例包括但不限于干眼病(DED)、畏光、神经性疼痛、干眼样疼痛、角膜神经营养性溃疡、外伤、角膜创伤、神经营养性角膜炎或其组合。如本文所用,术语“神经性疼痛”可以指由于外周和/或中枢感觉通路受损或外周和/或中枢感觉通路功能障碍以及神经系统功能障碍引起的疼痛。

[0067] 花粉等过敏症会刺激眼睛并导致过敏性结膜炎(可称为红眼病)。这会使人眼睛发红、发痒和流泪。

[0068] 角膜炎是指角膜的炎症(如发红和肿胀)。与隐形眼镜相关的感染是角膜炎的最常见原因。

[0069] 当受试者的眼睛没有足够的眼泪来保持湿润时,就会出现干眼症。这可能会让人不舒服,并可能导致视力问题。

[0070] 当物质在角膜上堆积时,角膜营养不良会导致视力模糊。这些疾病通常在家族中传播。

[0071] 还有许多不太常见的疾病会影响角膜——包括眼疱疹、Stevens-Johnson综合征、虹膜角膜内皮综合征和翼状胬肉。本发明的方面可以包括增加和/或恢复角膜神经密度、角膜神经完整性和/或角膜神经敏感性的方法。例如,本发明的一个实施方案可以包括通过眼部施用包含治疗有效量的式I的组合物来治疗受试者的角膜病变的方法,其中治疗角膜病变包括增加角膜神经密度、恢复角膜神经密度、修复轴突生长、诱导Rictor基因表达、伤口愈合或其组合。Rictor基因编码RICTOR蛋白,它是哺乳动物雷帕霉素不敏感复合物2(mTORC2)靶标的关键成分,其在损伤后在感觉神经元的抗炎和轴突生长中发挥作用。本发明的方面可以进一步提供角膜神经再生和/或神经支配的方法。如本文所用,短语“神经再生”可以指包括神经元细胞在内的细胞的修复或再生。如本文所用,短语“神经支配”可以指神经进入组织的过程和/或向组织例如角膜组织供应神经的过程。

[0072] 本发明的一些方面还涉及促进角膜伤口愈合的方法。例如,在一个实施方案中,该方法包括向受试者眼部(例如,向眼睛表面)施用包含治疗有效量的式I(例如,RvD6si)的组合物。

[0073] “伤口”,例如“角膜伤口”可以指组织结构的连续性或完整性的物理破坏。“伤口愈

合”可以指组织完整性的恢复。应当理解,这可以指组织完整性的部分或完全恢复。因此,伤口的治疗可以指促进、改善、进展、加速或以其他方式推进与伤口愈合过程相关的一个或多个阶段或过程。

[0074] 更进一步,本发明的方面涉及治疗干眼症的方法。术语“干眼症”是指泪液和眼表(包括角膜、结膜和眼睑)的多因素疾病,导致不适、视力障碍和泪膜不稳定的症状,可能对眼表造成损害,如由“干眼病的定义和分类:2007年国际干眼工作坊指南”,*Ocul Surf* 2007, 5 (2):75-92定义的)。干眼症可伴有泪膜渗透压增加和眼表炎症。干眼症包括干眼综合征、干燥性角膜结膜炎(KCS)、功能障碍性泪液综合症、泪道角膜结膜炎、蒸发性泪液缺乏症、水性泪液缺乏症和LASIK诱导的神经营养性上皮病(LNE)。

[0075] 术语“受试者”或“患者”可以指可以向其施用本公开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。可以被施用本公开的化合物的典型的受试者将是哺乳动物,特别是灵长类动物,尤其是人类。对于兽医应用,多种受试者将是合适的,特别家畜,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,特别是宠物,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”可以指上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)。

[0076] 化合物的短语“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。

[0077] 如本文所使用的,“制剂”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。术语制剂可以包含液体、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。本公开的制剂还可以包含或包装有其它无毒化合物,如载体、赋形剂、粘合剂和填充剂等。考虑用于实践本发明的可接受的载体、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制剂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。

[0078] 术语“施用”可以指使用玻璃体内、眼内、眼部、视网膜下、鞘内、静脉内、皮下、经皮、皮内、颅内、局部等施用向受试者提供治疗有效量的制剂或药物组合物。本发明的制剂或药物化合物可以单独施用,但也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。

[0079] 在实施方案中,组合物“眼部”施用或是通过“眼部施用”。如本文所用,“眼部施用”可以指对眼部进行局部施用,而不进行注射。眼部施用的非限制性实例包括溶液(滴眼剂)、凝胶、软膏和胶剂型(纳米颗粒、纳米胶束、脂质体和微乳液)的引入。眼部施用在本领域中是众所周知的(参见例如Gaudana等人,2010,“Ocular Drug Delivery”*AAPS J.* 12 (3): 348-360,通过引用并入本文)。

[0080] 在实施方案中,组合物“局部”施用,或是通过“局部施用”。术语“局部施用”可以指将组合物应用于身体的局部区域或身体部位的表面,而不管作用的位置如何,例如眼睛表

面。典型的局部施用部位包括皮肤或粘膜上的部位。

[0081] 施用可以通过载体或媒剂,例如注射溶液、局部溶液或眼用溶液。合适的溶液包括但不限于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。

[0082] 在实施方案中,组合物和制剂将被配制成溶液、悬浮液和其他剂型以用于局部施用,例如施用于受试者的眼睛表面。基于易于配制、生物相容性(特别是考虑到要治疗的疾病,例如角膜疾病和损伤)以及患者的通过滴注一滴或更多滴溶液到受影响的眼睛表面容易地施用此类组合物的能力,可以使用水溶液。然而,组合物也可以是悬浮液、粘性或半粘性凝胶、或其他类型的固体或半固体组合物。对于在水中溶解度较低的组合物,悬浮液可能是优选的。

[0083] 如本文所用,术语“局部滴眼液”可以指将组合物作为液体、凝胶或软膏施用于受试者的角膜外表面。术语“液滴体积”可以指类似于液滴的眼科可接受液体的量。例如,液滴体积可以指对应于约5 $\mu$ L至约1000 $\mu$ L,例如约5 $\mu$ L至约500 $\mu$ L,例如约5 $\mu$ L至约200 $\mu$ L的液体体积。在实施方案中,液滴体积可包括约20 $\mu$ L。

[0084] 本公开的制剂或药物组合物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,包括但不限于葡萄糖、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。可用于实践本公开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、硅树脂等,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/制剂的有效性。

[0085] 可以校准制剂的不同形式以适应不同个体和单个个体的不同需要。在实施方案中,受试者可以是患有的一种或多种角膜病变的个体。例如,受试者可以是患有以下疾病的个体:干眼综合征,干燥性角膜结膜炎(KCS),功能障碍性泪液综合症,泪道角膜结膜炎,蒸发性泪液缺乏症,水性泪液缺乏症,LASIK诱导的神经营养性上皮病(LNE)眼部疱疹,Stevens-Johnson综合症、虹膜角膜内皮综合征,翼状胬肉,角膜损伤,如各种因素造成的,例如物理/化学刺激引起的角膜炎,过敏,细菌/真菌/病毒感染,角膜溃疡,内核损伤,干眼病(DED),畏光,神经性疼痛,干眼样疼痛,角膜神经营养性溃疡,外伤,角膜伤口,神经营养性角膜炎或其组合。

[0086] 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方案的量,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)。哺乳动物包括但不限于鼠类、猴类、人类、农场动物、竞技动物和宠物。术语“宠物”包括狗、猫、豚鼠、小鼠、大鼠、兔子、雪貂等。术语农场动物包括马、绵羊、山羊、鸡、猪、牛、驴、美洲驼、羊驼、火鸡等。

[0087] 治疗有效剂量可以取决于本领域普通技术人员已知的许多因素。剂量可以根据已知因素而变化,例如活性成分的药效学特征及其施用方式和途径;活性成分的施用时间;接受治疗的受试者或样品的身份、大小、状况、年龄、性别、健康和体重;症状的性质和程度;并发治疗的种类、治疗频率和期望的效果;和排泄率。这些量可由技术人员容易地确定。

[0088] 如本文所用,“眼用有效量”可以指组合物或药物组合物的实施方案的量,当施用于患者时,其预防、治疗或改善角膜疾病或角膜损伤或其相关病症。作为一个实例,“治疗干眼症的有效量”可以指当施用于患者时预防、治疗或改善干眼疾病或病症或其相关病况的量。

[0089] “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,并且包括兽医使用和/或人类药物使用可接受的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。“药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和/或佐剂”可以指一种和多种此类赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。

[0090] 如本文使用,“药物组合物”或“药物制剂”可以包含适合施用于受试者(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。可以将药物组合物配制成为与其预期的施用途径(例如眼部施用)和从业者期望的效果相容。

[0091] 在实施方案中,药物组合物可以包括治疗有效量的RvD6异构体和一种或多种另外的活性剂。这样的药物组合物(即,RvD6异构体和另外的活性剂)可以被称为结合组合物。合适的另外的活性剂包括但不限于一种或多种抗氧化剂、抗过敏剂、抗炎剂、抗病毒剂、抗菌剂、止痛剂、保湿剂、润滑剂或退烧剂。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。在实施方案中,抗氧化剂可以保护RvD6异构体的双键。

[0092] “药物组合物”可以是无菌的,并且可以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、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。

[0093] 术语“施用”可以指将本公开的组合物引入受试者中。组合物的一种施用途径是局部施用。另一种施用途径是眼部施用。在实施方案中,可以将组合物施用于眼睛表面。然而,可以使用任何施用途径,如口服、静脉内、皮下、腹膜、动脉内、吸入、阴道、直肠、鼻内、引入脑脊液、血管内静脉或动脉,或滴入身体隔室。

[0094] 在实施方案中,该组合物每小时施用一次。例如,约每小时、约每2小时、约每3小时、约每4小时、约每5小时、约每6小时、约每8小时、约每10小时、约每12小时、约每16小时、约每18小时、约每20小时或约每24小时,连续施用组合物。

[0095] 在实施方案中,可以每天施用组合物。例如,可以每天、大约每2天、大约每3天、大约每5天或大约每7天施用组合物。

[0096] 在实施方案中,可以每周施用组合物。例如,可以大约每周、大约每10天、大约每两

周、大约每18天、大约每3周或大约每25天施用组合物。

[0097] 在实施方案中,可以每月施用组合物。例如,可以大约每个月、大约每两个月、大约每3个月、大约每4个月、大约每5个月、大约每6个月、大约每7个月、大约每8个月、大约每9个月、大约每10个月、大约每11个月、或大约每12个月,施用组合物。在实施方案中,组合物可以一年施用一次,或一年多于一次。

[0098] 在实施方案中,组合物可以在角膜病理症状首次出现时施用,并且组合物的施用可以在症状减轻或缓解时停止,或者在症状减轻或缓解一段时间后停止。

[0099] 施用频率可以根据使用的制剂、正在治疗或预防的特定病症以及患者/受试者的病史而变化。一般而言,优选使用足以提供有效治疗的最小剂量。可以使用适合待治疗或预防的病症的定量或测试方法监测患者的治疗有效性,例如本文所述的角膜病变,这对于本领域普通技术人员来说是常规的。

[0100] 在实施方案中,施用的组合物的剂量包括约10ng至约1000ng。例如,施用的组合物的剂量可以包括约20ng至约500ng,例如约50ng至约100ng。在实施方案中,剂量可以包括约50ng-约80ng。

[0101] 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。

[0102] 待治疗的患者可以是哺乳动物,如人。治疗可以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。

#### [0103] 实施例

[0104] 下面提供了实施例,以促进更全面地理解本发明。以下实施例展示了制备和实践本发明的示范性模式。然而,本发明的范围并不限于仅出于说明目的在这些实施例中所公开的具体实施方案,因为可以使用替代性方法获得类似的结果。

#### [0105] 实施例A

[0106] 类二十二烷信号传导调节角膜神经再生:对泪液分泌、伤口愈合和神经性疼痛的影响

[0107] 角膜受密集神经支配,主要由三叉神经节(TG)的眼分支的感觉神经支配。这些神经对维持角膜稳态很重要,神经损伤会导致伤口愈合减少、角膜溃疡和干眼病(DED)增加以及神经性疼痛。诸如糖尿病、衰老、病毒和细菌感染等疾病,以及长期使用隐形眼镜和矫正视力的手术都会造成神经损伤。没有有效的疗法来缓解DED(一种多功能疾病),并且使用 $\omega$ -3补充剂的几项临床试验显示不清楚,有时甚至是负面的结果。使用角膜神经损伤的动物模型,我们显示用色素上皮衍生因子(PEDF)加二十二碳六烯酸(DHA)治疗角膜增加神经再生、伤口愈合和泪液分泌。该机制涉及钙非依赖性磷脂酶A2(iPLA2 $\zeta$ )的激活,该酶从磷脂中释放掺入的DHA,并增强类二十二烷神经保护素D1(NPD1)和新的消退素立体异构体RvD6i的合成。NPD1刺激脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)和信号素7A(Sema7A)的

合成。RvD6i治疗受损角膜可调节TG中的基因表达,从而增强神经发生;减少神经性疼痛和增加敏感性。总之,这些结果验证了重新建立角膜稳态的治疗性组合物和方法。

#### [0108] 角膜解剖学

[0109] 透明角膜通过让光线穿过并投射到视网膜上,占人眼屈光力的70%。此外,角膜还提供了调节免疫反应和防止病原体进入眼球的重要屏障。在解剖学上,角膜可分为五个亚层:上皮、Bowman层、基质或固有质、Descemet膜和内皮(1,2)(图13小图A)。

[0110] 上皮由5-7层非角化鳞状上皮细胞组成,这些细胞分为三种形态细胞类型:表层上皮细胞、中间翼细胞和具有高增殖率的最内层基底上皮细胞(2)。上皮细胞通过紧密的连接点连接起来,阻止灰尘、水和细菌等外来物质进入眼睛,并提供吸收氧气和细胞营养的光滑的表面。此外,上皮的最外层与泪膜接触,泪膜可以维持眼表的湿润并防止因干燥(干眼症,DE)造成的损伤。随着干细胞从角膜缘上皮向基底层移动,角膜上皮细胞经常经历“更替”。这些基底细胞向表面移动,产生两到三层翼细胞,然后开始终末分化和脱屑。平均而言,人角膜上皮细胞的更新时间在7-10天之间(3)。

[0111] Bowman层是薄的无细胞层,将上皮与基质分开。它主要含有胶原蛋白IV和层粘连蛋白。这些蛋白质的组织对于保持组织的透明度很重要。

[0112] 基质层由静止的角质细胞和组织良好的细胞外基质(ECM)构成,并且也构成角膜的最大部分(角膜厚度的约90%),细胞外基质主要由称为薄片的高度有序的I型胶原原纤维和蛋白聚糖组成。基质通过以防止散射的方式促进光通过胶原原纤维,为角膜提供结构支撑以及透明度。角质细胞(位于胶原纤维之间的扁平细胞)是角膜基质的主要细胞居民。

[0113] Descemet膜是由内皮合成的无细胞薄层,由纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原蛋白IV和VII以及蛋白聚糖组成。对Descemet膜的损伤会导致角膜水肿和视力丧失。

[0114] 角膜的最后一层是内皮,其与房水接触。它是负责泵送液体以调节角膜基质脱水的单层细胞。如果没有内皮泵,就会出现间质水肿,从而产生混浊和视力下降。人角膜内皮细胞的增殖能力非常低,导致与年龄相关的细胞密度降低。

[0115] 角膜的一个重要特征是其密集的神支配(图13小图B)。大多数角膜神经纤维起源于感觉,主要来源于三叉神经节(TG)的眼神经元(4-6)。在解剖学上,角膜神经网络起源于基质神经以放射状方式进入角膜巩膜缘时。为了保持角膜透明,到达的神经失去髓鞘,只被Schwann细胞包围。在间质中,粗大的分支分成较小的神经分支。大多数分支穿透外围的Bowman层并延伸到上皮的中心以形成上皮神经网络(图13小图C),从而为密集的神末梢网络提供生命。

[0116] 角膜神经刺激泪液分泌和眨眼以保持眼表的完整性(7)。角膜神经支配的改变发生在衰老、糖尿病、免疫疾病,如类风湿性关节炎和Sjögren综合征、病毒和细菌感染、长期使用隐形眼镜和屈光手术,如激光原位角膜磨镶术(LASIK)和屈光性角膜切除术(PRK)中(8-13)。神经损伤的并发症会降低敏感性,减少泪液分泌和眨眼,因此,在严重的情况下会发生产生神经性疼痛和角膜溃疡的DE病(DED)。由于感觉神经丰富,角膜也是人体疼痛的有效产生器。

[0117] PEDF+DHA治疗角膜相关损伤。消退素D6立体异构体的发现。

[0118] 如前所述,损伤后,角膜神经密度缓慢且不完全恢复,敏感性和DE症状降低。我们实验室的研究表明,神经生长因子(NGF)与 $\omega$ -3脂肪酸二十二碳六烯酸(DHA)结合的应用导

致兔实验性PRK后角膜神经密度恢复更快(14)。当时,这些机制可能是由DHA衍生的脂质介质神经保护素D1(NPD1)介导的,该神经保护素是一种具有强效抗炎和神经保护作用的类二十二烷(15)。视网膜色素上皮(RPE)细胞中NPD1的合成受到几种生长因子的刺激,其中色素上皮衍生因子(PEDF)的效力是NGF的10倍(16)。PEDF是一种广泛作用的神经营养和神经保护因子,其调节与血管生成、神经元细胞存活和细胞分化相关的过程(17),并在损伤后从角膜上皮释放(18)。后来的研究表明,用PEDF+DHA治疗可减轻炎症并刺激兔和小鼠角膜实验手术模型以及糖尿病和单纯疱疹病毒(HSV1)感染等疾病中的角膜伤口愈合和神经再生(19-23)。该行动需要同时使用PEDF和DHA进行治疗(19)。PEDF的44个氨基酸片段具有神经保护活性,而相邻的34个氨基酸肽具有抗血管生成活性(24,25)。在兔角膜基质解剖模型中比较两种肽与全PEDF蛋白加DHA的效果,我们发现,与34-mer-PEDF不同,44-mer-PEDF+DHA减少炎症并增加泪液分泌和角膜敏感性,并且还通过激活PEDF受体(PEDF-R)促进角膜神经的再生(21)。这种跨膜受体在角膜中表达,并具有释放DHA的钙非依赖性磷脂酶A2(iPLA<sub>2</sub>)活性(26,27),其通过补充DHA在膜磷脂的sn-2位置富集。

[0119] 对小牛角膜的研究发现,磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和鞘磷脂是组织中的主要磷脂(28)。在这些磷脂中,PC是最丰富的,在上皮中的含量最高。在人类(29)和兔角膜(30)中报告了类似的观察结果。在兔子中,油酸(18:1)是所有角膜层的磷脂中酯化的主要脂肪酸(约占磷脂中总脂肪酸的50%),其次是棕榈酸(16:0),其占约16-18%。在磷脂中酯化的多不饱和脂肪酸(PUFA)中,百分比较高(约占总脂肪酸的9%)的对应于花生四烯酸(AA),而在磷脂中酯化的二十碳五烯酸(EPA)和DHA的百分比低得多(约占总脂肪酸的1.6%)(30)。

[0120] DHA对基质神经受损的小鼠角膜进行的局部治疗使脂肪酸快速掺入到含有18:1-DHA的PC和PE分子种类中(27),这表明添加PUFA在脂质膜组合物中产生了显著的DHA富集(图14小图A)。

[0121] 组织损伤激活磷脂酶A2,其从sn-2位置释放PUFA,例如AA、EPA和DHA(31,32)。我们实验室和其他人的一些早期研究表明,角膜对损伤有反应,通过激活环氧合酶-2(COX-2)增加前列腺素(PG)的合成(33-36)和通过激活脂氧合酶(LOX)增加羟基二十碳四烯酸(HETE)和脂氧素A4(LXA4)的合成(37-39)。由于膜脂中DHA的浓度非常低(图14小图A)和(30),我们发现向用PEDF处理的角膜中添加DHA对于增加具有强抗炎特性的DHA的脂质衍生物(类二十二烷)的合成很重要(19,40,41)。因此,通过用PEDF+DHA处理角膜来激活PEDF-R的iPLA<sub>2</sub>导致从角膜释放的游离DHA增加超过3000倍(图14小图B)。

[0122] 然后,游离DHA是合成14-和17-氢过氧DHA(HpDHA)的底物,后者迅速转化为更稳定的羟基-DHA衍生物(HDHA)(图14小图B)。这些结果证实,PEDF+DHA处理刺激了源自DHA的类二十二烷的形成。

[0123] 图15显示了由AA、EPA和DHA产生的生物活性脂质的示意图。虽然许多AA脂质介质以及一些EPA脂质介质具有强的促炎特性,但所有已知DHA介质(类二十二烷)都可以保护和解决炎症(42,43)。它们构成了一个名为专门的前消退素介质(SPM)家族的一部分,该家族包括NPD1和D系列的其他保护素、maresins和消退素(43)以及新的保护素(PCTR)、maresins(MCTR)和消退素(RCTR)的硫化物缀合物。产生SPM的合成机制涉及脂氧合酶(包括作为主要催化剂的15-LOX和作为次要催化剂的5-LOX)、环氧合酶(在阿司匹林存在下)和细胞色素

P450酶(44)。关于DHA脂质介质的信号传导机制的信息仍然有限,尤其是其受体的鉴定(表1)。大多数已知的受体属于G蛋白偶联受体家族。此外,一些类二十二烷具有相同的受体,但它们的激活会发挥特定的生物活性(43)。

[0124] 表1. 报告的类二十二烷受体列表。

名称	受体	参考文献	角膜中的表达
消退素 D1	ALX/FPR2, GPR32 (DRV1)	(44)	是
消退素 D2	GPR18 (DRV2)	(45)	ND
消退素 D3	ALX/FPR2, GPR32 (DRV1)	(46)	是
消退素 D4	不适用	-	-
消退素 D5	GPR32	(47)	ND
消退素 D6	不适用	-	-
神经保护素 D1	GPR37 (Pael-R)	(48)	ND
Maresin 1	LGR6	(49)	ND
Maresin 2	不适用	-	-

[0125] 我们发现了一种新的类二十二烷,消退素D6 (RvD6) 的一种立体异构体,称为RvD6i (图16),它在受伤和用PEDF+DHA治疗后在鼠泪液中释放(40)。这种新脂质的碎片模式显示至少有六个匹配的产物离子与RvD6一致。在一些组织中发现了消退素D6,对健康个体血浆的研究表明,RvD6是一种随着年龄增长而降低的生物标志物(50)。RvD6也从分离自人牙周韧带的干细胞中释放出来,这对组织再生很重要(51)。然而,在正常人类眼泪中未检测到RvD6(52)。与使用PEDF+DHA和RvD6的治疗相比,新的RvD6i加速了角膜伤口愈合和敏感性,展示了更高的生物活性(图16小图A和B)。

