



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112367985 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 201980023642.4

(22) 申请日 2019.01.31

(30) 优先权数据

62/624631 2018.01.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/016068 2019.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/152659 EN 2019.08.08

(71) 申请人 明尼苏达大学董事会

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 D·H·英巴 T·P·里奇

R·J·舒马赫尔 雷建勋

M·巴加瓦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 梅黎

(51) Int.Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

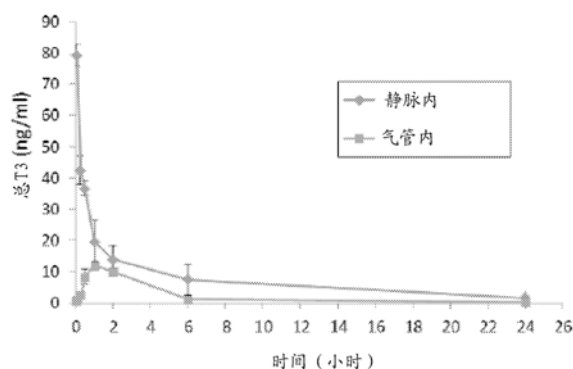
权利要求书2页 说明书30页 附图14页

(54) 发明名称

用于治疗肺水肿或肺炎的组合物和方法

(57) 摘要

用于直接施用于主体的肺道的药物组合物包含三碘甲腺原氨酸的盐和药学上可接受的缓冲液,调节至5.5-8.5的pH。所述组合物可以预防性地或治疗性地施用于主体以治疗肺炎或肺水肿。



1. 用于直接施用于主体的肺的药物组合物,所述组合物包含:
三碘甲腺原氨酸的盐;和
药学上可接受的缓冲液,调节至5.5-8.5的pH。
2. 权利要求1的药物组合物,其中以每10 ml至少5 μ g的量提供所述三碘甲腺原氨酸的盐。
3. 前述权利要求任一项的药物组合物,其中所述组合物是气溶胶化的。
4. 权利要求1或2的药物组合物,其中所述组合物是雾化的。
5. 用于治疗患有肺组织炎症或处于患有肺组织炎症的危险中的主体的方法,所述方法包括:
向主体施用有效改善肺炎的量的三碘甲腺原氨酸,其中所述三碘甲腺原氨酸直接施用于肺道。
6. 权利要求5的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过气管内滴注施用。
7. 权利要求5的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过吸入气溶胶化的制剂来施用。
8. 权利要求5的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过吸入雾化的制剂来施用。
9. 权利要求5-8任一项的方法,其中将三碘甲腺原氨酸施用到10 ng至5 mg的肺递送的药物剂量范围。
10. 权利要求5-8任一项的方法,其中在所述主体表现肺炎的任何症状或临床病征之前施用所述三碘甲腺原氨酸。
11. 权利要求5-8任一项的方法,其中在所述主体表现肺炎的症状或临床病征之后施用所述三碘甲腺原氨酸。
12. 权利要求5-11任一项的方法,其中所述肺炎是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的临床病征。
13. 权利要求5-11任一项的方法,其中所述肺水肿和/或肺炎是早产,胸部创伤,充血性心力衰竭,肺移植,肺癌放疗,肺癌化学疗法,吸烟,接触污染物,超敏感性肺炎,反应性/阻塞性肺疾病,吸入性化学性肺炎/肺炎,肺炎,鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔感染,结缔组织病,韦格纳氏肉芽肿病,古德帕斯彻病,急性嗜酸性肺炎,慢性嗜酸性肺炎,药疗法相关的肺损伤,隐源性机化性肺炎,丘-施综合征,先天性肺病或器质性肺病的症状或临床病征。
14. 用于治疗患有肺水肿炎症或处于患有肺水肿炎症的危险中的主体的方法,所述方法包括:
向主体施用有效改善肺水肿的量的三碘甲腺原氨酸,其中所述三碘甲腺原氨酸直接施用于肺道。
15. 权利要求14的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过滴注施用。
16. 权利要求14的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过吸入气溶胶化的制剂来施用。
17. 权利要求14的方法,其中所述三碘甲腺原氨酸通过吸入雾化的制剂来施用。
18. 权利要求14-17任一项的方法,其中将三碘甲腺原氨酸施用到10 ng至5 mg的肺递送的药物剂量范围。
19. 权利要求14-17任一项的方法,其中在所述主体表现肺水肿的任何症状或临床病征之前施用所述三碘甲腺原氨酸。
20. 权利要求14-17任一项的方法,其中在所述主体表现肺水肿的症状或临床病征之后

施用所述三碘甲腺原氨酸。

21. 权利要求14-20任一项的方法, 其中所述肺水肿是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的临床病征。

22. 权利要求14-20任一项的方法, 其中所述肺水肿是早产, 胸部创伤, 充血性心力衰竭, 肺移植, 肺癌放疗, 肺癌化学疗法, 吸烟, 接触污染物, 超敏感性肺炎, 反应性/阻塞性肺疾病, 吸入性化学性肺炎/肺炎, 肺炎, 鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔感染, 结缔组织病, 韦格纳氏肉芽肿病, 古德帕斯彻病, 急性嗜酸性肺炎, 慢性嗜酸性肺炎, 药疗法相关的肺损伤, 隐源性机化性肺炎, 丘-施综合征, 先天性肺病或器质性肺病的症状或临床病征。

用于治疗肺水肿或肺炎的组合物和方法

[0001] 与相关申请的相互参照

本申请要求于2018年1月31日提交的美国临时专利申请No. 62/624,631的优先权,其整体引入本文作为参考。

[0002] 政府资助

本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的HL050152的政府支持的情况下作出的。政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 概述

在一个方面,本公开内容描述了用于直接施用于主体的肺部(pulmonary tract)(例如,鼻窦(nasosinus)、气管内、支气管内或肺泡气腔(alveolar airspace))的药物组合物。通常,组合物包含三碘甲腺原氨酸的盐和药学上可接受的缓冲液,调节至5.5-8.5的pH。

[0004] 在一些实施方案中,以每10 ml至少5 μ g的量提供三碘甲腺原氨酸的盐。

[0005] 在一些实施方案中,将组合物气溶胶化(aerosolized)。在其他实施方案中,将组合物雾化。

[0006] 在另一个方面,本公开内容描述了用于治疗患有肺组织炎症或处于患有肺组织炎症的危险中的主体的方法。通常,所述方法包括向主体施用有效改善肺炎的量的三碘甲腺原氨酸,其中将三碘甲腺原氨酸直接施用于肺部。

[0007] 在任一种方法的一些实施方案中,三碘甲腺原氨酸通过滴注施用。在任一种方法的其他实施方案中,通过吸入气溶胶化的制剂来施用三碘甲腺原氨酸。在任一种方法的再其他实施方案中,通过吸入雾化的制剂来施用三碘甲腺原氨酸。

[0008] 在任一种方法的一些实施方案中,将三碘甲腺原氨酸施用到10 ng至5 mg的肺递送的药物剂量范围。

[0009] 在任一种方法的一些实施方案中,在主体表现肺炎或肺水肿的任何症状或临床病征之前施用三碘甲腺原氨酸。

[0010] 在任一种方法的一些实施方案中,在主体表现肺炎或肺水肿的症状或临床病征之后施用三碘甲腺原氨酸。

[0011] 在任一种方法的一些实施方案中,肺炎或肺水肿是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的临床病征。

[0012] 在任一种方法的一些实施方案中,肺炎或肺水肿是早产,胸部创伤,充血性心力衰竭,肺移植,肺