[0127] 使用DHA治疗干眼病。

[0128] DED影响5%到40%的40岁以上成年人(53,54),估计美国有1640万人受到影响(55)。在最近的干眼研讨会(DEWS II)中,干眼被定义为“一种以泪膜失去稳态为特征的眼表多因素疾病,并伴有眼部症状,其中泪膜不稳定和高渗性,眼表炎症和损伤,以及神经感觉异常具有病因学作用”(54)。

[0129] 在过去的十年中,已经有许多针对不同病因的DED患者使用 $\omega$ -3脂肪酸DHA和EPA补充剂的临床试验,其论点是膳食脂肪酸可以掺入泪腺和血浆磷脂中(56)。然而,口服PUFA补充剂对DED的影响存在争议。虽然一些研究显示有所改善,但其他研究显示效果微不足道。在表2中,我们总结了过去十年中进行的临床试验,其中补充DHA用于治疗不同病因的DED。

[0130] 表2. 过去10年使用 $\omega$ -3FAs治疗的DED临床试验总结。

[0131]

研究	患者/治疗人数	随机的 /受控的	掩蔽	效果	备注
Brignole- Baudouin et al., 2011 (57)	干眼症, n = 127, 时间 = 90 天 第 1 组, n = 61 142.5 mg EPA、95 mg DHA 和补充 剂, 每天 3 次 第 2 组, n = 66 安慰剂, 中链甘油三酯, 每天 3 次	是/是	双倍的	无显著效 果	在治疗组中仅检测到 HLA-DR 阳性 细胞百分比的降 低。
Wojtowicz et al., 2011 (58)	干眼症, n = 36, 时间 = 90 天 第 1 组 450mg 的 EPA 和 300mg 的 DHA 以及 1000mg 的亚麻籽油, 每天 1 次 第 2 组 安慰剂, 小麦胚芽油	是/是	双倍的	无显著效 果	泪液蒸发没有变 化。
Bhargava et al., 2013 (59)	干眼症, n = 528, 时间 = 3 个月 第 1 组, n = 264 325 mg EPA 和 175 mg DHA, 每天 2 次 第 2 组, n = 254 安慰剂, 每天 2 次	是/是	双倍的	改进	
Kangari et al., 2013 (60)	干眼症, n = 64, 时间 = 30 天 第 1 组, n = 33 180 mg EPA 和 120 mg DHA, 每天 2 次 第 2 组, n = 31 安慰剂, 中链甘油三酯	是	双倍的	略有改进	

[0132]

Oleňik et al., 2013 (61)	睑板腺功能障碍, n = 64, 时间 = 3 个月 第 1 组, n = 33 Brudysec(350 mg DHA、42,5 mg EPA、30 mg DPA), 每天 3 次 第 2 组, n = 31 安慰剂, 500mg 葵花籽油, 每日 3 次 所有患者均接受使用中性婴儿洗发水和不含防腐剂的人工泪液清洁眼睑边缘	是/否	双倍的	略有改进	角膜染色与安慰剂没有显著差异。
Ong et al., 2013 (62)	健康的屈光角膜切除术(PRK)患者, n = 18, 时间 = 6 周 第 1 组, n = 9 250mg EPA 和 DHA)、333mg 亚麻籽油和 61 IU 维生素 E, 每天 3 次 第 2 组, n = 9 对照	是/是	单一	改进	治疗时间为 PRK 手术前 2 周至手术后 1 个月。
Sheppard et al., 2013 (63)	患有干眼症的绝经后妇女, n = 38, 时间 = 6 个月 第 1 组, n = 19 49 mg ALA、31.5 mg EPA、3.75 mg DPA, 25 mg DHA、177.5 mg LA、60 mg GLA, <0.75 AA 和补充剂, 每天 4 次 第 2 组, n = 19 安慰剂	是/是	双倍的	改进	安慰剂治疗也增加了 HLA-DR 强度 $36\% \pm 9\%$ 和与补充治疗相比, CD11c 增加了 $34\% \pm 7\%$ 。
Oleňik et al., 2014 (64)	干眼症, n = 905, 时间 = 12 周 Brudysec(350 mg DHA、42,5 mg EPA、30 mg DPA), 每天 3 次 没有安慰剂对照	否/否	否	改进	共有 68.1% 的患者报告在治疗后对隐形眼镜有更好的耐受性。
Georgakopoulos et al., 2015 (65)	干眼症糖尿病患者, 时间 = 3 个月 第 1 组, n = 36 170 mg EPA 和 115 mg DHA, 每天 3 次	否/否	否	改进	
Bhargava et al., 2015 (66)	计算机相关干眼症, n = 456, 时间 = 3 个月 第 1 组, n = 220 180 mg EPA 和 120 mg DHA, 每天 2 次 第 2 组, n = 236 含有橄榄油的安慰剂, 每天 2 次 基线 - T0 治疗 1 个月-T1 治疗 2 个月-T2 治疗 3 个月-T3	是/是	双倍的	改进	

[0133]	Deinema, 2017 (67)	干眼症, n = 54, 时间 = 3 个月 第 1 组, n = 18 磷虾油(945mg/天 EPA + 510mg/天 DHA) 第 2 组, n = 19 鱼油(1000mg/天 EPA + 500mg/天 DHA) 第 3 组, n = 17 安慰剂(橄榄油, 1500mg/天)	是/是	双倍的	略有改进	磷虾和鱼油均能减轻干眼症状。磷虾油组的促炎细胞因子白细胞介素 17A 仅在第 90 天显著降低。
	Goyal et al., 2017 (68)	LASIK 患者, n = 60, 时间 = 12 周 第 1 组, n = 30 180 mg EPA 和 120 mg DHA, 每天 4 次 第 2 组, n = 3 安慰剂	是/是	双倍的	略有改进	Lissamine 的结膜染色较少。
	DREAM, 2019 (69)	干眼症, n = 499, 时间 = 12 个月 第 1 组, n = 329 400 mg EPA 和 200 mg DHA, 每天 5 次 第 2 组, n = 170 安慰剂, 1000mg 的精制橄榄油, 每天 5 次	是/是	双倍的	无显著效果	显著增加红细胞中的 EPA 和 DHA。
	Fogt et al., 2019 (70)	干眼症, n = 19, 时间 = 1 小时 药物 1, n = 19 <u>Refresh Optive + <math>\omega</math>3, 亚麻籽油药物</u> 2, n = 19 <u>Refresh Optive</u> 随机挑选药物进行两次不同的访问 (之间 > 2 天)	是/是	双倍的	改进(短时间)	两种处理的脂质层厚度(LLT)在 15 分钟时从基线增加。只有 Refresh Optive + $\omega$ 3 患者在滴注后 1 小时内具有较高的 LLT。

[0134] 下划线表示使用局部滴眼液的临床试验。

[0135] 最重要的试验之一是DREAM研究,该研究共涉及499名患者,其中329名接受12个月EPA和DHA补充,170名患者接受精制橄榄油作为安慰剂(69),表明没有改善。这项研究增加了对DHA治疗DED益处的怀疑。出于这个原因,在这篇评论中,我们指出了可以解释DHA补充结果的问题。

[0136] 一个问题是DHA补充的形式。大多数研究使用天然的富含鱼油。然而,对鱼油成分的分析表明,PUFA主要在甘油三酯中酯化。饮食中的DHA需要被肝脏吸收,然后在膜磷脂的sn-2位被酯化,主要是PC(71)。然后DHA磷脂在被释放到血流中之前被包装在极低密度脂蛋白(VLDL)或其他脂蛋白中(71,72)。因此,从鱼油中补充的DHA或EPA到达眼表,尤其是角膜,是非常低的。这得到了先前研究的支持,其中主要含有长链PUFA的PC的磷虾油在大鼠血液和大脑中的吸收率高于鱼油(73)。只有一项研究使用磷虾油治疗DED,这是一项小型临床试验(每组18名参与者),其中Deinema及其同事在处理90天后显示,补充磷虾油的眼表疾病指数和IL-17A水平低于鱼油(67)和表2。

[0137] 此外,重要的是要注意角膜是无血管的,因此不太可能将膳食脂肪酸掺入角膜细胞膜中。一项使用<sup>14</sup>C标记的DHA口服给大鼠的研究支持了这一点,该研究显示DHA到达眼室的比例非常小(低于口服剂量的0.03%)(74)。在这个数量中,可能进入角膜的量非常低,因

为视网膜从视网膜下血管中吸收了大部分DHA。因此,泪腺中的PUFA富集不足以确保对角膜进行有益的治疗。

[0138] 据我们所知,只有一项使用局部DHA的临床试验((70)和表2)。

[0139] 该试验基于先前的研究表明AA、DHA和EPA存在于DED患者的眼泪中,并且 $\omega$ -6(AA): $\omega$ -3(DHA+EPA)的比率与泪膜功能障碍的严重程度相关(75)。小型试验(19名局部使用DHA治疗的患者)表明,使用含有 $\omega$ -3脂肪酸的滴眼液治疗可在滴注后1小时内增加泪膜的脂质层厚度(70)。

[0140] 最后,我们的动物研究表明,DHA迅速掺入角膜磷脂中,主要在PE和PC中,以增加神经密度。神经密度的降低是DED的一个有据可查的改变,其需要PEDF和DHA来再生神经。该治疗释放DHA并刺激RvD6i的合成,并且这种类二十二烷可增加伤口愈合和敏感性(图17小图A和B),并且不希望受理论束缚,对于DED,其比DHA具有更好的治疗用途(40)。

[0141] 在几种不同的损伤、感染、糖尿病、角膜血管生成和移植模型上,类二十二烷在减少炎症和增加角膜伤口愈合、神经再生和泪液分泌方面的有效性已得到明确证明(表3)。这些结果强调了类二十二烷作为强效药物的作用。

[0142] 表3. 使用PEDF+DHA或类二十二烷对角膜损伤的体内研究。

动物/模型	类二十二烷	施用	关键结果
[0143] 小鼠角膜上皮切除直至角膜/边缘边界 2005 (76)	NPD1 17S-HDHA	外用眼药水, 每天3次, 持续96小时	增加再上皮化率 增加角膜中的PMN 减少促炎趋化因子KC的形成

[0144]

小鼠 缝合诱导的炎症性角膜血管生成 2009 (77)	RvD1	结膜下注射, 每 48 小时一次 时间 = 14 天	浸润性中性粒细胞和巨噬细胞数量减少, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、VEGF-A、VEGF-C 和 VEGFR2 的 mRNA 表达水平降低。 抑制缝合诱导或 IL-1 $\beta$ 诱导的血管生成(HA), 但不抑制淋巴管生成。
兔子实验 PRK 2010 (19), 2012 (20), 2015 (21)	<u>PEDF+DHA</u> <u>PEDF</u> <u>domains + DHA</u>	局部使用胶原蛋白屏障, 每周两次 时间 = 8 周	治疗组神经密度和泪液分泌增加 8 周。用 PEDF+DHA。NPD1 合成在 1 周达到峰值, <u>PEDF+DHA 治疗组的这种合成量是对照组的四倍。</u> <u>PEDF 的 44-mer 结构域比 34-mer 结构域更有效</u>
兔子实验 PRK 2013 (41)	NPD1	NPD1 滴眼液(33ng/眼), 每天 3 次, 持续 6 周	角膜上皮神经和泪液分泌增加。 <u>治疗 2 天和 4 天后中性粒细胞浸润减少。</u>
小鼠角膜 同种异体移植 2014 (78)	RvD1 类似物	静脉注射	减少同种异体致敏。 减少移植部位的血管生成 提高移植存活率。
小鼠 2 型糖尿病 2017 (79)	RvD1 RvD1- 甲酯 RvD2- 甲酯	每天 ip 注射 1 ng/g 体重, 持续 8 周	减少了糖尿病引起的角膜神经丢失。 甲酯形式的生物活性低于游离脂肪酸。
兔子 HSV1 角膜感染 2017 (22)	<u>PEDF+DHA</u>	外用眼药水, 每天 3 次, 持续 2 周。 <u>局部使用胶原蛋白屏障, 每周两次, 持续 10 周以上</u>	CD4+T 细胞、中性粒细胞和巨噬细胞在第 7 天的浸润更强, 然后在第 14 天下降 <u>角膜神经密度在 12 周时随着角膜感觉功能恢复而增加。</u>
小鼠 1 型糖尿病 2mm 直径中心区域内的角膜上皮切除 2017 (23)	<u>PEDF+DHA</u>	外用眼药水, 每天 3 次, 持续 14 天	角膜上皮神经再生、P 物质阳性神经密度和泪液量增加。 <u>加速角膜伤口愈合, 选择性募集 2 型巨噬细胞, 防止中性粒细胞浸润</u>
小鼠 角膜神经切割 2017 (27)	<u>PEDF+DHA</u>	外用眼药水, 每天 3 次, 持续 7 天	增加神经再生和泪液分泌。 <u>PEDF-受体(PEDF-R)的磷脂酶 A2 活性是其工作机制所必需的</u>

[0145]

小鼠 1 型糖尿病 2mm 直径中心区域内的角膜上皮切除 2018 (80)	RvD1	外用眼药水, 每天 4 次, 持续 14 天	促进角膜上皮伤口愈合和神经再生
小鼠 2mm 直径中心区域内的角膜上皮切除 2020 (40)	<u>RvD6i</u>	外用眼药水, 每天 3 次, 持续 12 天	发现了 PEDF+DHA 机制背后的 RvD6i <u>增加角膜伤口愈合、敏感性和神经再生。减少炎症和疼痛相关的神经肽, 增加 TG 中的离子通道基因表达</u>

[0146] 下划线表示我们实验室的研究。

[0147] RvD6i调节参与TG中神经发生和疼痛的基因

[0148] 以前的研究表明,用PEDF和DHA治疗角膜也刺激了类二十二烷NPD1的合成。然而,合成量远低于RvD6i (19,40)。将NPD1添加到受损角膜时,神经营养因子NGF、脑源性神经营养因子(BDNF)和刺激轴突生长的信号素A2(Sema7A)的基因表达和蛋白质水平会增加(27)。这些蛋白质被分泌到泪液中并激活角膜神经末梢中的受体,以促进下游信号传导以及逆行至TG的神经元。

[0149] 使用RNA测序分析来自小鼠受损角膜的TG中的基因表达,我们揭示了PEDF+DHA的产物RvD6i,局部应用于角膜诱导了TG中两个有趣基因的表达,即9号染色体开放阅读框架72(C9orf72)和糖蛋白MGA(Gpm6A)(40)。这些基因刺激神经发生和生长锥形成(81,82)。

[0150] 在许多情况下,损害角膜神经的眼部病变会产生神经性疼痛(83)。此外,有大量患者出现DED症状并经历神经性疼痛,表明存在活跃的角膜-TG关系(84)。在用RvD6i治疗的角膜中,与疼痛有关的两个基因减少了:编码物质P(SP)的Tac1,它是角膜神经中表达最丰富的神经肽之一(4,85,86),以及编码降钙素基因相关肽(CGRP)的Calc1b(在角膜神经中也丰富)(4,20)(图17小图C)。两种神经肽在神经源性炎症和疼痛中都具有重要作用(87,88)。此外,用RvD6i进行的角膜治疗增加了瞬时受体电位melastatin 8(Trmp8)的基因表达(图17小图D)。TRPM8离子通道是冷传感器,其调节眼表的润湿并对慢性疼痛产生镇痛作用(89-93)。我们在前基质水平神经受损的小鼠模型中的研究表明,角膜TRPM8阳性神经纤维在损伤3个月后仅达到其正常密度的50%,这表明TRPM8的减少可能导致DE样疼痛(94)。因此,损伤和RvD6i治疗后SP和CGRP的表达降低而TRPM8的表达增加表明新的类二十二烷可以保护角膜免受疼痛。它还提供了用于治疗眼表损伤(例如角膜神经营养性溃疡)的组合物和方法,因为研究表明眼痛是由NGF局部治疗引起的角膜神经再生增加的副作用(95)。使用RvD1和RvD5的研究表明在胫骨骨折小鼠模型中减轻疼痛,而RvD3和RvD4没有影响(96)。这些差异可能是由于其受体的不同表达。在骨质疏松症小鼠模型中,RvDs 17R-羟基DHA的前体可通过AXL受体的激活降低疼痛行为(97)。另一个重要发现是RvD6i是TG中Rictor基因表达的强诱导剂(40)(图17小图D)。RICTOR是哺乳动物雷帕霉素不敏感复合物2(mTORC2)靶标的关键成分,并且在损伤后在感觉神经元的抗炎和轴突生长中发挥作用(98)。

[0151] 图18显示了PEDF和DHA刺激的类二十二烷信号通路的总结图。

[0152] 结论

[0153] 角膜神经支配在维持眼表稳态和组织清晰度方面发挥着关键作用(7)。对角膜神经的损伤会导致泪液产生和眨眼反射减少,并可能损害上皮伤口愈合,导致透明度和视力丧失(8-13)。因此,更好地了解角膜神经功能和修复将增加对影响角膜神经支配的病理的治疗策略。不希望受理论束缚,DHA衍生的类二十二烷,例如新的介质RvD6i,是减少角膜相关炎症的治疗方法。这种脂质在加速神经再生和调节TG中神经性疼痛成分的基因表达方面的作用可以为屈光手术后DE患者的治疗提供一种新的选择,以及对几种降低角膜神经密度的病理提供共同治疗。前瞻性人体临床试验可以验证这些新疗法对DE和眼表疾病的最佳剂量、施用方式、功效和安全性。

[0154] 此实施例中引用的参考文献

[0155] DelMonte, D.W. 和 T.Kim. 2011. Anatomy and physiology of the cornea. J.Cataract Refract.Surg.37:588-598.

- [0156] Meek, K. M. 和 C. Knupp. 2015. Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* 49:1-16.
- [0157] Hanna, C., D. S. Bicknell 和 J. E. O'Brien. 1961. Cell turnover in the adult human eye. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960. 65:695-698.
- [0158] Müller, L. J., C. F. Marfurt, F. Kruse 和 T. M. T. Tervo. 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76:521-542.
- [0159] He, J., N. G. Bazan 和 H. E. P. Bazan. 2010. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91:513-523.
- [0160] Al-Aqaba, M. A., V. K. Dhillon, I. Mohammed, D. G. Said, and H. S. Dua. 2019. Corneal nerves in health and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 73:100762.
- [0161] Shaheen, B. S., M. Bakir 和 S. Jain. 2014. Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59:263-285.
- [0162] He, J. 和 H. E. P. Bazan. 2012. Mapping the nerve architecture of diabetic human corneas. *Ophthalmology.* 119:956-964.
- [0163] Hamrah, P., A. Cruzat, M. H. Dastjerdi, L. Zheng, B. M. Shahatit, H. A. Bayhan, R. Dana 和 D. Pavan-Langston. 2010. Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology.* 117:1930-1936.
- [0164] Cruzat, A., D. Witkin, N. Baniyadi, L. Zheng, J. B. Ciolino, U. V. Jurkunas, J. Chodosh, D. Pavan-Langston, R. Dana 和 P. Hamrah. 2011. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52:5136-5143.
- [0165] He, J. 和 H. E. P. Bazan. 2013. Corneal nerve architecture in a donor with unilateral epithelial basement membrane dystrophy. *Ophthalmic Res.* 49:185-191.
- [0166] Pham, T. L., A. Kakazu, J. He 和 H. E. P. Bazan. 2018. Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201801957R.
- [0167] Garcia-Gonzalez, M., P. Cañadas, J. Gros-Otero, I. Rodriguez-Perez, R. Cañones-Zafra, V. Kozobolis 和 M. A. Teus. 2019. Long-term corneal subbasal nerve plexus regeneration after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract Refract. Surg.* 45:966-971.
- [0168] Esquenazi, S., H. E. P. Bazan, V. Bui, J. He, D. B. Kim 和 N. G. Bazan. 2005. Topical Combination of NGF and DHA Increases Rabbit Corneal Nerve Regeneration after Photorefractive Keratectomy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:3121-3127.
- [0169] Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, C. N. Serhan 和 N. G. Bazan. 2004. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:8491-8496.

- [0170] Mukherjee, P.K., V.L. Marcheselli, S. Barreiro, J. Hu, D. Bok 和 N.G. Bazan. 2007. Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:13152-13157.
- [0171] Tombran-Tink, J. 和 C.J. Barnstable. 2003. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:628-636.
- [0172] Kenchegowda, S., J. He 和 H.E.P. Bazan. 2013. Involvement of pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid and neuroprotectin D1 in corneal inflammation and nerve integrity after refractive surgery. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA.* 88:27-31.
- [0173] Cortina, M.S., J. He, N. Li, N.G. Bazan 和 H.E.P. Bazan. 2010. Neuroprotectin D1 Synthesis and Corneal Nerve Regeneration after Experimental Surgery and Treatment with PEDF plus DHA. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:804-810.
- [0174] Cortina, M.S., J. He, N. Li, N.G. Bazan 和 H.E.P. Bazan. 2012. Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960. 130:76-83.
- [0175] He, J., M.S. Cortina, A. Kakazu 和 H.E.P. Bazan. 2015. The PEDF Neuroprotective Domain Plus DHA Induces Corneal Nerve Regeneration After Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56:3505-3513.
- [0176] He, J., D. Neumann, A. Kakazu, T.L. Pham, F. Musarrat, M.S. Cortina 和 H.E.P. Bazan. 2017. PEDF plus DHA modulate inflammation and stimulate nerve regeneration after HSV-1 infection. *Exp. Eye Res.* 161:153-162.
- [0177] He, J., T.L. Pham, A. Kakazu 和 H.E.P. Bazan. 2017. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes.* 66:2511-2520.
- [0178] Houenou, L.J., A.P. D'Costa, L. Li, V.L. Turgeon, C. Enyadike, E. Alberdi 和 S.P. Becerra. 1999. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J. Comp. Neurol.* 412:506-514.
- [0179] Amaral, J. 和 S.P. Becerra. 2010. Effects of Human Recombinant PEDF Protein and PEDF-Derived Peptide 34-mer on Choroidal Neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:1318-1326.
- [0180] Notari, L., V. Baladron, J.D. Aroca-Aguilar, N. Balko, R. Heredia, C. Meyer, P.M. Notario, S. Saravanamuthu, M. -L. Nueda, F. Sanchez-Sanchez, J. Escribano, J. Laborda 和 S.P. Becerra. 2006. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J. Biol. Chem.* 281:38022-38037.
- [0181] Pham, T.L., J. He, A.H. Kakazu, B. Jun, N.G. Bazan 和 H.E.P. Bazan. 2017. Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J. Biol. Chem.* 292:18486-18499.

- [0182] Broekhuysen, R.M. 1968. Phospholipids in tissues of the eye. I. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 152:307-315.
- [0183] Tschetter, R.T. 1966. Lipid analysis of the human cornea with and without arcus senilis. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960. 76:403-405.
- [0184] Bazan, H.E. 和 N.G. Bazan. 1984. Composition of phospholipids and free fatty acids and incorporation of labeled arachidonic acid in rabbit cornea. Comparison of epithelium, stroma and endothelium. *Curr. Eye Res.* 3:1313-1319.
- [0185] Katsura, K., E.B. Rodriguez de Turco, B.K. Siesjö 和 N.G. Bazan. 2004. Effects of hyperglycemia and hypercapnia on lipid metabolism during complete brain ischemia. *Brain Res.* 1030:133-140.
- [0186] Rodriguez de Turco, E.B., L. Belayev, Y. Liu, R. Busto, N. Parkins, N.G. Bazan 和 M.D. Ginsberg. 2002. Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. *J. Neurochem.* 83:515-524.
- [0187] Bazan, H.E., D.L. Birkle, R. Beuerman 和 N.G. Bazan. 1985. Cryogenic lesion alters the metabolism of arachidonic acid in rabbit cornea layers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26:474-480.
- [0188] Bazan, H.E., Y. Tao, M.A. DeCoster 和 N.G. Bazan. 1997. Platelet-activating factor induces cyclooxygenase-2 gene expression in corneal epithelium. Requirement of calcium in the signal transduction pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:2492-2501.
- [0189] Liclican, E.L., V. Nguyen, A.B. Sullivan 和 K. Gronert. 2010. Selective Activation of the Prostaglandin E2 Circuit in Chronic Injury-Induced Pathologic Angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:6311-6320.
- [0190] Amico, C., M. Yakimov, M.V. Catania, R. Giuffrida, M. Pistone 和 V. Enea. 2004. Differential expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the cornea during wound healing. *Tissue Cell.* 36:1-12.
- [0191] Hurst, J.S., M. Balazy, H.E. Bazan 和 N.G. Bazan. 1991. The epithelium, endothelium, and stroma of the rabbit cornea generate (12S)-hydroxyeicosatetraenoic acid as the main lipoxygenase metabolite in response to injury. *J. Biol. Chem.* 266:6726-6730.
- [0192] Sharma, G.D., P. Ottino, N.G. Bazan 和 H.E. P. Bazan. 2005. Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase Calpha translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 280:7917-7924.
- [0193] Leedom, A.J., A.B. Sullivan, B. Dong, D. Lau 和 K. Gronert. 2010. Endogenous

LXA4Circuits Are Determinants of Pathological Angiogenesis in Response to Chronic Injury.*Am.J.Pathol.*176:74-84.

[0194] Pham,T.L.,A.H.Kakazu,J.He,B.Jun,N.G.Bazan和H.E.P.Bazan.2020.Novel RvD6stereoisomer induces corneal nerve regeneration and wound healing post-injury by modulating trigeminal transcriptomic signature.*Sci.Rep.*10:1-12.

[0195] Cortina,M.S.,J.He,T.Russ,N.G.Bazan和H.E.P.Bazan.2013.Neuroprotectin D1Restores Corneal Nerve Integrity and Function After Damage From Experimental Surgery.*Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*54:4109-4116.

[0196] Bazan,N.G.2018.Docosanoids and elovanoids from omega-3fatty acids are pro-homeostatic modulators of inflammatory responses,cell damage and neuroprotection.*Mol.Aspects Med.*64:18-33.

[0197] Serhan,C.N.和B.D.Levy.2018.Resolvins in inflammation:emergence of the pro-resolving superfamily of mediators.*J.Clin.Invest.*128:2657-2669.

[0198] Krishnamoorthy,S.,A.Recchiuti,N.Chiang,S.Yacoubian,C.-H.Lee,R.Yang,N.A.Petasis和C.N.Serhan.2010.Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors.*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*107:1660-1665.

[0199] Chiang,N.,J.Dalli,R.A.Colas和C.N.Serhan.2015.Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection.*J.Exp.Med.*212:1203-1217.

[0200] Dalli,J.,J.W.Winkler,R.A.Colas,H.Arnardottir,C.-Y.C.Cheng,N.Chiang,N.A.Petasis和C.N.Serhan.2013.Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents.*Chem.Biol.*20:188-201.

[0201] Chiang,N.,G.Fredman,F. **Bäckhed**,S.F.Oh,T.Vickery,B.A.Schmidt和C.N.Serhan.2012.Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements.*Nature.*484:524-528.

[0202] Bang,S.,Y.-K.Xie,Z.-J.Zhang,Z.Wang,Z.-Z.Xu和R.-R.Ji.2018.GPR37 regulates macrophage phagocytosis and resolution of inflammatory pain.*J.Clin.Invest.*128:3568-3582.

[0203] Chiang,N.,S.Librerros,P.C.Norris,X.de la Rosa和C.N.Serhan.2019.Maresin 1activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions.*J.Clin.Invest.*129:5294-5311.

[0204] Jové,M.,I.Maté,A.Naudí,N.Mota-Martorell,M.Portero-Otín,M.De la Fuente和R.Pamplona.2016.Human Aging Is a Metabolome-related Matter of Gender.*J.Gerontol.Biol.Sci.Med.Sci.*71:578-585.

[0205] Cianci,E.,A.Recchiuti,O.Trubiani,F.Diomedede,M.Marchisio,S.Miscia,R.A.Colas,J.Dalli,C.N.Serhan和M.Romano.2016.Human Periodontal Stem Cells Release Specialized Proresolving Mediators and Carry Immunomodulatory and Prohealing Properties Regulated by Lipoxins.*Stem Cells Transl.Med.*5:20-32.

[0206] English,J.T.,P.C.Norris,R.R.Hodges,D.A.Dartt和

C.N.Serhan.2017.Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics.Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.117:17-27.

[0207] The epidemiology of dry eye disease:report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop(2007).2007.Ocul.Surf.5:93-107.

[0208] Stapleton,F.,M.Alves,V.Y.Bunya,I.Jalbert,K.Lekhanont,F.Malet,K.-S.Na, D.Schaumberg,M.Uchino,J.Vehof,E.Viso,S.Vitale和L.Jones.2017.TFOS DEWS II Epidemiology Report.Ocul.Surf.15:334-365.

[0209] Farrand,K.F.,M.Fridman,I.Ö.Stillman和D.A.Schaumberg.2017.Prevalence of Diagnosed Dry Eye Disease in the United States Among Adults Aged 18Years and Older.Am.J.Ophthalmol.182:90-98.

[0210] Schnebelen,C.,S.Viau,S.Grégoire,C.Joffre,C.P.Creuzot-Garcher, A.M.Bron,L.Bretillon和N.Acar.2009.Nutrition for the eye:different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6and omega-3polyunsaturated fatty acid incorporation.Ophthalmic Res.41:216-224.

[0211] Brignole-Baudouin,F.,C.Baudouin,P.Aragona,M.Rolando,M.Labetoulle, P.J.Pisella,S.Barabino,R.Siou-Mermet和C.Creuzot-Garcher.2011.A multicentre, double-masked,randomized,controlled trial assessing the effect of oral supplementation of omega-3and omega-6fatty acids on a conjunctival inflammatory marker in dry eye patients.Acta Ophthalmol.(Copenh.).89:e591-e597.

[0212] Wojtowicz,J.C.,I.Butovich,E.Uchiyama,J.Aronowicz,S.Agee和 J.P.McCulley.2011.Pilot,Prospective,Randomized,Double-masked,Placebo-controlled Clinical Trial of an Omega-3 Supplement for Dry Eye.Cornea.30:308-314.

[0213] Bhargava,R.,P.Kumar,M.Kumar,N.Mehra和A.Mishra.2013.A randomized controlled trial of omega-3 fatty acids in dry eye syndrome.Int.J.Ophthalmol.6:811-816.

[0214] Kangari,H.,M.H.Eftekhari,S.Sardari,H.Hashemi,J.Salamzadeh,M.Ghassemi-Broumand和M.Khabazkhoob.2013.Short-term Consumption of Oral Omega-3and Dry Eye Syndrome.Ophthalmology.120:2191-2196.

[0215] Oleňik, A., I. Jiménez-Alfaro, N. Alejandre-Alba 和 I. Mahillo-Fernández.2013.A randomized,double-masked study to evaluate the effect of omega-3 fatty acids supplementation in meibomian gland dysfunction.Clin.Interv.Aging.8:1133-1138.

[0216] Ong,N.,T.Purcell,A.-C.Roch-Levecq,D.Wang,M.Isidro,K.Bottos,C.Heichel 和D.Schanzlin.2013.Epithelial Healing and Visual Outcomes of Patients Using Omega-3 Oral Nutritional Supplements Before and After Photorefractive

Keratotomy:A Pilot Study.*Cornea*.32:761-765.

[0217] Sheppard,J.,R.Singh,A.McClellan,M.Weikert,S.Scoper,T.Joly,W.Whitley,E.Kakkar和S.Pflugfelder.2013.Long-term Supplementation With n-6and n-3PUFAs Improves Moderate-to-Severe Keratoconjunctivitis Sicca:A Randomized Double-Blind Clinical Trial.*Cornea*.32:1297-1304.

[0218] Oleńik,A.2014.Effectiveness and tolerability of dietary supplementation with a combination of omega-3polyunsaturated fatty acids and antioxidants in the treatment of dry eye symptoms:Results of a prospective study.*Clin.Ophthalmol*.8:169-176.

[0219] Georgakopoulos,C.D.,O.E.Makri,D.Pagoulatos,P.Vasilakis,P.Peristeropoulou,V.Kouli,M.I.Eliopoulou和C.Psachoulia.2017.Effect of Omega-3 Fatty Acids Dietary Supplementation on Ocular Surface and Tear Film in Diabetic Patients with Dry Eye.*J.Am.Coll.Nutr*.36:38-43.

[0220] Bhargava,R.,P.Kumar,H.Phogat,A.Kaur和M.Kumar.2015.Oral omega-3fatty acids treatment in computer vision syndrome related dry eye.*Contact Lens AnteriorEye*.38:206-210.

[0221] Deinema,L.A.,A.J.Vingrys,C.Y.Wong,D.C.Jackson,H.R.Chinnery和L.E.Downie.2017.A Randomized,Double-Masked,Placebo-Controlled Clinical Trial of Two Forms of Omega-3 Supplements for Treating Dry Eye Disease.*Ophthalmology*.124:43-52.

[0222] Goyal,P.,A.K.Jain和C.Malhotra.2017.Oral Omega-3 Fatty Acid Supplementation for Laser In Situ Keratomileusis-Associated Dry Eye.*Cornea*.36:169-175.

[0223] n-3Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease.2018.*N.Engl.J.Med*.378:1681-1690.

[0224] Fogt,J.S.,N.Fogt,P.E.King-Smith,H.Liu和J.T.Barr.2019.Changes in Tear Lipid Layer Thickness and Symptoms Following the Use of Artificial Tears with and Without Omega-3 Fatty Acids:A Randomized,Double-Masked,Crossover Study.*Clin.Ophthalmol.Auckl.NZ*.13:2553-2561.

[0225] Polozova,A.和N.Salem.2007.Role of liver and plasma lipoproteins in selective transport of n-3fatty acids to tissues:a comparative study of 14C-DHA and 3H-oleic acid tracers.*J.Mol.Neurosci.MN*.33:56-66.

[0226] Bazan,N.G.,M.F.Molina和W.C.Gordon.2011.Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition:Significance in Aging,Neuroinflammation, Macular Degeneration,Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases.*Annu.Rev.Nutr*.31:321-351.

[0227] Ahn,S.H.,S.J.Lim,Y.M.Ryu,H.-R.Park,H.J.Suh和S.H.Han.2018.Absorption rate of krill oil and fish oil in blood and brain of rats.*Lipids Health Dis*.17:162.

- [0228] Graf, B.A., G.S.M.J.E. Duchateau, A.B. Patterson, E.S. Mitchell, P. van Bruggen, J.H. Koek, S. Melville 和 H.J. Verkade. 2010. Age dependent incorporation of <sup>14</sup>C-DHA into rat brain and body tissues after dosing various <sup>14</sup>C-DHA-esters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 83:89-96.
- [0229] Walter, S.D., K. Gronert, A.L. McClellan, R.C. Levitt, K.D. Sarantopoulos 和 A. Galor. 2016.  $\omega$ -3 Tear Film Lipids Correlate With Clinical Measures of Dry Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 57:2472-2478.
- [0230] Gronert, K., N. Maheshwari, N. Khan, I. R. Hassan, M. Dunn 和 M.L. Schwartzman. 2005. A Role for the Mouse 12/15-Lipoxygenase Pathway in Promoting Epithelial Wound Healing and Host Defense. *J. Biol. Chem*. 280:15267-15278.
- [0231] Jin, Y., M. Arita, Q. Zhang, D.R. Saban, S.K. Chauhan, N. Chiang, C.N. Serhan 和 R. Dana. 2009. Anti-angiogenesis Effect of the Novel Anti-inflammatory and Pro-resolving Lipid Mediators. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 50:4743-4752.
- [0232] Hua, J., Y. Jin, Y. Chen, T. Inomata, H. Lee, S.K. Chauhan, N.A. Petasis, C.N. Serhan 和 R. Dana. 2014. The Resolvin D1 Analogue Controls Maturation of Dendritic Cells and Suppresses Alloimmunity in Corneal Transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 55:5944-5951.
- [0233] Obrosova, A., L.J. Coppey, H. Shevalye 和 M.A. Yorek. 2017. Effect of Fish Oil vs. Resolvin D1, E1, Methyl Esters of Resolvins D1 or D2 on Diabetic Peripheral Neuropathy. *J. Neurol. Neurophysiol*. 8. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800519/> (Accessed March 10, 2020).
- [0234] Zhang, Z., X. Hu, X. Qi, G. Di, Y. Zhang, Q. Wang 和 Q. Zhou. 2018. Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice. *Mol. Vis*. 24:274-285.
- [0235] Sivadasan, R., D. Hornburg, C. Drepper, N. Frank, S. Jablonka, A. Hansel, X. Lojewski, J. Sterneckert, A. Hermann, P. J. Shaw, P. G. Ince, M. Mann, F. Meissner 和 M. Sendtner. 2016. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat. Neurosci*. 19:1610-1618.
- [0236] Formoso, K., M.D. Garcia, A.C. Frasca 和 C. Scorticati. 2016. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci*. 77:95-104.
- [0237] Goyal, S. 和 P. Hamrah. 2016. Understanding Neuropathic Corneal Pain--Gaps and Current Therapeutic Approaches. *Semin. Ophthalmol*. 31:59-70.
- [0238] Ferrari, G., F. Bignami, C. Giacomini, E. Capitolo, G. Comi, L. Chaabane 和 P. Rama. 2014. Ocular Surface Injury Induces Inflammation in the Brain: In Vivo and Ex Vivo Evidence of a Corneal-Trigeminal Axis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 55:6289-6300.
- [0239] He, J. 和 H.E.P. Bazan. 2016. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cor

nea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57:664-674.

[0240] He, J., T.L. Pham 和 H.E.P. Bazan. 2019. Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. *Vet. Ophthalmol.* 22:345-352.

[0241] Zieglgänsberger, W. 2019. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res.* 375:227-241.

[0242] Iyengar, S., M.H. Ossipov 和 K.W. Johnson. 2017. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 158:543-559.

[0243] Belmonte, C. 和 J. Gallar. 2011. Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52:3888-3892.

[0244] Parra, A., R. Madrid, D. Echevarria, S. del Olmo, C. Morenilla-Palao, M.C. Acosta, J. Gallar, A. Dhaka, F. Viana 和 C. Belmonte. 2010. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* 16:1396-1399.

[0245] Proudfoot, C. J., E. M. Garry, D. F. Cottrell, R. Rosie, H. Anderson, D. C. Robertson, S. M. Fleetwood-Walker 和 R. Mitchell. 2006. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol. CB.* 16:1591-1605.

[0246] Liu, B., L. Fan, S. Balakrishna, A. Sui, J. B. Morris 和 S.-E. Jordt. 2013. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. *Pain.* 154:2169-2177.

[0247] Fernández-Peña, C. 和 F. Viana. 2013. Targeting TRPM8 for Pain Relief. *Open Pain J.* 6:154-164.

[0248] He, J., T.L. Pham, A.H. Kakazu 和 H.E.P. Bazan. 2019. Remodeling of Substance P Sensory Nerves and Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Cold Receptors After Corneal Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60:2449-2460.

[0249] Lambiase, A., P. Rama, S. Bonini, G. Caprioglio 和 L. Aloe. 1998. Topical Treatment with Nerve Growth Factor for Corneal Neurotrophic Ulcers. *N. Engl. J. Med.* 338:1174-1180.

[0250] Zhang, L., N. Terrando, Z-Z Xu, S. Bang, S-E Jordt, W. Maixner, C.N. Serhan, R-R Ji. 2018. Distinct analgesic action of DHA and DHA-derived specialized pro-resolving mediators on post-operative pain after bone fracture in the mice. *Front Pharmacol.* 9:412.

[0251] Huang J, J.J. Burston, L. Li, S. Ashraf, P. I. Mapp, A. J. Bennett, S. Ravipati, P. Pousinis, D. A. Barret, B. E. Scammell, V. Chapman. 2017. Targeting the D series resolvins receptor system for the treatment of osteoarthritis pain. *Arthritis & Rheumatology* 69:996-1008.

[0252] Chen, N., P. Zhou, X. Liu, J. Li, Y. Wan, S. Liu 和 F. Wei. 2020. Overexpression of

Rictor in the injured spinal cord promotes functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34:6984-6998.

[0253] 实施例1

[0254] 介绍

[0255] 干眼症主要在衰老过程中干扰视力。它也发生在类风湿性关节炎、糖尿病、甲状腺病变、环境条件(例如,暴露于烟雾或污染物)、长期使用隐形眼镜和屈光手术后。这种病变是由缺乏润滑、阻止感染、滋养和维持眼表清洁的眼泪引起的。角膜神经支配是维持眼表完整性所必需的(1),神经损伤会减少泪液产生、眨眼反射,并扰乱上皮伤口愈合,导致透明度和视力丧失(2-5)。出于这个原因,干眼症和角膜神经损伤之间有很强的关系。

[0256] 来自三叉神经节(TG)神经元眼科分支的感觉神经的轴突穿透角膜缘区域周围的角膜基质,并在到达角膜上皮之前分支为上皮下丛,最终形成游离神经末梢(6-8)。

[0257] 在屈光手术(例如,激光辅助原位角膜磨镶术、LASIK或光屈光角膜切除术、PRK)造成神经损伤后,需要3-15年才能恢复角膜神经的完整性(9-11)。结果,角膜敏感性降低并可能发展为干眼症,导致神经性疼痛、角膜溃疡,并且在严重的情况下,需要进行角膜移植(12-14)。此外,干眼症与冷受体功能有关,主要是瞬时受体电位melastatin 8 (TRPM8)通道(15),其可控制角膜表面冷却速率并维持正常的泪液分泌(16-18)。事实上,即使在实验性角膜手术后很长时间,也会发生TRPM8末端的减少,这表明这些变化会导致手术后神经性疼痛(19)。

[0258] 神经营养因子色素上皮衍生因子(PEDF)和 $\omega$ -3脂肪酸家族成员二十二碳六烯酸(DHA)的局部治疗可增强实验性手术后兔和小鼠角膜中以及糖尿病和单纯疱疹病毒(HSV1)感染等疾病中的神经再生并刺激神经再生(20-24)。此外,PEDF激活PEDF受体(PEDF-R)的 $Ca^{2+}$ 非依赖性磷脂酶A2(iPLA2 $\zeta$ )活性,并从可转化为生物活性类二十二烷的膜磷脂中释放DHA(25),这种类二十二烷包括诱导屈光手术兔模型中的角膜神经再生的神经保护素D1(NPD1)(20)。在这里,我们报告了一种新的脂质介质的发现,它是PEDF+DHA在眼表施加的信号传导机制的一部分。此外,我们发现TG基因感知角膜损伤并对具有特定转录组特征的角膜RvD6si治疗作出反应。我们证明RvD6si的局部应用具有角膜保护作用,揭示了干眼和神经性疼痛的新机制和治疗途径。

[0259] 从小鼠眼泪中鉴定新的消退素D6si

[0260] 我们的实验室已经揭示了PEDF+DHA的生物活性(20-24)。已经发现PEDF+DHA对角膜神经再生的作用机制与iPLA2 $\zeta$ 的激活和神经营养因子脑源性生长因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)的表达增加以及在眼泪中释放的轴突生长指导semaphorin 7a(Sema7A)有关(25)。为了确定通过PEDF活化释放DHA后产生哪些类二十二烷,小鼠角膜受到损伤和治疗,收集眼泪,提取脂质并通过LC-MS/MS分析(图1)。359m/z的总离子色谱图(TIC)代表处理4小时后泪液中的所有二羟基DHA异构体,明确了三个峰,保留时间(RT)分别为8.20、8.74和9.20分钟(图1)。内标LTB4-d4(绿色)在8.25分钟洗脱。我们专注于在8.20分钟洗脱的峰(峰1),与碳数4和17(图1)处带有两个羟基的RvD6标准品(图1)相比,该峰在完全碎裂时显示出母离子359m/z,显示至少6个匹配的产物离子(子离子)。当峰1与相同浓度的RvD6共注射时,峰1在6个主要多反应监测(MRM)通道359- $\rightarrow$ 297、279、239、199、159和101处比RvD6早0.27分钟洗脱(图1)。峰1和RvD6的紫外光谱在238nm处显示最大吸光度( $\lambda_{max}$ ),表明两种化合物均

具有共轭二烯结构(图1)。综合起来,我们的数据表明峰1是RvD6立体特异性异构体(RvD6si),其与RvD6共享完整的碎片模式,以及至少6个匹配的子离子、DHA主链的C4和C17处的2个羟基和紫外光谱,但具有不同的RT。

#### [0261] RvD6si源自DHA

[0262] 为了验证新的RvD6si是否源自添加的DHA,采用了离体角膜器官培养模型(16个角膜/样品)。在存在DHA或氘标记的DHA(DHA-d5)以及PEDF的情况下,将受伤的角膜培养4小时,并从培养基中提取和分析脂质。由于5个氘(D)原子连接到DHA主链的末端(在第21和第22个C),RvD6si-d5的总质量转移到365Da([MH]<sup>+</sup>m/z在MS结果中为364),而它的一些产物离子在碎裂后没有改变(图2)。MRM检测方法旨在捕获DHA-d5总结构。在培养基中检测到RvD6si-d5,具有与PEDF+DHA产生的RvD6si相似的RT(图2)。RvD6si-d5的完全碎片化也证实了该结构(图2)。此外,RvD6si的起源在三种不同浓度的添加的DHA下得到验证(图2),其合成随DHA浓度增加而增强。在分析可能的花生四烯酸(AA)-和DHA-羟基衍生物(HDHA)时,结果显示DHA产物(例如14-和17-HDHA)成比例增加,而AA及其羟基衍生物12-和15-HETE的量没有改变。这些数据表明新的RvD6si来源于外源性DHA。

#### [0263] 体内RvD6si的分离和表征

[0264] 尽管新的RvD6si的2D结构与RvD6相匹配,但不同的RT可以使它们的生物活性不同。为了获得足够的RvD6si进行测试,使60只小鼠受伤并每30分钟用PEDF+DHA治疗4小时,收集眼泪。第二天,对小鼠实施安乐死,分离角膜并在含有PEDF+DHA的培养基中培养4小时。将从泪液和角膜培养基中提取的脂质混合并在使用C18柱的UPLC中运行,从6到12分钟每30秒收集一次级分。所有级分都经过脂质组学分析,以检测新RvD6si的可用性。合并具有明显可检测量的RvD6si的级分6至8(图3)。我们的靶向脂质介质的纯度是在体内测试之前通过脂质组学分析确定的。分离的RvD6si对其他DHA衍生物(图3)以及AA、二十碳五烯酸(EPA)及其衍生物(图7)的污染非常低。

#### [0265] RvD6si增强角膜伤口愈合和损伤后角膜敏感性的恢复

[0266] 研究表明,PEDF+DHA促进兔(20,21)以及正常和糖尿病小鼠(24,25)在实验性手术后的角膜伤口愈合。我们验证了RvD6s(RvD6或RvD6si)在刺激角膜伤口愈合方面的能力。使小鼠右眼受伤,将动物分为四组:载体、PEDF+DHA、RvD6和RvD6si(图4)。受伤后二十小时,所有药物治疗的小鼠角膜伤口愈合速度都快于载体;然而,在用RvD6si治疗的动物中发现了最大的增加(图4)。

[0267] 在角膜损伤和治疗后第3、6、9和12天评估角膜敏感性(图4)。使用Belmonte非接触式感觉仪引入了一种测量小鼠角膜感觉的新方法。图4显示了在100.45至110.05毫升空气/分钟( $\alpha=0.05$ )的流速下基础角膜感觉记录值( $n=40$ 个角膜)的高斯分布曲线。重要的是注意,该正常角膜敏感度范围对于评估角膜感觉至关重要,因为Belmonte非接触式感觉仪的工作流速为20至200毫升/分钟。小鼠正常角膜敏感度范围100.45至110.05ml被视为损伤和治疗后成功恢复,并将其用于归一化测量。在受伤后第3天和第6天,用RvD6si治疗的动物的角膜感觉恢复更快(图4)。到第9天,与载体相比,三种治疗增加了敏感性,并且在第12天,任何研究组都没有显著差异。

#### [0268] RvD6si增强角膜神经再生。

[0269] PEDF+DHA在损伤动物模型中刺激角膜神经再生(20-25)。重要的是确认RvD6si作

为PEDF+DHA作用下的脂质介质的生物学活性。为了验证这一点,对小鼠进行了损伤和治疗(如图4所述)。分离的角膜用泛神经元标记PGP 9.5和SP神经肽抗体染色。分别对PGP 9.5和SP呈阳性的未受伤角膜神经的密度用于使值归一化(图5)。P物质是哺乳动物角膜中的主要神经肽(26-28)。此外,我们小组之前的一项研究表明,角膜敏感性和SP阳性神经之间存在相关性(29)。

[0270] 在损伤和治疗后的第12天,载体治疗组的总角膜神经密度为正常角膜的 $45.9 \pm 6.8\%$ ,而RvD6si治疗的角膜显著更高, $62.6 \pm 4.2\%$  ( $p < 0.05$ ) (图5)。PEDF+DHA和RvD6治疗也将神经密度分别增加到 $59.9 \pm 6.3\%$ 和 $59.7 \pm 11.2\%$ 。RvD6si、RvD6和PEDF+DHA之间没有显著差异。类似地,与载体治疗组相比,RvD6si、RvD6和PEDF+DHA治疗在损伤后12天的SP阳性神经密度更高(图5)。该结果证实了在经治疗的角膜中角膜敏感性的更快恢复(图4)并加强了RvD6si作为PEDF+DHA增强角膜神经再生机制中的主要介质的生物学功能。

#### [0271] RvD6si在三叉神经节中的转录组选择性调节

[0272] 因为角膜感觉神经起源于TG神经元,我们想验证是否可以在TG中感知角膜损伤,而反过来会引发基因表达反应。因此,在损伤后12天收获TG,并用RvD6si或RvD6处理或用作对照的载体处理(图4),然后进行RNA-seq分析。质量控制显示映射读数范围为84.63至93.00%,每个样品表达约20,000个基因。主成分分析(PCA)显示,载体处理与RvD6si-或RvD6-处理组的良好分离(图6)。与对照相比,两个RvD6共有58个上调基因和36个下调基因(图6)。为了对RvD6si\_vs\_载体和RvD6\_vs\_载体的上调基因进行分类,使用基因富集分析来证明RvD6si显示出细胞分隔位置的差异(图8)并激活轴突生长锥基因(基因本体编号0044295)。箱线图描绘了该类别中由RvD6si激活的两个基因:C9orf72和Gpm6a(图6)。我们还检测到与角膜中的神经肽和离子通道受体相关的特定基因,这些基因通过添加PEDF+DHA来刺激(19,21,24)(图6D)。RNA-seq确定RvD6或RvD6si降低了两种主要神经肽的基因表达,即编码物质P(SP)的速激肽前体1(Tac1)和降钙素相关多肽 $\beta$ (Calcb)。重要的是注意,这些神经肽,尤其是Calcb,是偏头痛和其他原发性头痛中主要的疼痛诱导介质(30)。相比之下,RvD6si选择性增强瞬时受体电位melastatin 8(Trpm8)通道和神经纤毛蛋白1(Nrp1)的表达,后者是包括III/IV类信号素、血管内皮生长因子的某些同种型和转化生长因子 $\beta$ 的几种因素的共受体(31)。

[0273] 进一步的分析揭示了作为雷帕霉素不敏感哺乳动物靶复合物-2(mTORC2)的一部分(图6)的转录因子Rictor的RvD6si的强烈诱导(图6)。RvD6si修饰RICTOR调节的基因有39个。其中,37个(95%)基因与从已发表数据收集的IPA知识相匹配,而只有两个基因Egr1和Psme3不符合预测(黄色箭头)(图6)。重要的是注意,与载体处理组相比,所有接受IPA分析的基因都存在显著差异(DESeq2分析中FDR $< 0.05$ )。因此,95%的下游基因与IPA知识相匹配;Rictor信号传导在TG中明显受到RvD6si的刺激(图6)。

#### [0274] 讨论

[0275] 我们实验室的研究表明,PEDF+DHA在兔和小鼠手术后模型中用于角膜伤口愈合和神经再生(20-25)。这包括观察到PEDF-R的iPLA2 $\zeta$ 活性的激活会从磷脂中释放DHA,这表明可以在角膜中可能合成了类二十二烷(25)。在这里,我们报告了泪液中在其受体上激活PEDF后衍生自DHA的一种新的消退素D6si生物活性的发现、鉴定和表征。RvD6si的完整MS/MS碎裂将六个特征离子与RvD6以及UV二极管阵列轮廓相匹配(图1)。生物活性表明,它在角

膜PRK模拟手术后比PEDF+DHA更有效地促进角膜伤口愈合和敏感性恢复(图4)。这些结果表明,RvD6si是促成PEDF+DHA作用的信号传导机制的主要脂质介质。此外,RvD6s和PEDF+DHA治疗在损伤和治疗后12天表现出相似的角膜神经支配增强(图6)。

[0276] 消退素D6使用人类多形核中性粒细胞(32)进行了描述,并在皮肤(33)、脑(34)、脑脊液(35)和血浆(36)中检测到。然而,这是第一份证明RvD6和一种新型立体异构体的生物学功能的报告。当单羟基、二羟基和三羟基DHA衍生物被检测为视网膜中DHA氧化代谢物的酶介导产物时,建议从DHA形成有效的生物活性介质(37)。与视网膜不同(其中感光膜在磷脂的sn-2位置具有高DHA含量)(38),而角膜在该位置含有更多的AA(25,39)。出于这个原因,需要添加外源DHA来合成类二十二烷而不是类二十烷酸。此外,仅用DHA或PEDF处理角膜时未检测到RvD6si,这表明仅在用PEDF+DHA处理角膜时才检测到新的RvD6si。这一观察结果与先前的研究一致,该研究表明在人类泪液样品中未检测到RvD6及其立体异构体(40)。由于RvD6si主要存在于器官培养的角膜的泪液或培养基中,这表明RvD6si需要分泌到细胞外区室中才能发挥作用。可以通过受体引发生物活性,进而调节细胞信号传导和转录因子,从而上调角膜中的神经营养基因(25)。RvD6si可以以自分泌方式起作用和/或可以通过泪液扩散并在其他眼表细胞上充当旁分泌信号。

[0277] 大多数角膜神经起源于位于TG中的神经元(6)。因此,使用无偏RNA测序,我们在这里破译了RVD6和RvD6si在TG中共享少量上调基因,暗示它们的生物学活性的信号传导机制存在差异。RNA-seq数据显示,RvD6si强烈激活了两个基因C9orf72和Gpm6A,它们刺激神经发生和生长锥形成(41,42)。我们还发现了与疼痛相关的基因,因为角膜神经性疼痛可在神经损伤后发生(43)。在用RvD6si治疗的角膜中,与疼痛有关的两个基因的表达降低:编码SP的Tac1,它是角膜神经中表达的最丰富的神经肽之一(26-28)。SP发挥促炎作用,临床前研究将其作用与慢性疼痛联系起来(44)。另一个是Calcb,它编码降钙素基因相关肽(CGRP),它在角膜神经中也很丰富(21),并且在神经源性炎症和疼痛中起重要作用(30)。该类别中的另一个重要基因是Trmp8。TRPM8通道调节眼表的润湿并对慢性疼痛具有镇痛作用(17,46-49)。先前对神经受损小鼠的研究表明,TRPM8阳性神经纤维在损伤后3个月仅达到其正常密度的50%,这表明TRPM8神经末梢的减少可导致干眼样疼痛(19)。损伤后Trpm8的表达增加并用RvD6si治疗表明新的脂质可以保护角膜免受疼痛。此外,Nrp1的选择性增加也很有趣,因为它是SEMA3A的共同受体,已被证明可以减轻坐骨神经损伤大鼠模型中的机械异常性疼痛(50)。

[0278] 我们的结果披露,RvD6si有效且选择性地诱导TG中的Rictor基因表达。作为PI3K/Akt通路的调节剂,RICTOR是mTORC2的关键成分,明显参与细胞增殖和修复。与此一致,Rictor或mTORC2的缺失抑制了小鼠背根神经节损伤后的感觉轴突再生(51)。

[0279] 总之,我们的数据表明,PEDF+DHA治疗后受损角膜产生的新RvD6si对于角膜伤口愈合和神经再生是必要的。这种脂质介质激活从角膜到TG神经元的信号传导,并作为响应,调节特定基因特征,这增强轴突生长、减少神经性疼痛并促进对干眼症的控制。我们的研究结果提供了使用RvD6si治疗受损角膜神经疾病的组合物和方法,疾病包括干眼症、角膜神经营养性溃疡、神经营养性角膜炎和神经性疼痛。

[0280] 动物

[0281] 十周大的雄性CD1小鼠购自Charles River(美国马萨诸塞州威尔明顿),并在洛杉

矾新奥尔良的路易斯安那州立大学健康神经科学卓越中心的动物护理设施中以30lux保持12小时的暗/光循环。这些动物的处理符合视觉和眼科研究协会关于在眼科和视觉研究中使用动物的指南,实验方案得到奥尔良路易斯安那州立大学健康机构动物护理和使用委员会的批准。

#### [0282] 角膜损伤和治疗

[0283] 用氯胺酮(200mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)的混合物腹膜内注射麻醉小鼠,并将一滴盐酸丙美卡因溶液(0.5%)应用于受伤的右眼。如前所述(19,29),用2mm环钻划定角膜中心,并在手术显微镜下使用角膜锈环去除器(Algerbrush II;Alger Equipment Co.,Lago Vista,TX,USA)轻轻去除上皮和前部基质。将一滴0.3%妥布霉素滴眼液(Henry Schein,Melville,NY,USA)应用于眼睛以防止术后感染。同一位研究者(J.H.)进行了所有手术。之后,如每个实验设计中所解释,局部应用10 $\mu$ l PEDF(50ng/ml)加DHA(50nM)或DHA衍生的脂质介质。

#### [0284] 脂质组学分析

[0285] 将五微升无菌PBS滴入小鼠眼睛的下死角,30秒后,将眼泪收集在1毫升含1克/升丁基化羟基甲苯的冰冷MeOH中,然后加入2毫升CHCl<sub>3</sub>和5 $\mu$ l氘标记脂质AA-d8(5ng/ $\mu$ l)、PGD2-d4(1ng/ $\mu$ l)、EPA-d5(1ng/ $\mu$ l)、15-HETE-d8(1ng/ $\mu$ l)和LTB4-d4(1ng/ $\mu$ l)的内标混合物。将样品在水浴中超声处理30分钟,然后在-80 $^{\circ}$ C下储存过夜。第二天,将样品离心,收集上清液,用1ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH(2:1)洗涤沉淀并离心,然后合并上清液。将pH 3.5的水以1:5的比例加入上清液中,涡旋并离心,用1N HCl将上部相的pH调节至3.5-4.0。收集下部相,在N<sub>2</sub>下干燥,然后重悬于1ml MeOH中并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0286] 对于角膜器官培养实验,收集2ml培养基并在4 $^{\circ}$ C下以14,000rpm离心15分钟以去除细胞碎片。通过Blight和Dyer方法提取脂质(52)。简而言之,将3.75ml CHCl<sub>3</sub>:MeOH(1:2)的混合物添加到1ml样品和5 $\mu$ l氘标记的脂质内标混合物中。将样品涡旋并在-80 $^{\circ}$ C下储存过夜。接下来,为了制备两相,加入2.5ml CHCl<sub>3</sub>并涡旋,然后加入2.5ml水(pH 3.5),涡旋,并用1N HCl将上部相的pH调节至3.5-4.0。下部相在N<sub>2</sub>下干燥,重悬于1ml MeOH中,并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0287] 在配备有带有流通针的Acquity I级超性能液相色谱(UPLC)的Xevo TQ中进行LC-MS/MS分析(马萨诸塞州米尔福德的Waters公司(Waters Corporation,Milford,MA))。如所述(25,53),样品在N<sub>2</sub>下干燥,重新悬浮在20 $\mu$ l MeOH/H<sub>2</sub>O(2:1)中,并注入CORTECS C182.7 $\mu$ m 4.6 $\times$ 100mm色谱柱(Water,MA)中。将色谱柱设定在45 $^{\circ}$ C,流速为0.6ml/min。初始流动相组成为45%溶剂A(H<sub>2</sub>O+0.01%乙酸)和55%溶剂B(MeOH+0.01%乙酸),然后在前10分钟梯度至15%溶剂A,然后梯度至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(密歇根州安娜堡的Cayman公司(Cayman,Ann Arbor,MI))用于调整和优化,以及为每种化合物创建校准曲线。提供RvD6[4S,17S-二羟基-5E,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-二十二碳六烯酸]标准品

#### [0288] 从小鼠眼泪和角膜生产消退素D6si

[0289] 使小鼠角膜(n=60)受伤并用PEDF+DHA局部治疗4小时。将眼泪收集在MeOH中并储存在-80 $^{\circ}$ C。24小时后,对小鼠实施安乐死,切除受伤的角膜,用PEDF+DHA在DMEM/F12培养基中培养4小时。收集培养基,并如上所述提取脂质。使用C18柱(Water,MA)对来自混合泪液和

角膜培养基的脂质进行UPLC分离。收集注射后6-12分钟之间的十二个级分(30秒/级分)。该过程至少重复8次,每次运行25 $\mu$ l样品,直到所有样品都被分级分离。每个级分在N2下干燥并重新悬浮在1mL的MeOH中。使用所述的LC-MS/MS系统确认10 $\mu$ l每个级分中RvD6si的存在。将具有高纯度和高浓度RvD6si的级分汇集并储存在-80 $^{\circ}$ C,直至体内实验需要。

#### [0290] 角膜伤口愈合

[0291] 小鼠在损伤和治疗后20小时实施安乐死,角膜用0.5%亚甲蓝染色20秒,然后用PBS清洗2分钟。照片是通过附接的数码相机(DXM 1200;Nikon)用解剖显微镜(日本东京SMZ1500;Nikon)拍摄的。使用Photoshop CC 2014软件(Adobe, San Jose, CA, USA)对受伤区域对应的图像进行量化。

#### [0292] 角膜敏感度测量

[0293] 非接触式角膜感觉器被描述为比标准Cochet-Bonnet感觉器更可靠的方法来确定角膜感觉阈值(54)。因此,对于角膜感觉测量,使用了Belmonte非接触式角膜感觉仪(55),进行了一些修改。简而言之,一名研究人员握住小鼠并将空气输出针保持在距角膜3mm的距离处。另一位研究人员控制空气流速。测量以每分钟80毫升的空气流速开始,然后逐渐增加十个单位,直到小鼠开始眨眼。当小鼠眨眼时,空气流速被记录为最终的角膜敏感性指数。

#### [0294] 角膜神经分析

[0295] 受伤和治疗后十二天,对小鼠实施安乐死,摘除眼睛并用Zamboni固定剂(American Master Tech Scientific, Lodi, CA, USA)在室温下固定45分钟。然后切除角膜并再固定15分钟,然后用PBS洗涤3次。为了阻断非特异性结合,将角膜与10%正常山羊血清加0.5% Triton X-100的PBS溶液在室温下温育1小时。之后,角膜与一抗、兔单克隆抗PGP9.5(1:500)(ab108986; Abcam, Cambridge, MA, USA)和大鼠单克隆抗物质P(SP; 1:100)(sc-21715; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)在室温下伴随持续摇动一起温育24小时。用PBS洗涤后,将角膜与相应的二抗山羊抗兔Alexa-Fluor 488(1:1000)和山羊抗大鼠Alexa-Fluor 488(1:1000)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)在4 $^{\circ}$ C下一起温育24小时。在每个角膜上进行四次径向切割,将其平装在载玻片上,内皮面朝上,并用荧光显微镜(Deconvolution microscope DP80; Olympus, Tokyo, Japan)检查。这些图像被合并在一起以构建角膜神经网络的整个视图。如前所述(26, 29),使用Photoshop CC 2014(Adobe)测量角膜神经密度。

#### [0296] 三叉神经节RNA测序

[0297] 收获对应于损伤眼侧(n=5)的TG,并保存在RNAlater溶液(Thermo Fisher Scientific)中,直到使用Dounce匀浆器在冰上匀浆。如制造商所述,使用RNeasy微小试剂盒(Qiagen, Germantown, MD, USA)提取总mRNA。用NanoDrop ND-1000分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测定RNA的纯度和浓度,并将样品储存在-80 $^{\circ}$ C直至使用。使用改编的Smart-seq2协议进行RNA测序(56)。简而言之,用Oligo-dT30VN和模板转换寡核苷酸(TSO)引物逆转录一ng总RNA。使用ISPCR引物扩增总cDNA,并使用Nextera XT DNA文库制备试剂盒(Illumina, San Diego, CA, USA)制备文库。使用相同的摩尔浓度合并文库,并使用NextSeq 500/550 High Output Kit v2(75个循环, Illumina)进行测序。解复用后,使用Rv3.6.1的RSubread包v1.34.6(57)将RNA-seq数据与GENCODE GRCm38小鼠初级基因组组装(Release M22, gencodegenes.org/mouse/)对齐。使用featureCounts函数(Ubuntu LTS

16.4操作系统中的Subread v1.6.5)对输出的用于测序数据比对的BAM文件进行计数(58)。接下来,使用R的DESeq2包对原始计数数据进行差异基因表达分析(59)。调整后的p值被视为错误发现率(FDR)。使用Enrichr(60)对RvD6si\_vs\_载体和RvD6\_vs\_载体之间显著变化的基因(FDR<0.05)进行富集分析,并使用IPA(QIAGEN Inc.,<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>)进行途径分析。

[0298] 统计分析

[0299] 数据表示为 $\geq 3$ 次独立实验的平均值 $\pm$ SD。通过1-way ANOVA分析数据,然后在95%置信水平下进行Tukey诚实显著差异事后检验,以比较不同组,当 $p < 0.05$ 时认为是显著的。所有统计分析均使用Stata 14(StataCorp,College Station,TX,USA)进行。使用Prism 7软件(GraphPad Software,La Jolla,CA,USA)和Bio Vinci(BioTuring,La Jolla,CA,USA)作图。对于测序数据,由于DE-Seq2分析不提供多样品比较,因此将来自DE-Seq2的归一化计数用作ANOVA测试的输入。

[0300] 登录号

[0301] 支持本研究结果的完整RNA-Seq数据已保存在Gene Expression Omnibus中,登录代码为GSE138685。

[0302] 此实施例1中引用的参考文献

[0303] 1.Shaheen BS,Bakir M,Jain S.Corneal nerves in health and disease.Surv Ophthalmol2014;59(3):263-285.

[0304] 2.He J,Bazan HEP.Mapping the nerve architecture of diabetic human corneas.Ophthalmology2012;119(5):956-964.

[0305] 3.Hamrah P et al.Corneal sensation and subbasal nerve alterations in patients with herpes simplex keratitis:an in vivo confocal microscopy study.Ophthalmology 2010;117(10):1930-1936.

[0306] 4.Cruzat A et al.Inflammation and the nervous system:the connection in the cornea in patients with infectious keratitis.Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.2011;52(8):5136-5143.

[0307] 5.He J,Bazan HEP.Corneal nerve architecture in a donor with unilateral epithelial basement membrane dystrophy.Ophthalmic Res 2013;49(4):185-191.

[0308] 6.Müller LJ,Marfurt CF,Kruse F,Tervo TMT.Corneal nerves:structure, contents and function.Exp.Eye Res.2003;76(5):521-542.

[0309] 7.He J,Bazan NG,Bazan HEP.Mapping the entire human corneal nerve architecture.Exp.Eye Res.2010;91(4):513-523.

[0310] 8.Patel DV,McGhee CNJ.Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy.Invest.Ophthalmol .Vis.Sci.2005;46(12):4485-4488.

[0311] 9.Erie JC,McLaren JW,Hodge DO,Bourne WM.Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK.Am.J.Ophthalmol.2005;140(6):1059-1064.

- [0312] 10. Chao C, Golebiowski B, Stapleton F. The role of corneal innervation in LASIK-induced neuropathic dry eye. *Ocul Surf* 2014;12(1):32-45.
- [0313] 11. Kymionis GD et al. Fifteen-year follow-up after anterior chamber phakic intraocular lens implantation in one and LASIK in the fellow eye. *Semin Ophthalmol* 2009;24(6):231-233.
- [0314] 12. Linna TU et al. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(2):393-397.
- [0315] 13. Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002;43(12):3660-3664.
- [0316] 14. Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(4):577-584.
- [0317] 15. Rosenthal P, Borsook D. Ocular neuropathic pain. *British Journal of Ophthalmology* 2016;100(1):128-134.
- [0318] 16. Hirata H, Meng ID. Cold-Sensitive Corneal Afferents Respond to a Variety of Ocular Stimuli Central to Tear Production: Implications for Dry Eye Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010;51(8):3969-3976.
- [0319] 17. Belmonte C, Gallar J. Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(6):3888-3892.
- [0320] 18. Robbins A, Kurose M, Winterson BJ, Meng ID. Menthol Activation of Corneal Cool Cells Induces TRPM8-Mediated Lacrimation but Not Nociceptive Responses in Rodents. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(11):7034-7042.
- [0321] 19. He J, Pham TL, Kakazu AH, Bazan HEP. Remodeling of Substance P Sensory Nerves and Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Cold Receptors After Corneal Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019;60(7):2449-2460.
- [0322] 20. Cortina MS, He J, Li N, Bazan NG, Bazan HEP. Neuroprotectin D1 Synthesis and Corneal Nerve Regeneration after Experimental Surgery and Treatment with PEDF plus DHA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):804-810.
- [0323] 21. Cortina MS, He J, Li N, Bazan NG, Bazan HEP. Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Arch. Ophthalmol.* 2012;130(1):76-83.
- [0324] 22. He J, Cortina MS, Kakazu A, Bazan HEP. The PEDF Neuroprotective Domain Plus DHA Induces Corneal Nerve Regeneration After Experimental Surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015;56(6):3505-3513.
- [0325] 23. He J et al. PEDF plus DHA modulate inflammation and stimulate nerve

regeneration after HSV-1 infection. *Exp. Eye Res.* 2017;161:153-162.

[0326] 24. He J, Pham TL, Kakazu A, Bazan HEP. Recovery of Corneal Sensitivity and Increase in Nerve Density and Wound Healing in Diabetic Mice After PEDF Plus DHA Treatment. *Diabetes* 2017;66 (9) :2511-2520.

[0327] 25. Pham TL et al. Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J. Biol. Chem.* 2017;292 (45) :18486-18499.

[0328] 26. He J, Bazan HEP. Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016;57 (2) :664-674.

[0329] 27. Tervo K et al. Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1982;23 (5) :671-674.

[0330] 28. He J, Pham TL, Bazan HEP. Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. *Vet Ophthalmol* 2019;22 (3) :345-352.

[0331] 29. Pham TL, Kakazu A, He J, Bazan HEP. Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *FASEB J.* 2018; fj201801957R.

[0332] 30. Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain* 2017;158 (4) :543-559.

[0333] 31. Chaudhary B, Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Neupilin 1: function and therapeutic potential in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63 (2) :81-99.

[0334] 32. Serhan CN et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.*

[0335] 2002;196 (8) :1025-1037.

[0336] 33. Motwani MP et al. Pro-resolving mediators promote resolution in a human skin model of UV-killed *Escherichia coli*-driven acute inflammation. *JCI Insight* 2018;3 (6) .

[0337] doi:10.1172/jci.insight.94463

[0338] 34. Marcheselli VL et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 2003;278 (44) :43807-43817.

[0339] 35. Mai NT et al. A randomised double blind placebo controlled phase 2 trial of adjunctive aspirin for tuberculous meningitis in HIV-uninfected adults. *Elife* 2018;7. doi:10.7554/eLife.33478

[0340] 36. Elajami TK et al. Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling. *FASEB J.* 2016;30 (8) :2792-2801.

[0341] 37. Bazan NG, Birkle DL, Reddy TS. Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) is

metabolized to lipoxygenase reaction products in the retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;125 (2) :741-747.

[0342] 38. Anderson RE, Maude MB. Lipids of ocular tissues: VIII. The effects of essential fatty acid deficiency on the phospholipids of the photoreceptor membranes of rat retina. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1972;151(1) : 270-276.

[0343] 39. Bazan HE, Bazan NG. Composition of phospholipids and free fatty acids and incorporation of labeled arachidonic acid in rabbit cornea. Comparison of epithelium, stroma and endothelium. *Curr. Eye Res.* 1984;3 (11) :1313-1319.

[0344] 40. English JT, Norris PC, Hodges RR, Dartt DA, Serhan CN. Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017;117:17-27.

[0345] 41. Sivadasan R et al. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat. Neurosci.* 2016;19(12) :1610-1618.

[0346] 42. Formoso K, Garcia MD, Frasch AC, Scorticati C. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016;77:95-104.

[0347] 43. Goyal S, Hamrah P. Understanding Neuropathic Corneal Pain--Gaps and Current Therapeutic Approaches. *Semin Ophthalmol* 2016;31(1-2) :59-70.

[0348] 44. Zieglgänsberger W. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res.* 2019;375(1) :227-241.

[0349] 45. Ferrari, G. et al. Ocular Surface Injury Induces Inflammation in the Brain: In Vivo and Ex Vivo Evidence of a Corneal-Trigeminal Axis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 6289-6300 (2014).

[0350] 46. Parra A et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* 2010;16(12) :1396-1399.

[0351] 47. Proudfoot CJ et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* 2006;16(16) :1591-1605.

[0352] 48. Liu B et al. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. *Pain* 2013;154(10) :2169-2177.

[0353] 49. Fernández-Peña C, Viana F. Targeting TRPM8 for Pain Relief. *The Open Pain Journal*

[0354] 2013;6:154-164.

[0355] 50. Hayashi M et al. Intrathecally administered Sema3A protein attenuates neuropathic pain behavior in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neurosci. Res.* 2011;69(1) :17-24.

[0356] 51. Chen W et al. Rapamycin-Resistant mTOR Activity Is Required for

Sensory Axon Regeneration Induced by a Conditioning Lesion[Internet].eNeuro 2017;3(6).doi:10.1523/ENEURO.0358-16.2016

[0357] 52.Bligh EG,Dyer WJ.A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification.Can.J.Biochem.Physiol.1959;37(8):911-917.

[0358] 53.Do,K.V.et al.Elovanoids counteract oligomeric $\beta$ -amyloid-induced gene expression and protect photoreceptors.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 116,24317-24325(2019).

[0359] 54.Murphy PJ,Lawrenson JG,Patel S,Marshall J.Reliability of the non-contact corneal aesthesiometer and its comparison with the Cochet-Bonnet aesthesiometer.Ophthalmic Physiol Opt1998;18(6):532-539.5

[0360] 55.Belmonte C,Acosta MC,Schmelz M,Gallar J.Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO2 esthesiometer.Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.1999;40(2):513-519.

[0361] 56.Picelli S et al.Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2.Nat Protoc2014;9(1):171-181.

[0362] 57.Liao Y,Smyth GK,Shi W.The R package Rsubread is easier,faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads.Nucleic Acids Res.2019;47(8):e47.

[0363] 58.Liao Y,Smyth GK,Shi W.featureCounts:an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features.Bioinformatics 2014;30(7):923-930.

[0364] 59.Love MI,Huber W,Anders S.Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.Genome Biol.2014;15(12):550.

[0365] 60.Kuleshov MV et al.Enrichr:a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016update.Nucleic Acids Res.2016;44(W1):W90-97.

[0366] 实施例2

[0367] -发现新的RvD6异构体:

[0368] -促进角膜伤口愈合、敏感性和神经再生。

[0369] -刺激“有益”信号传导返回三叉神经节神经元。

[0370] -在三叉神经节中诱导基因程序,修复轴突生长并减少神经性疼痛。

[0371] -这种RvD6异构体为神经营养性角膜炎和干眼样疼痛开辟了新的治疗途径。

[0372] \*\*\*\*\*

[0373] 等价物

[0374] 仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或能够确定本文描述的特定物质和程序的许多等效物。这样的等效物被认为是在本发明的范围内并且被所附权利要求所覆盖。

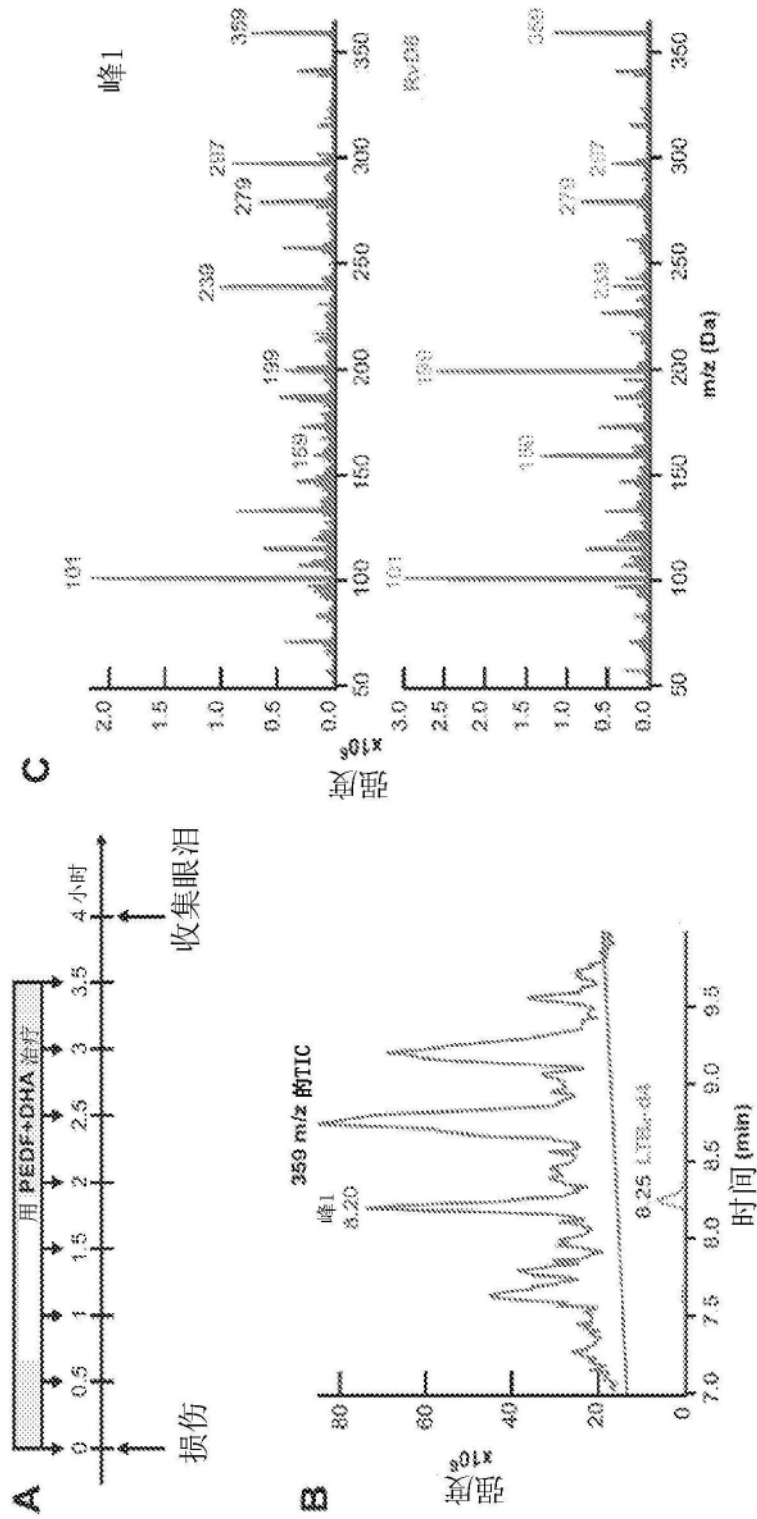


图1

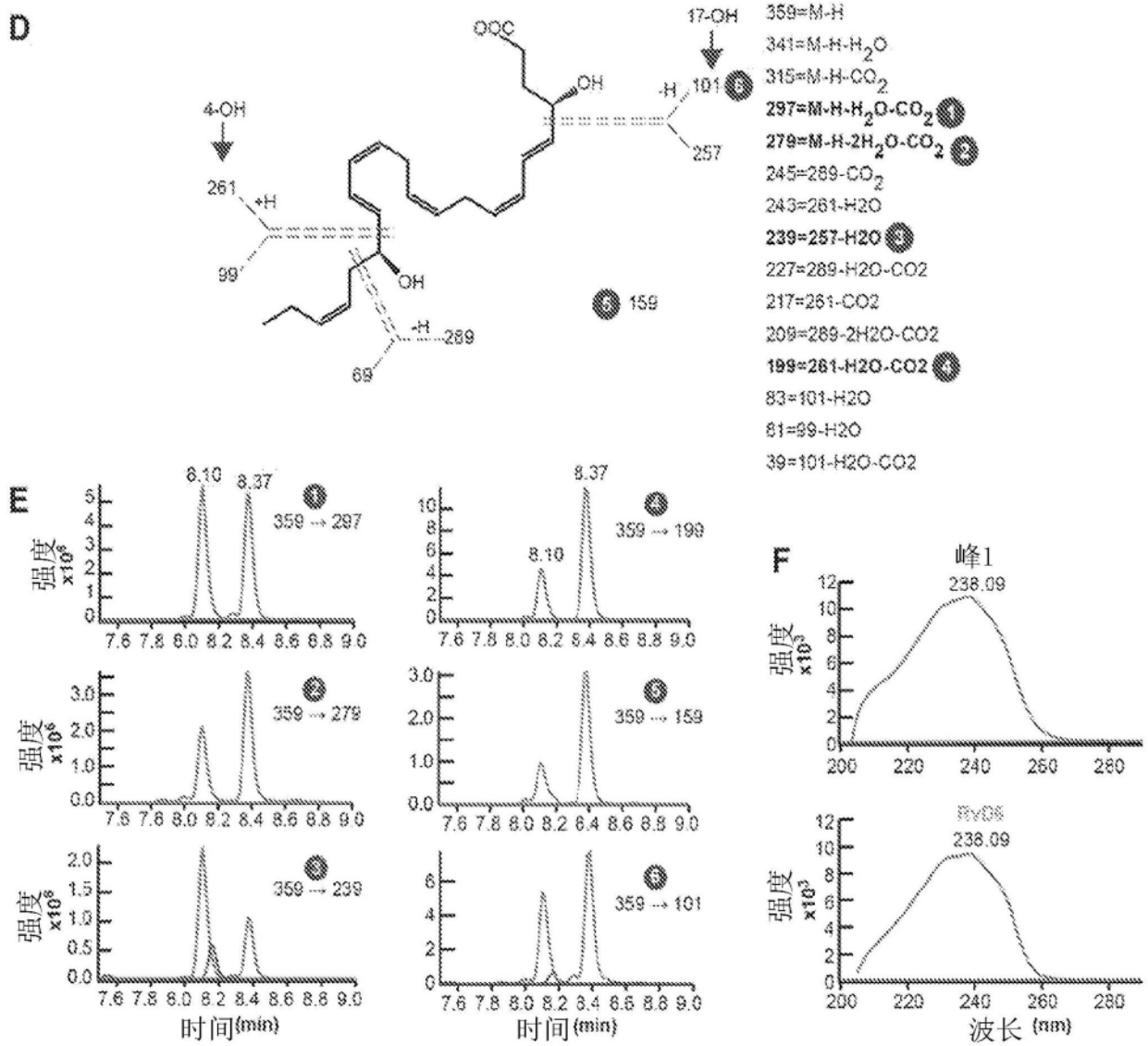


图1续

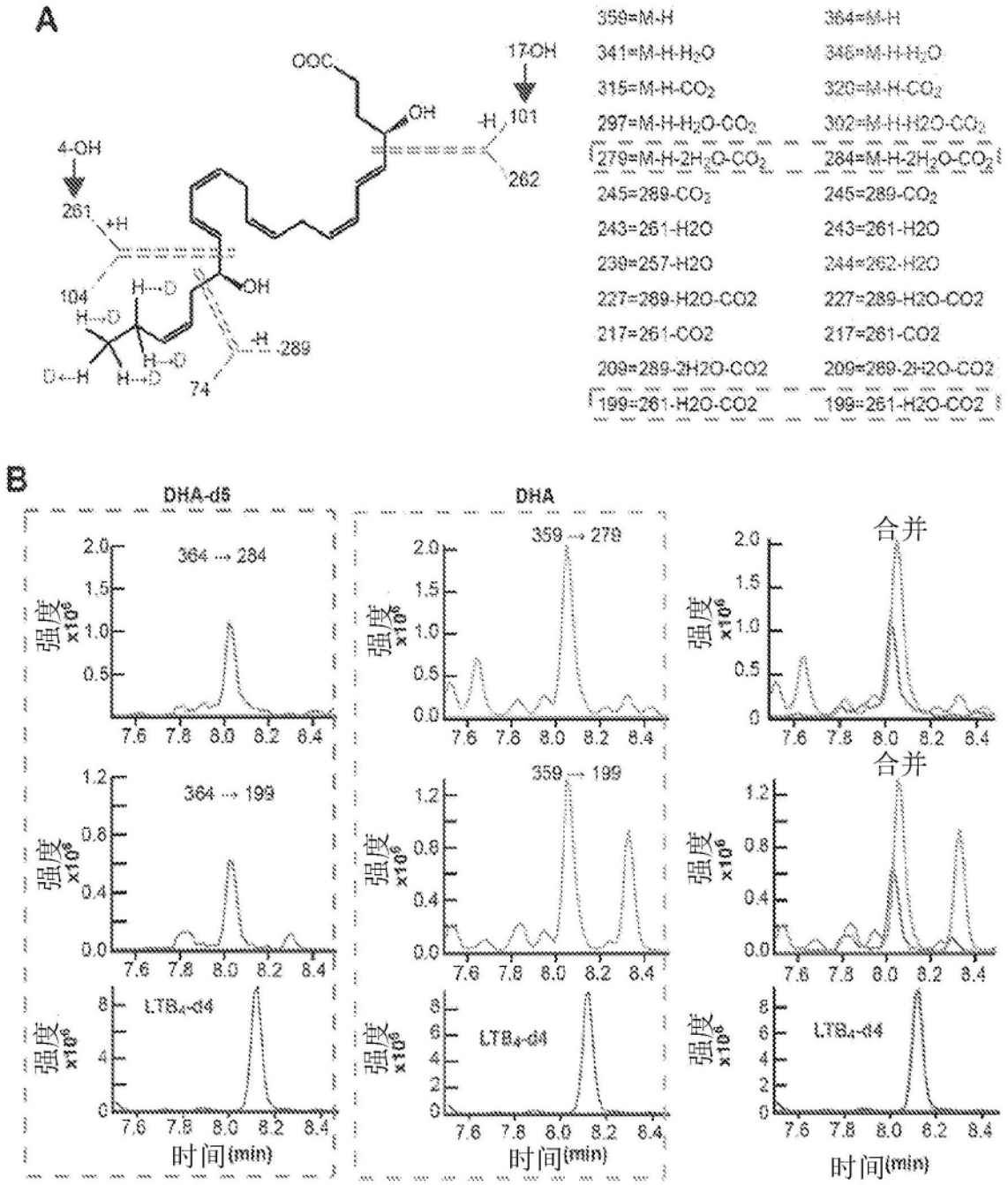


图2

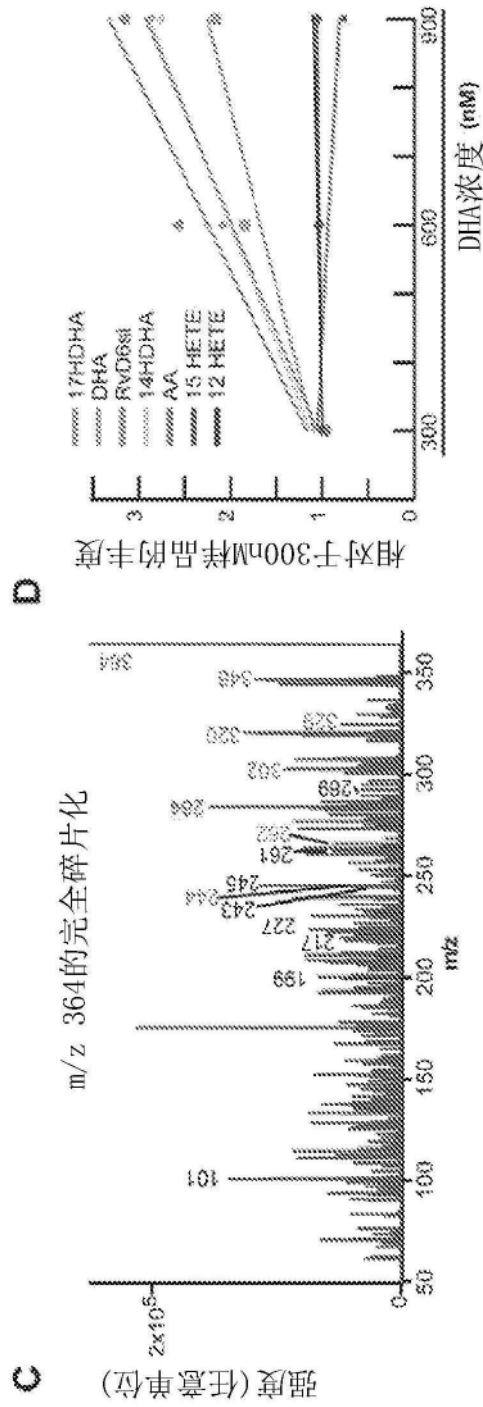


图2续

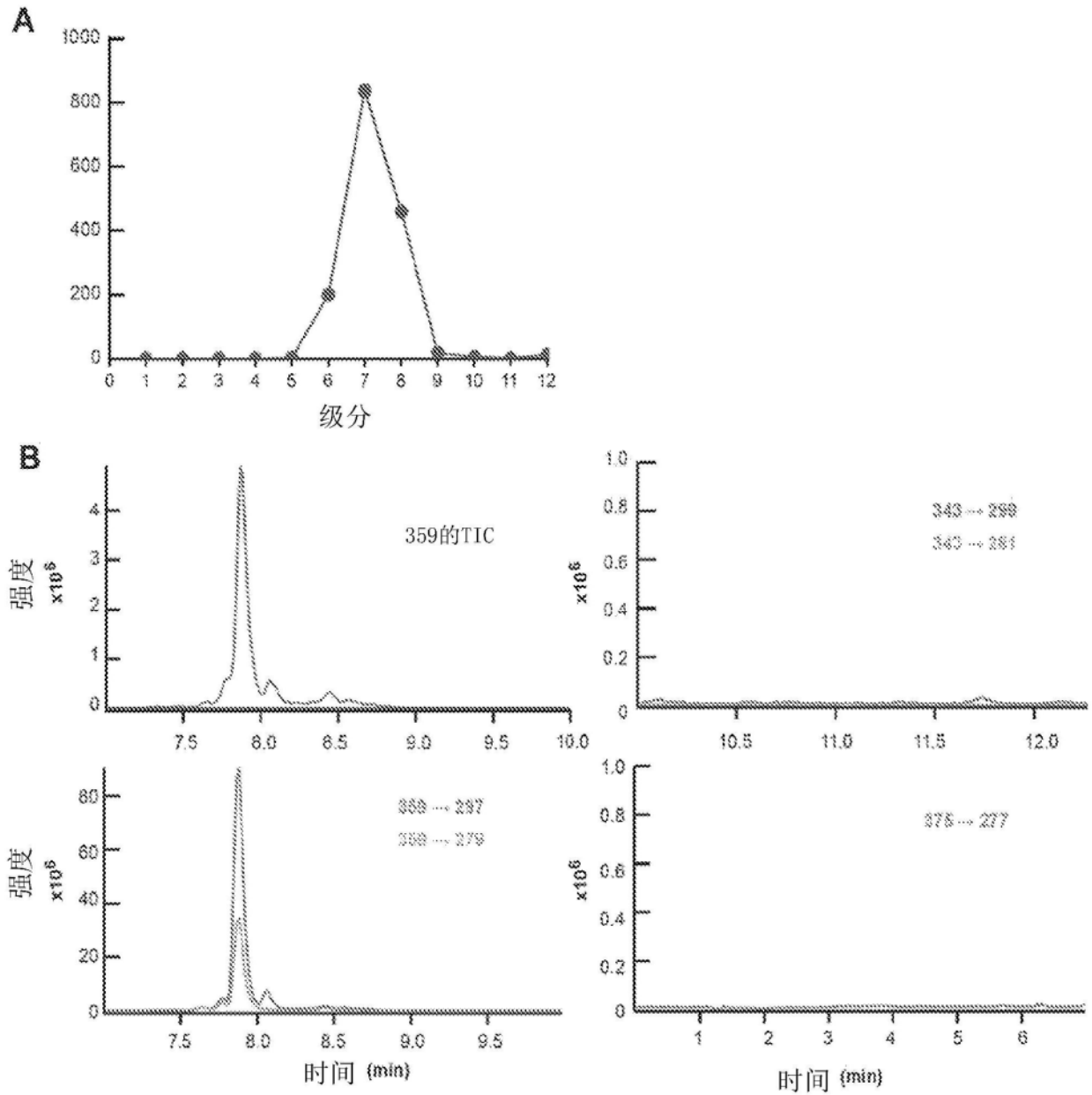


图3

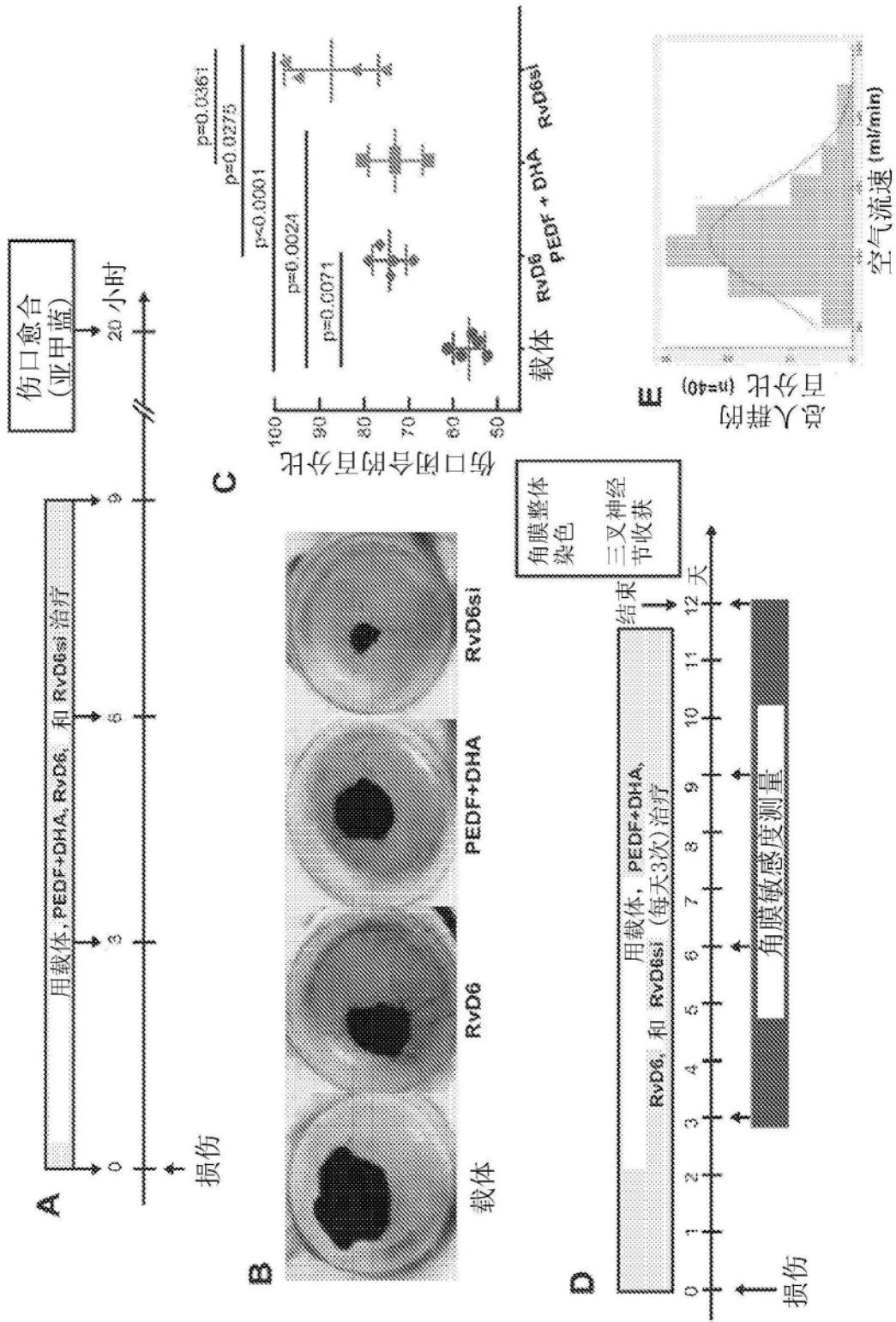


图4

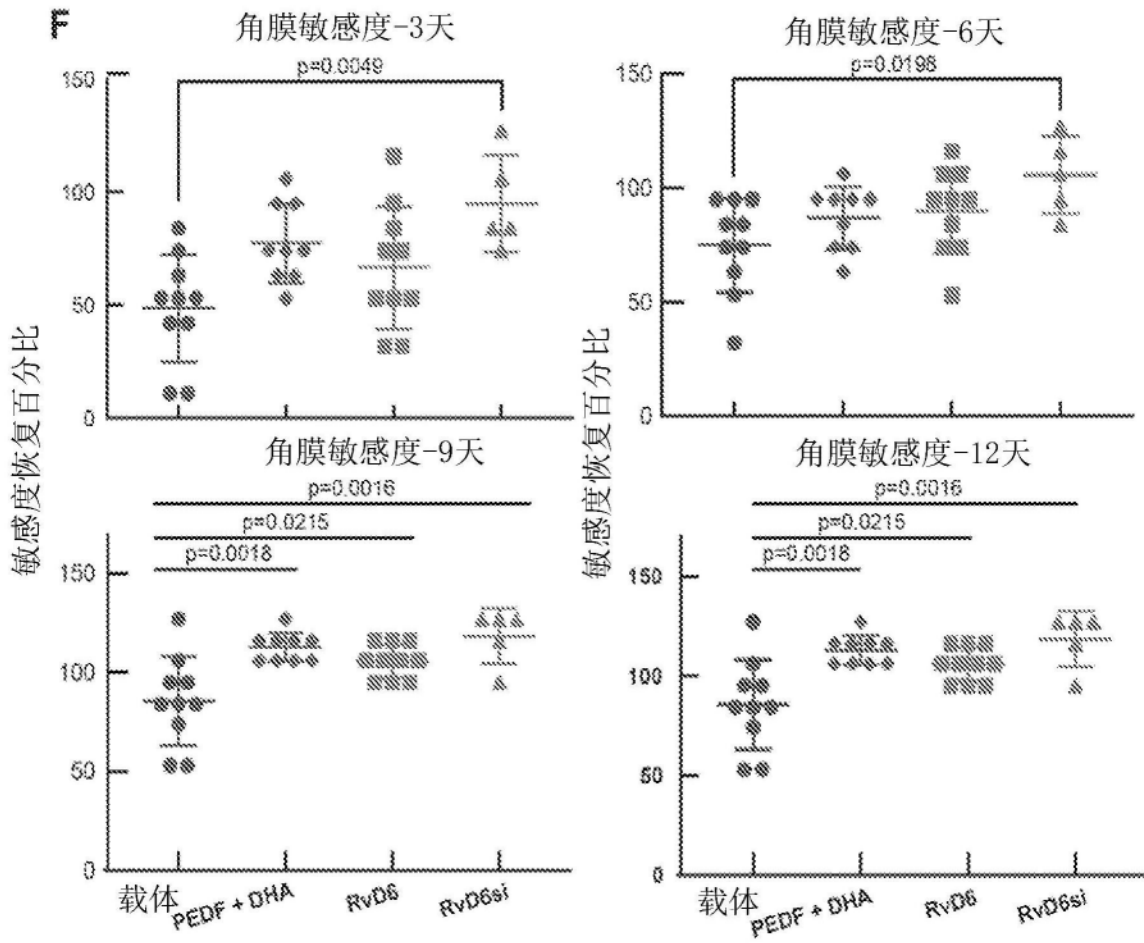


图4续

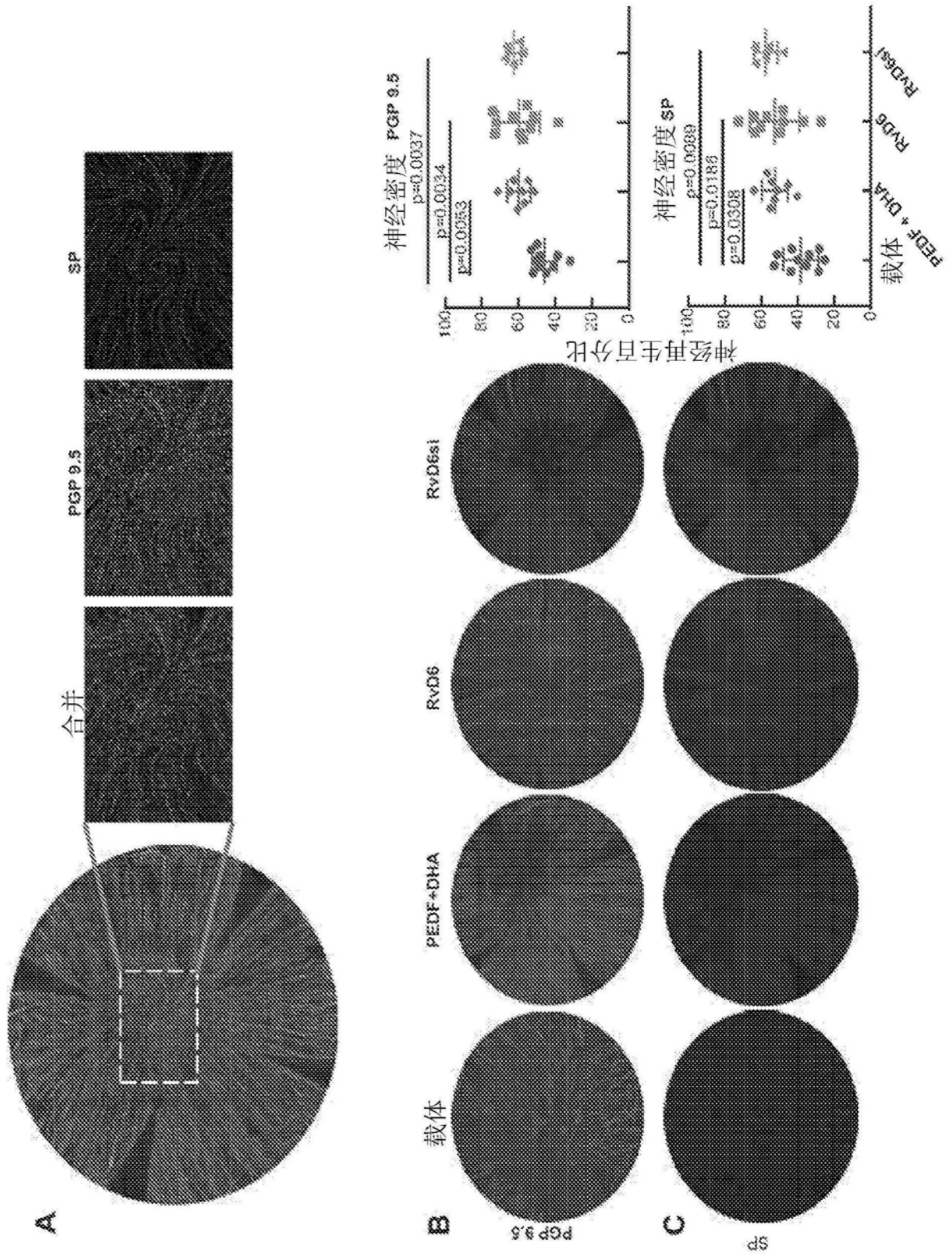


图5

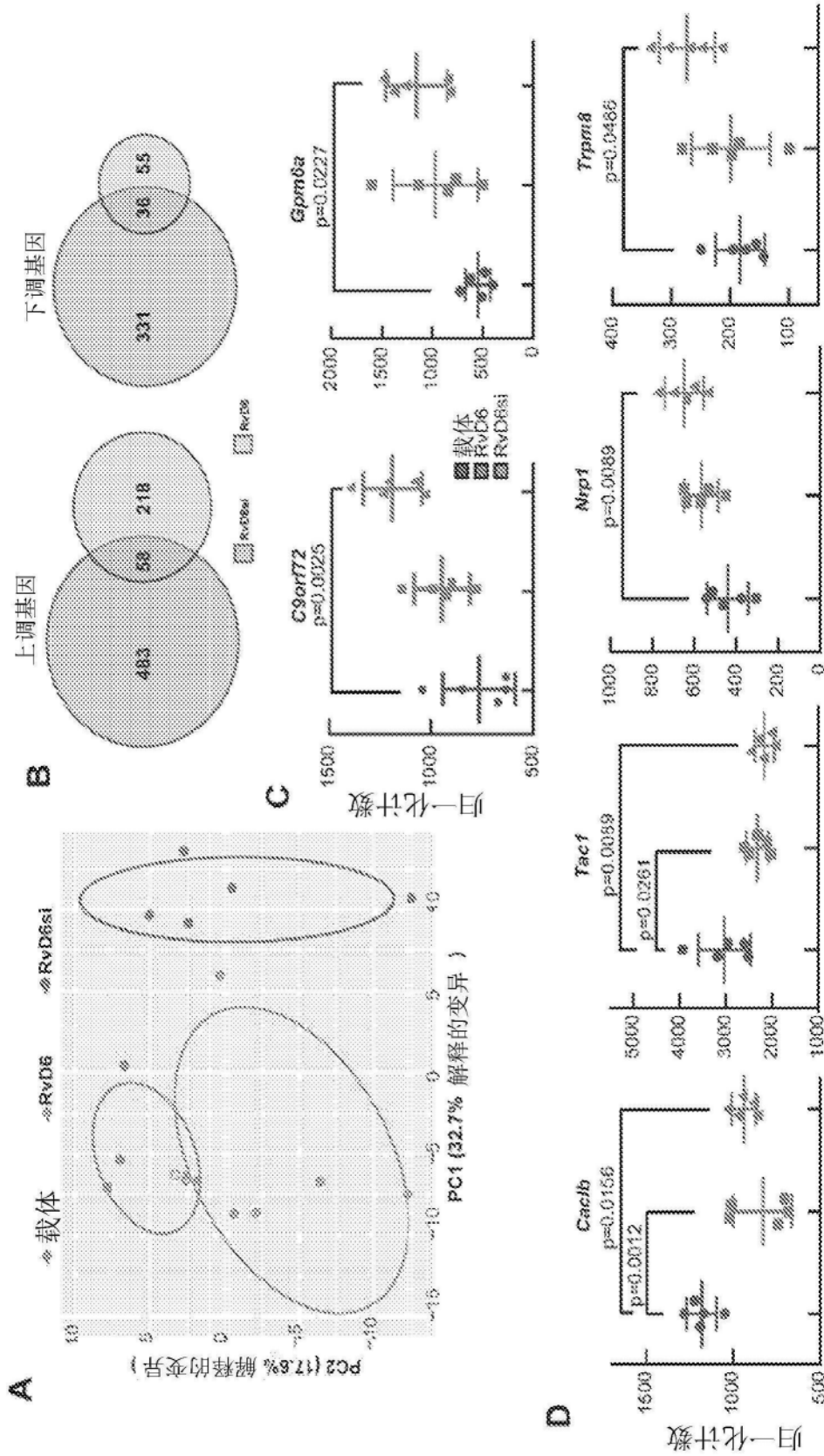


图6

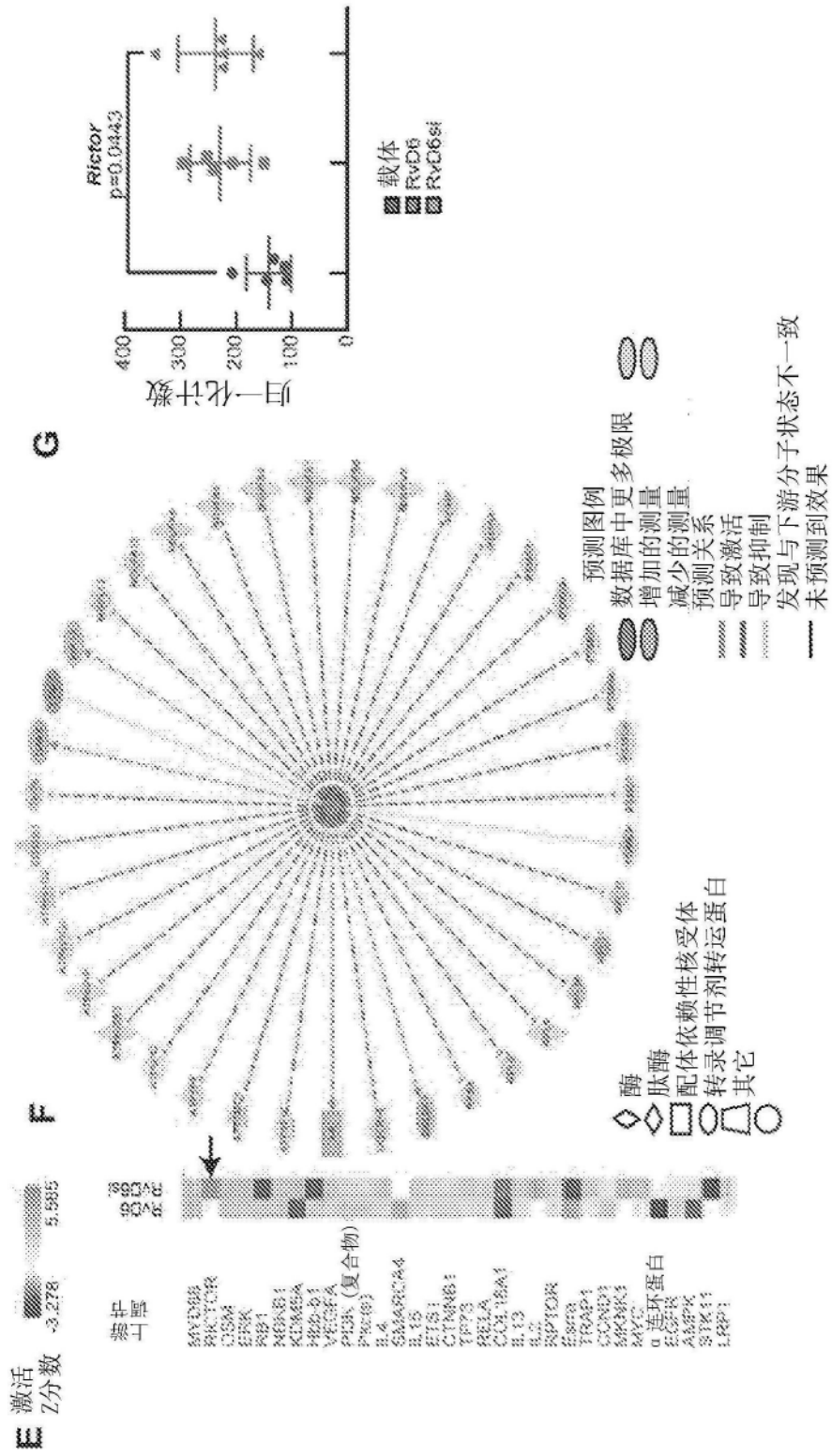


图6续

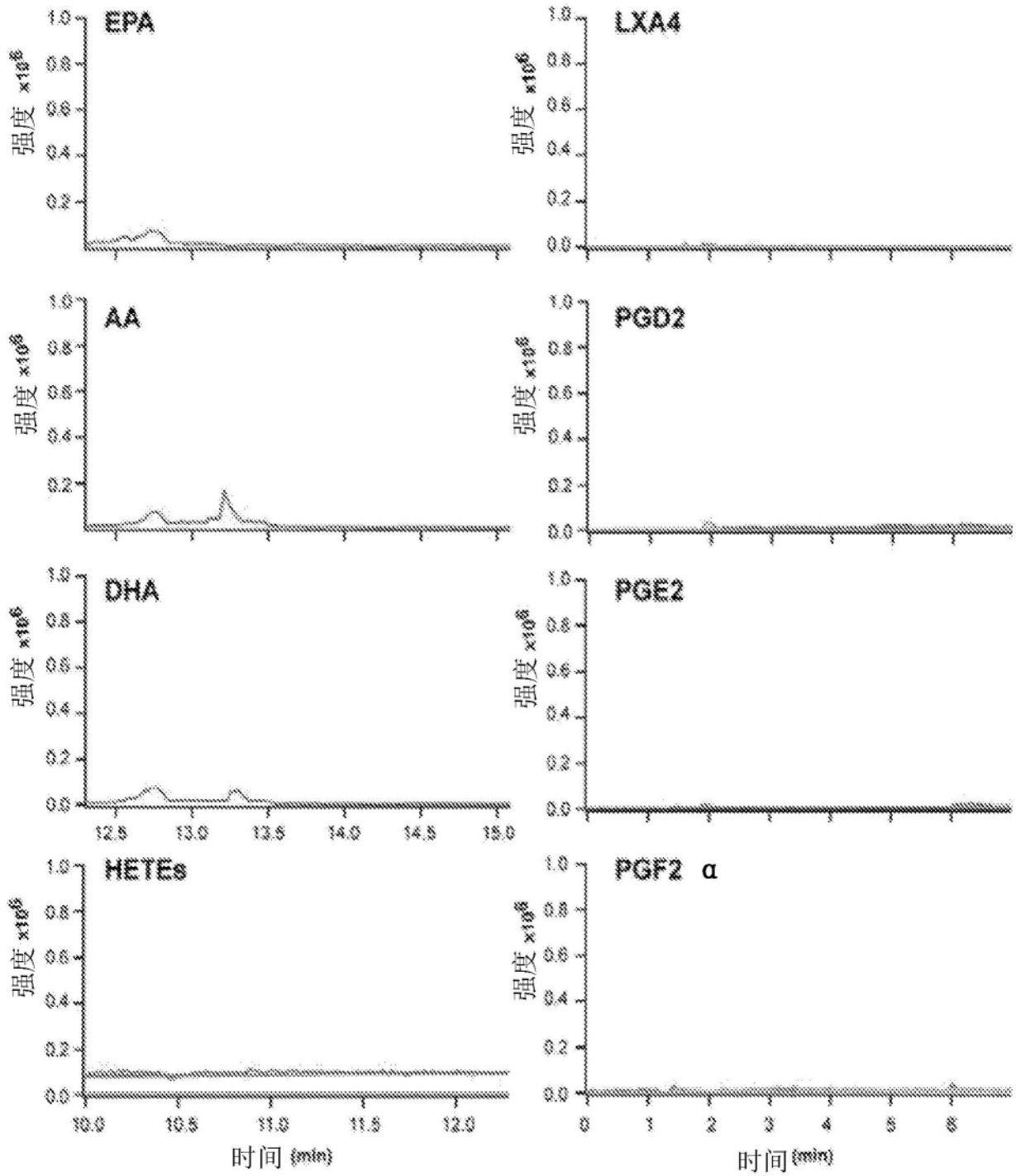


图7

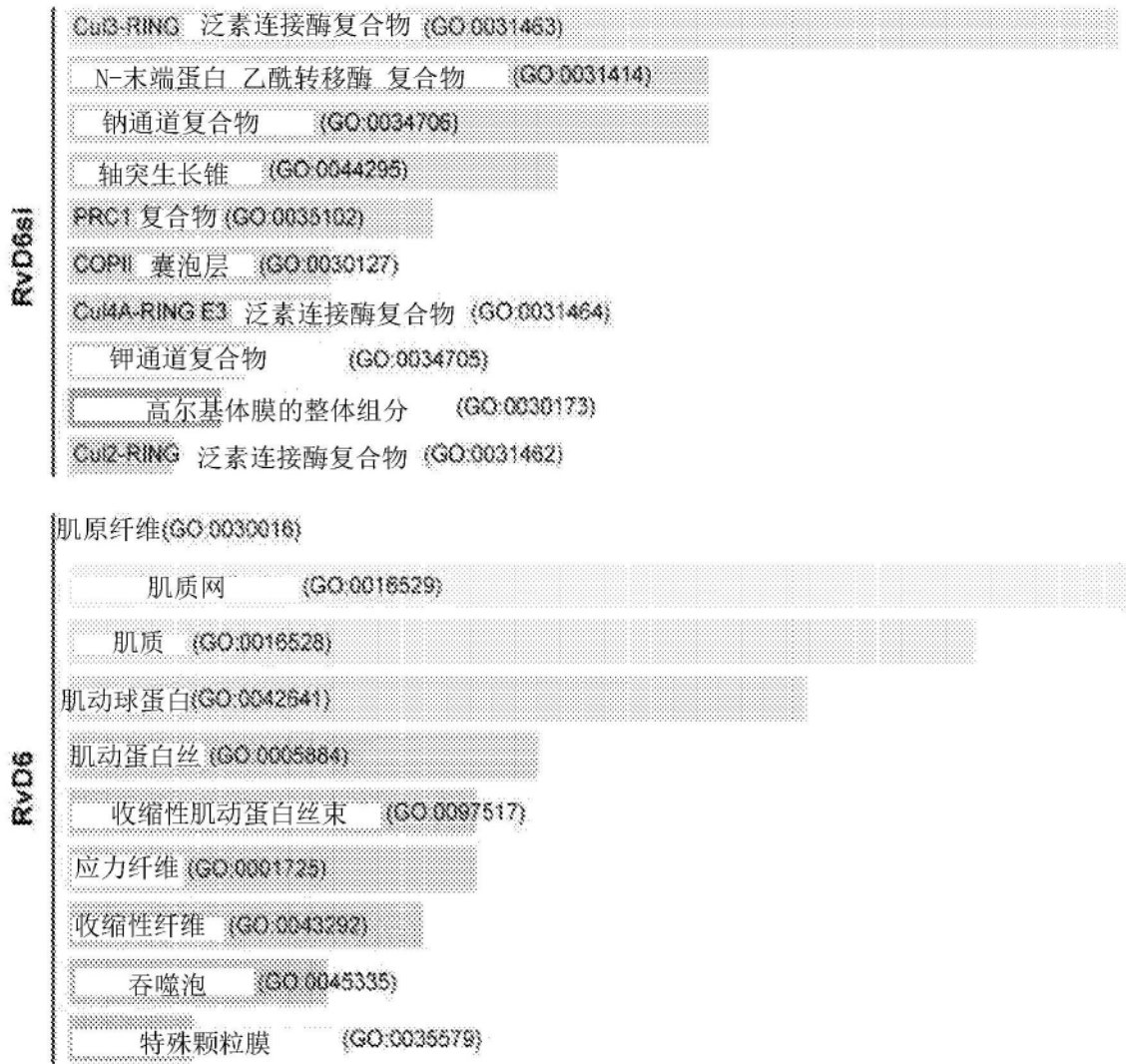


图8

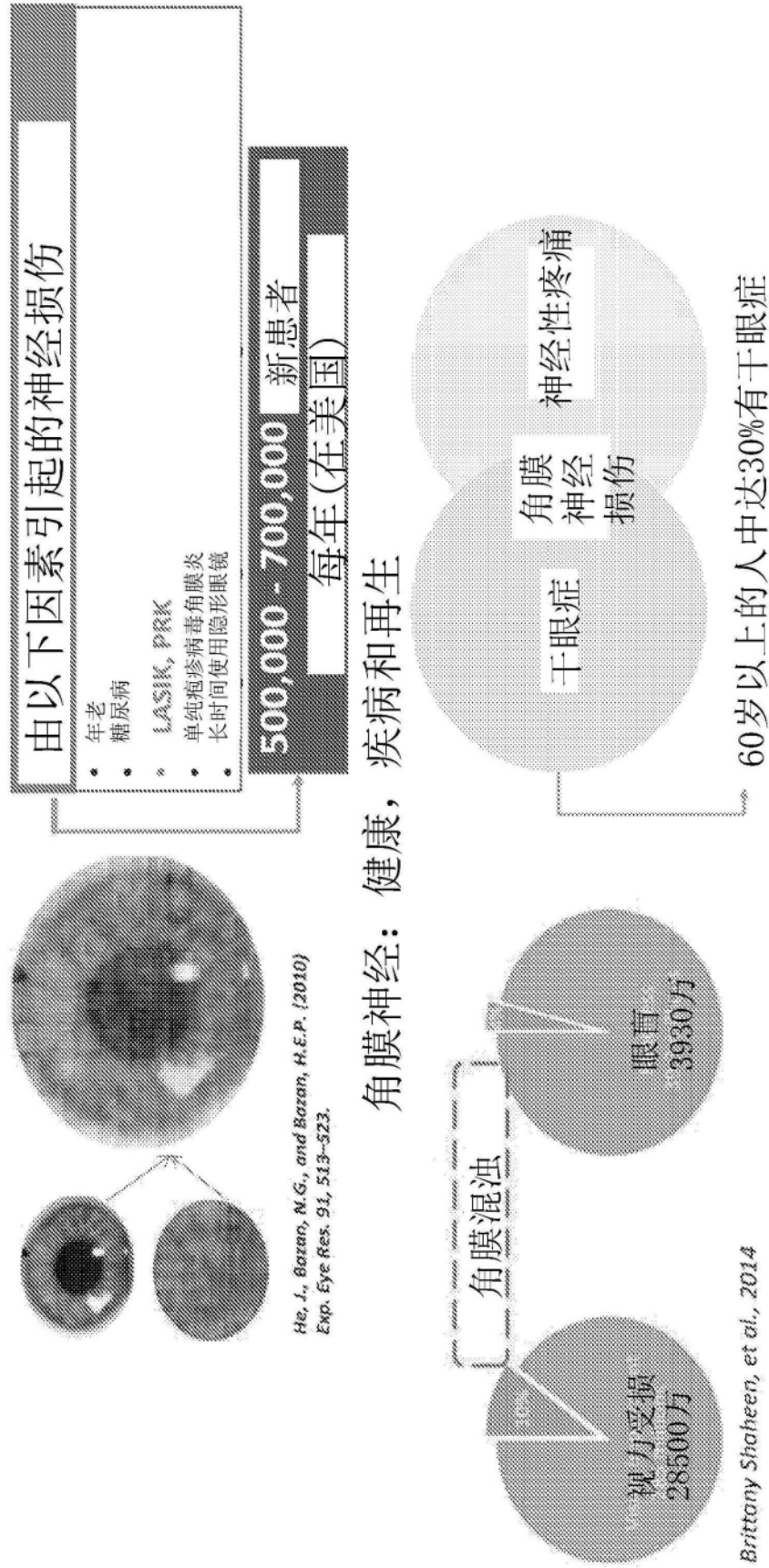


图9

恢复角膜敏感性

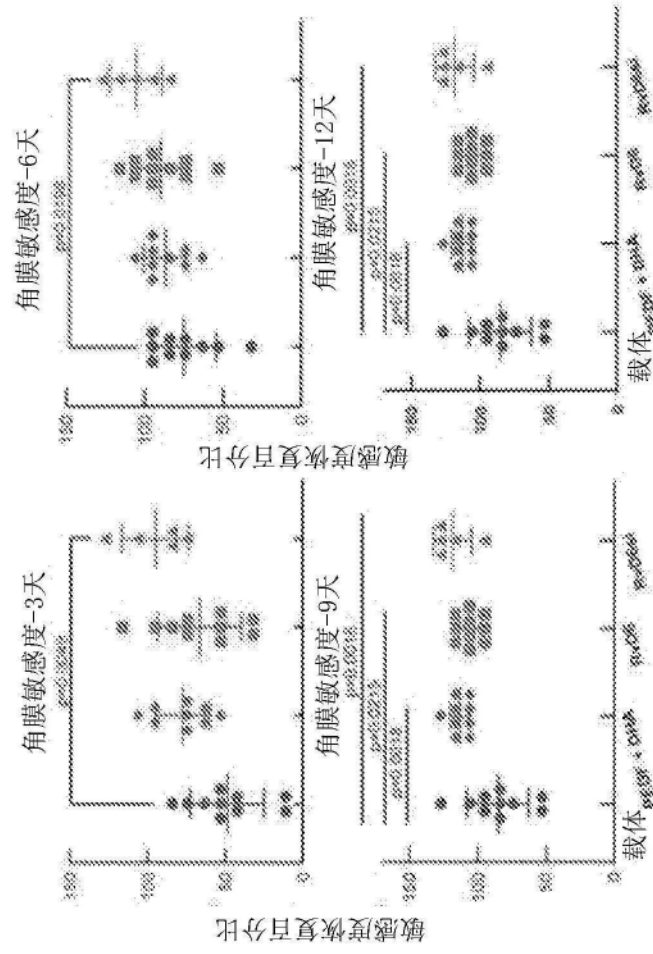


图10

增强角膜伤口愈合

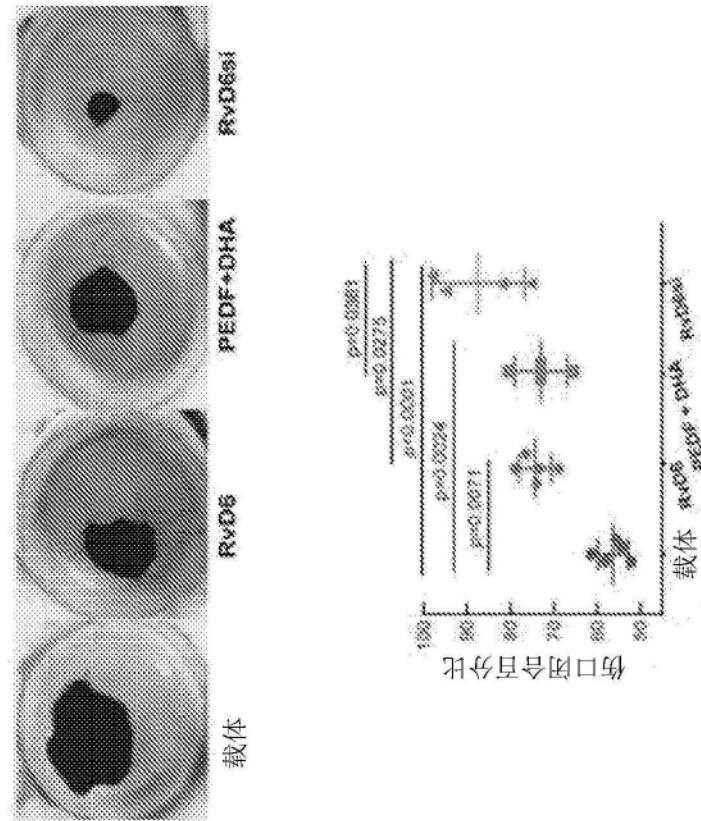


图10续

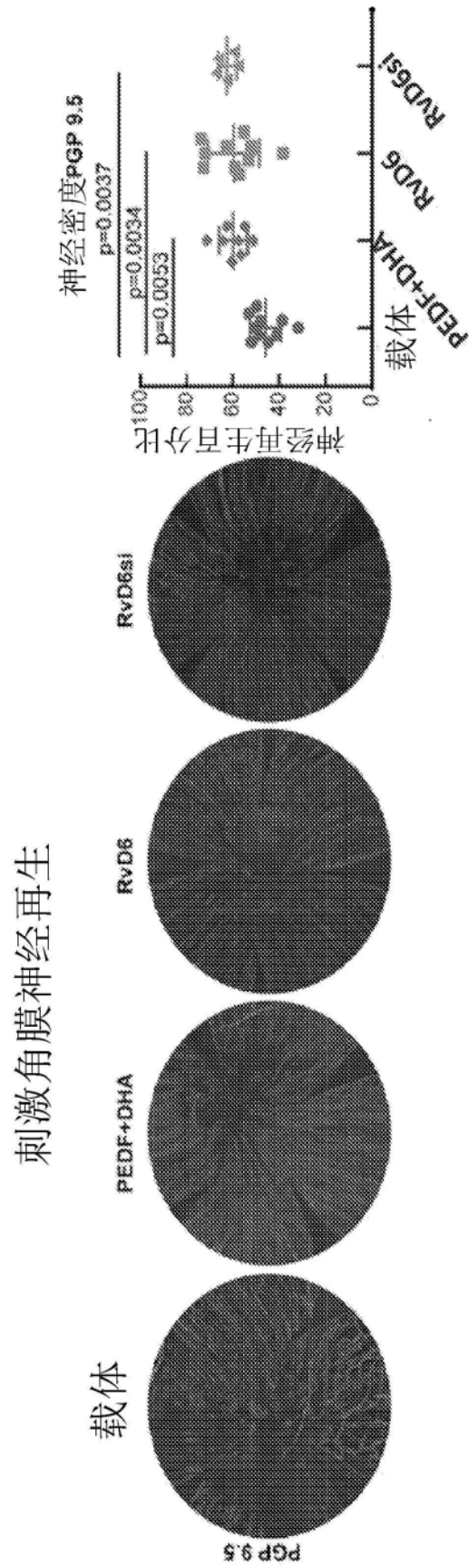


图11

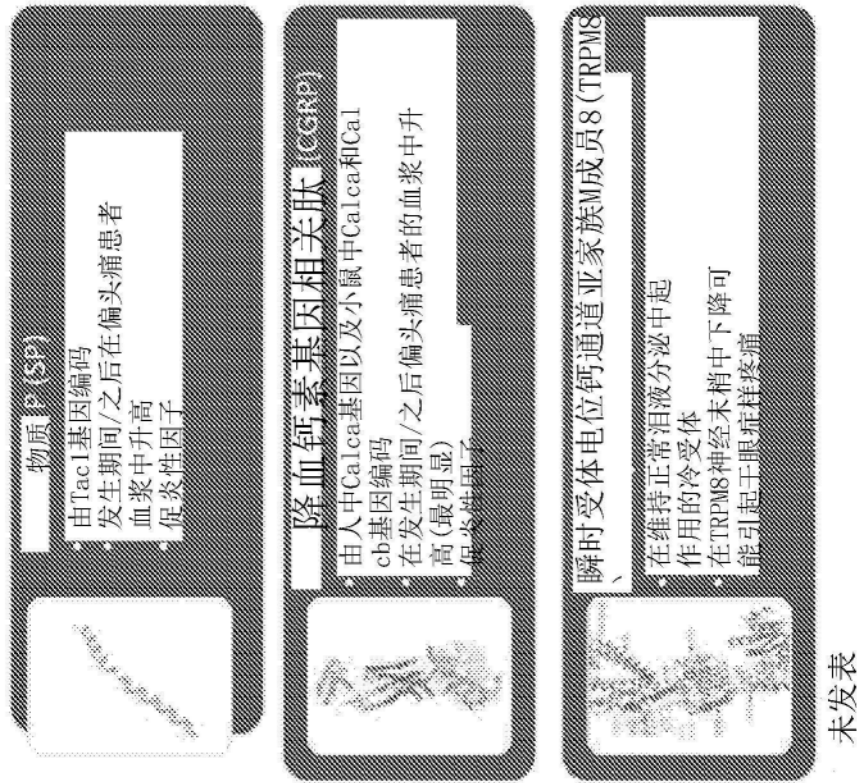
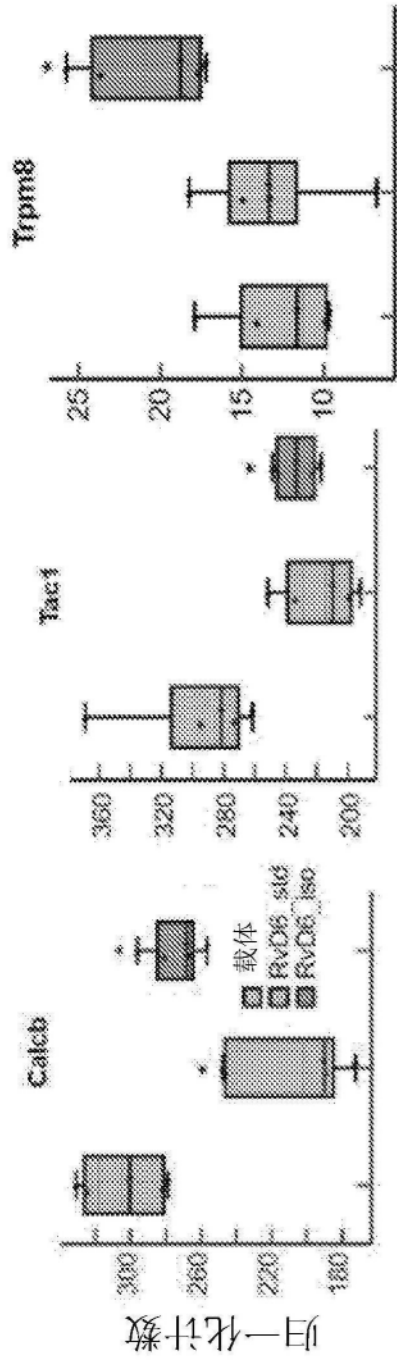


图12



干眼症样疼痛症状包括  
具有神经性病因的畏光

图12续

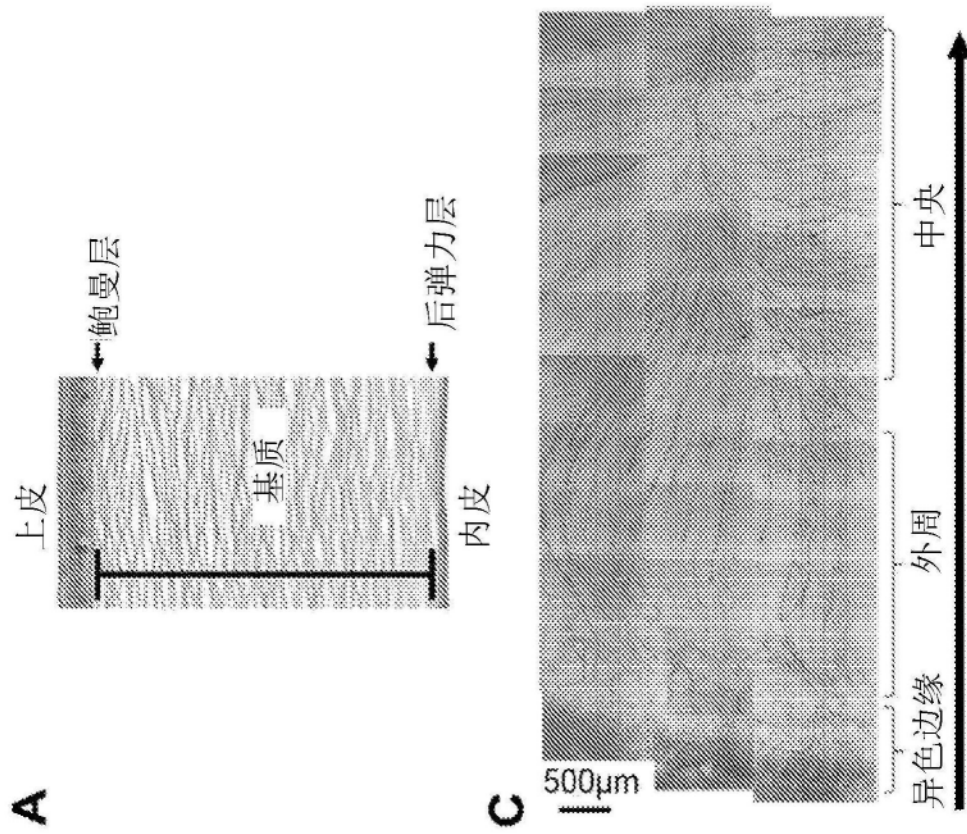


图13

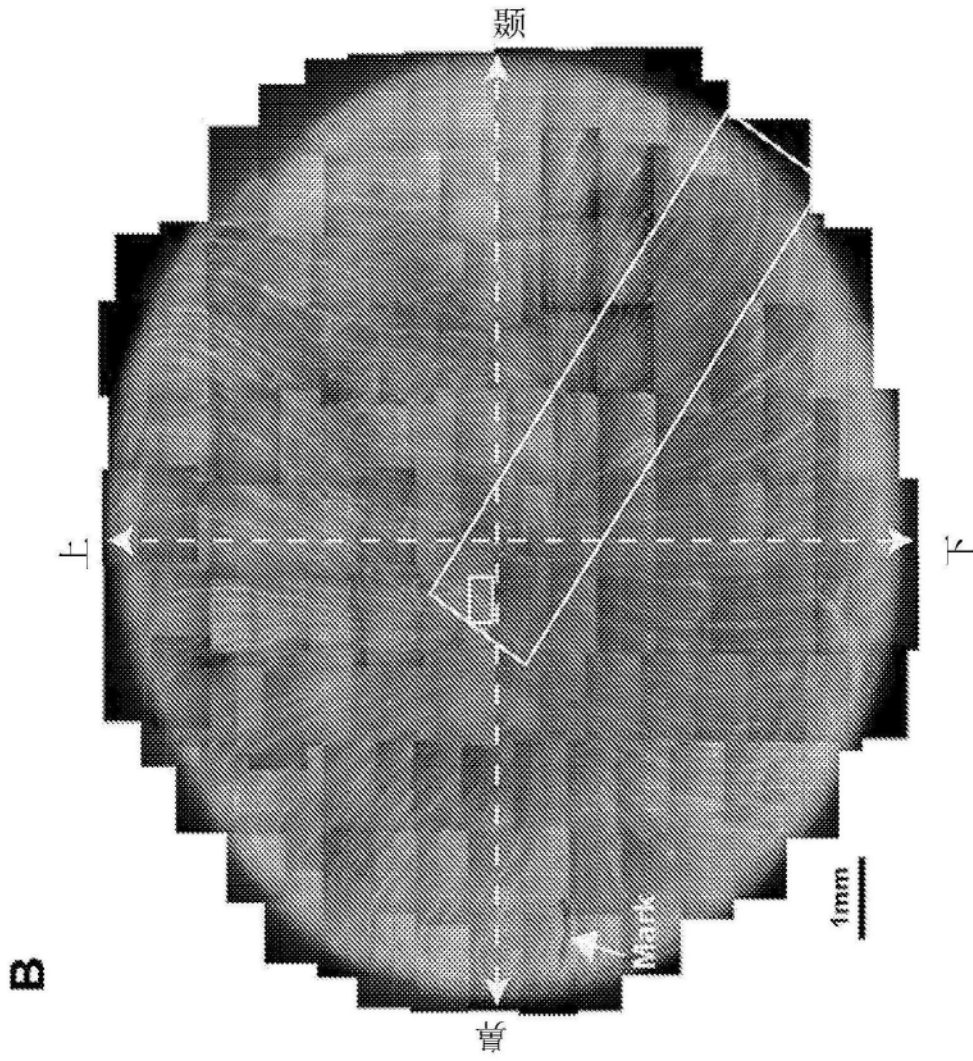


图13续

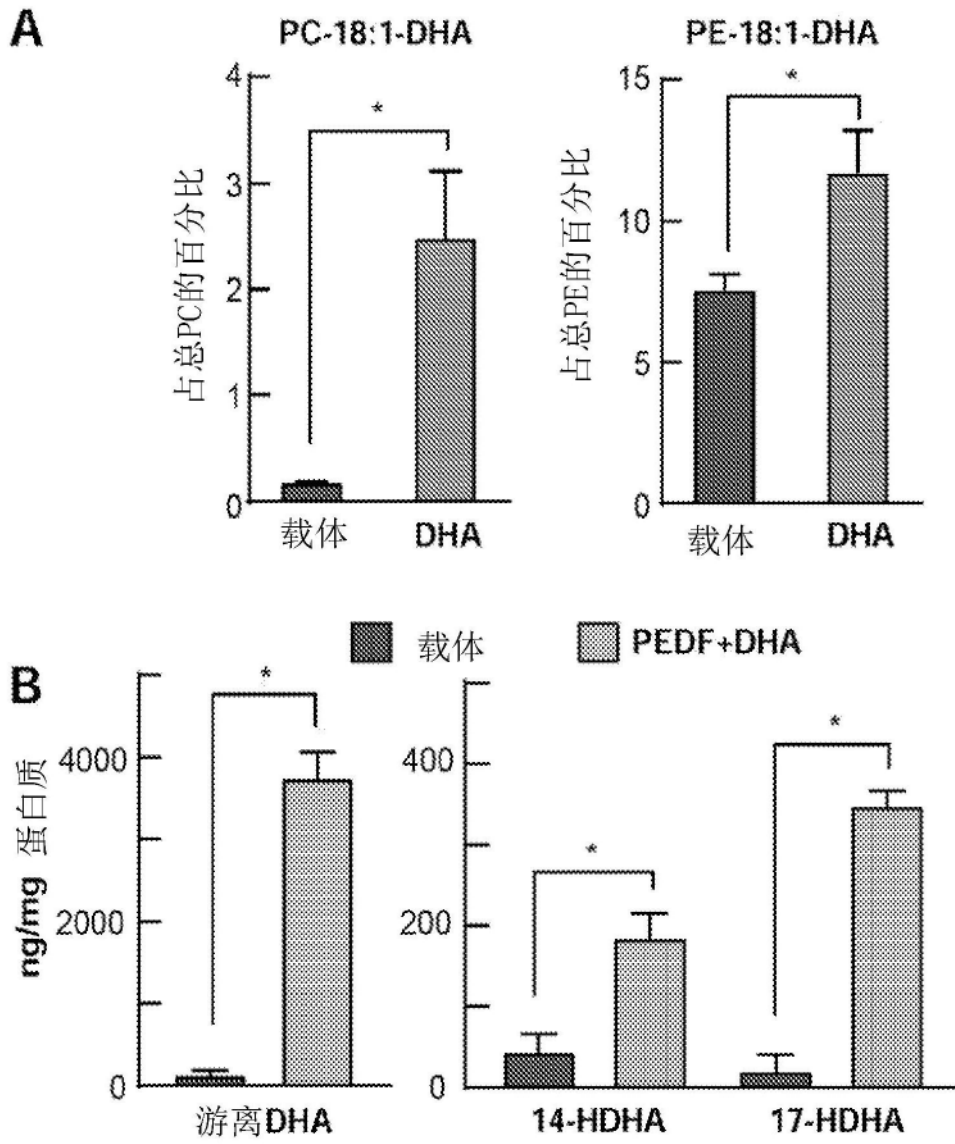


图14

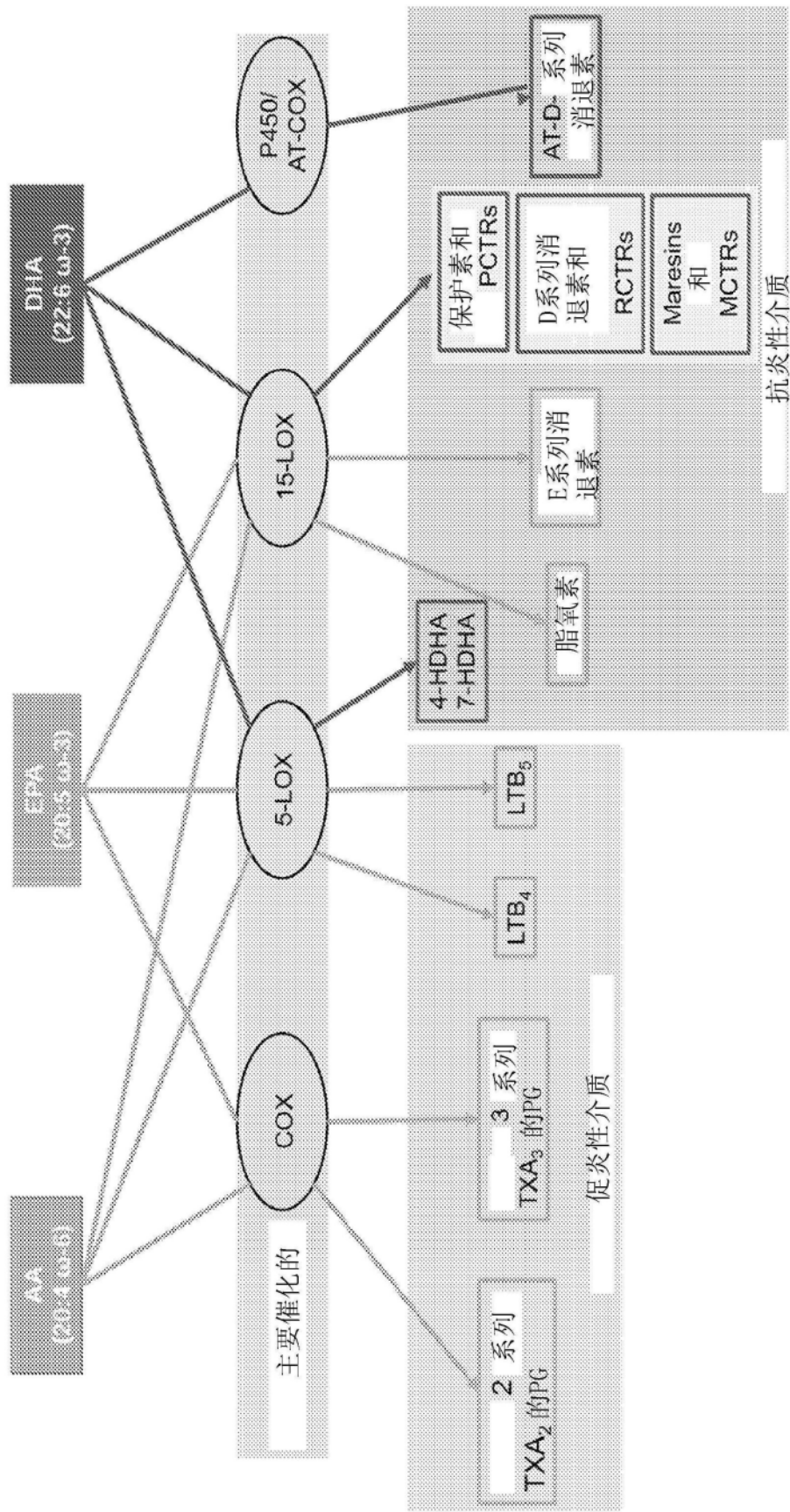


图15

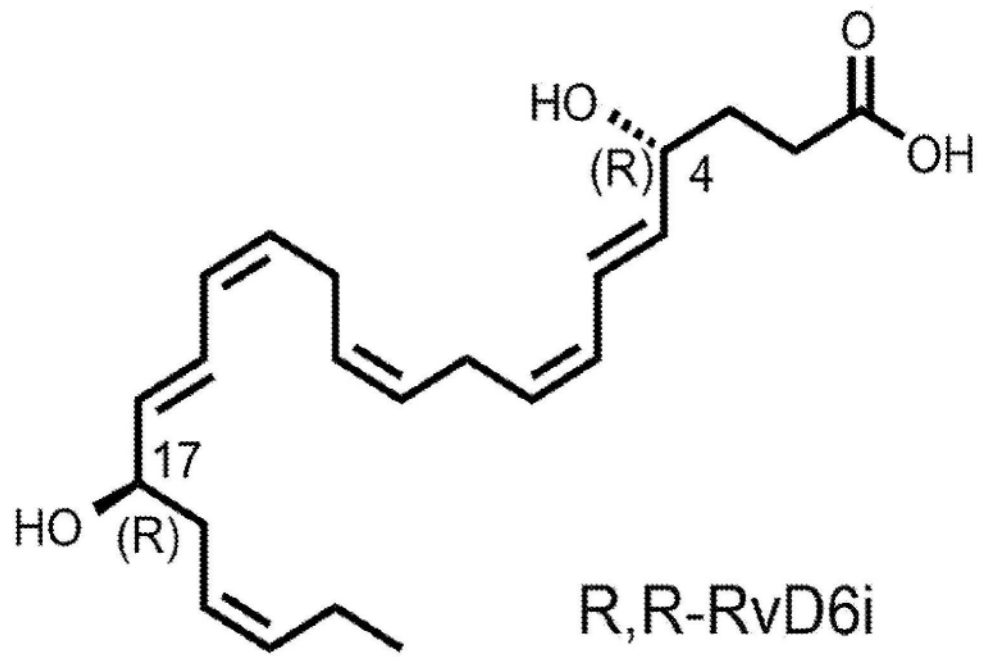


图16

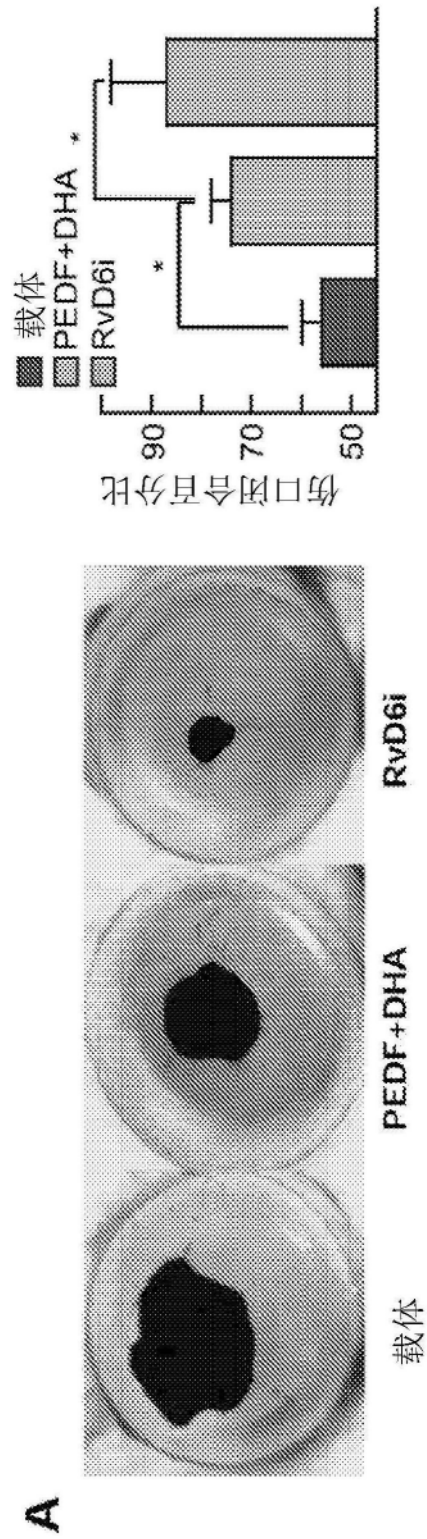


图17

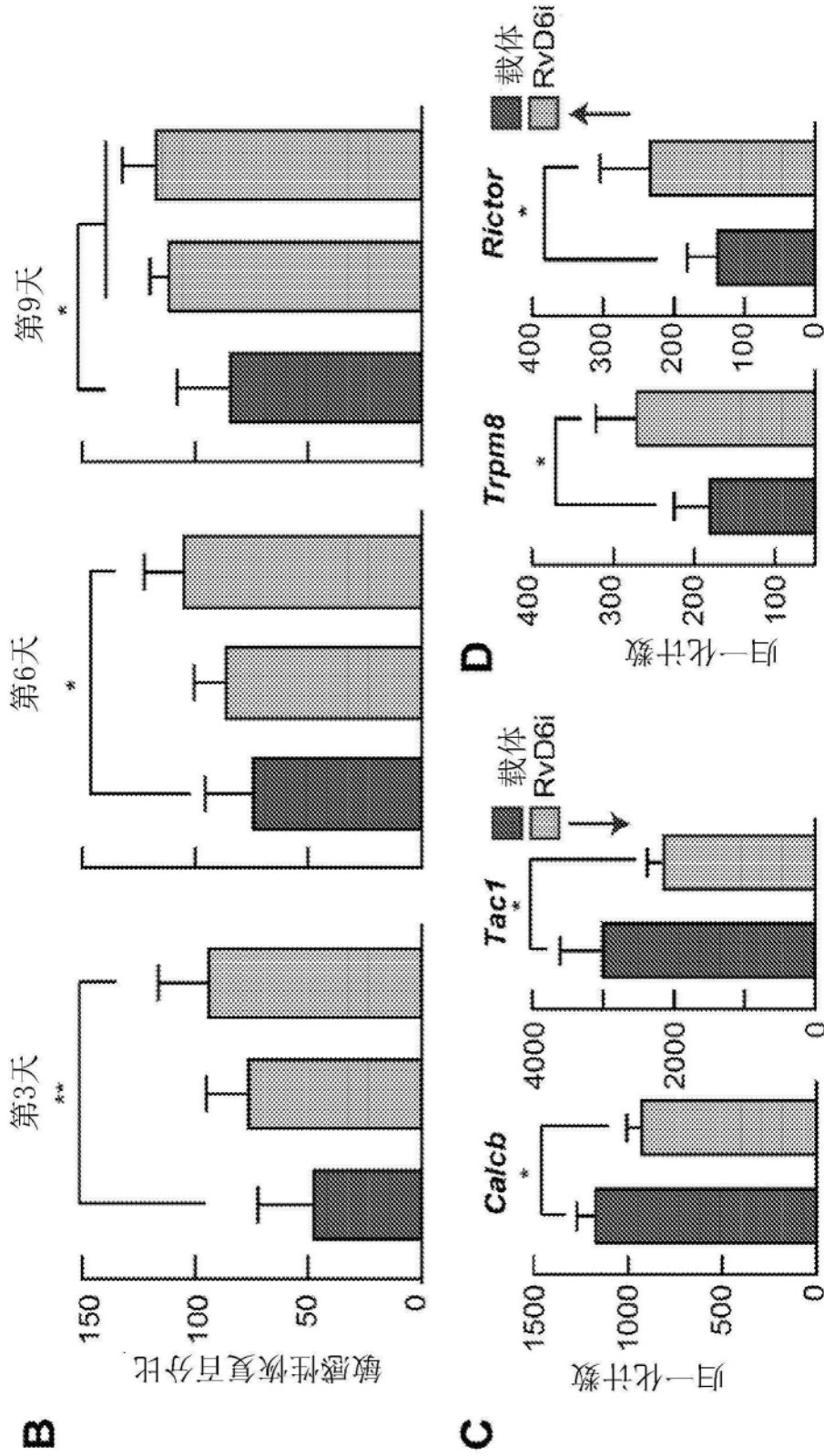


图17续

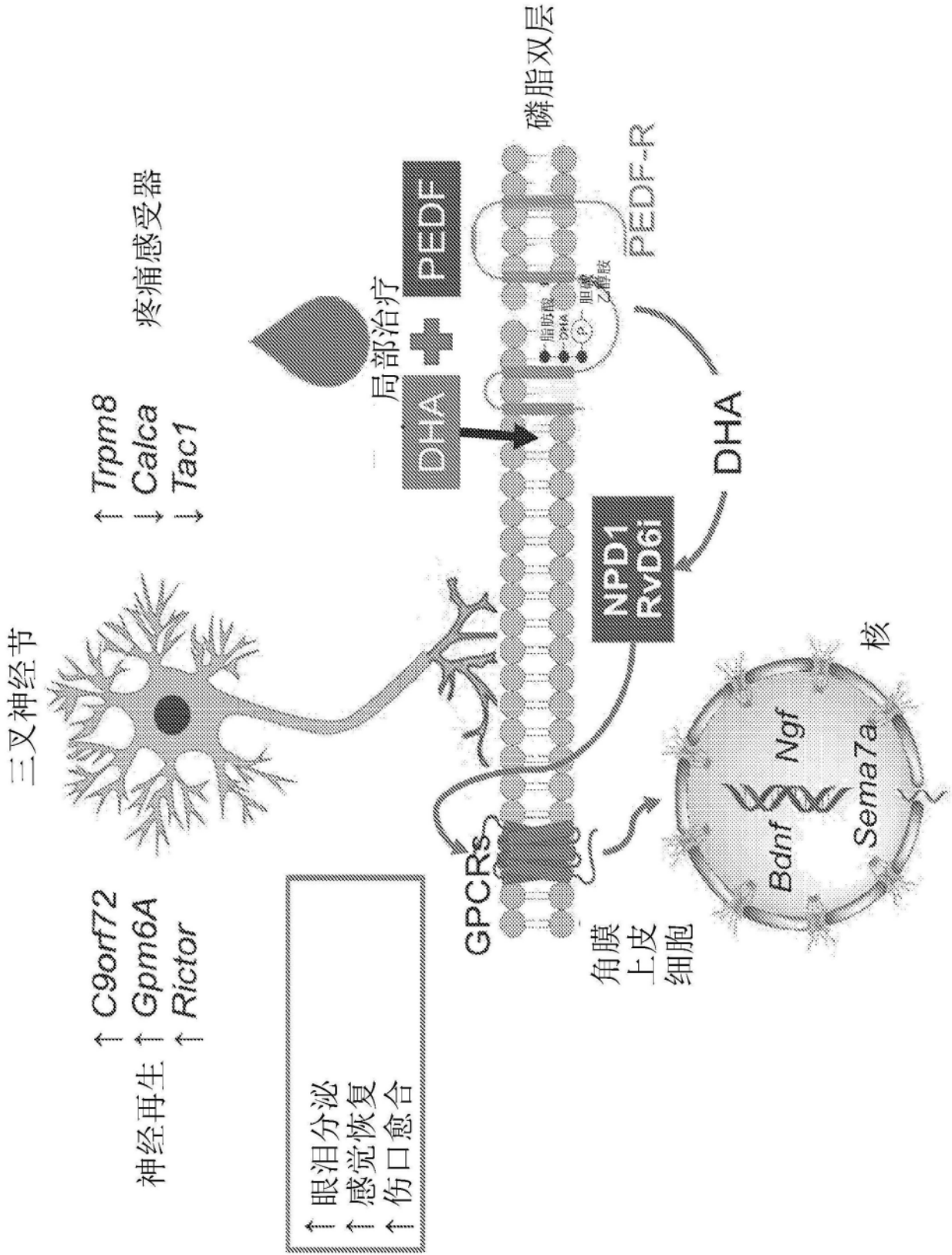


图18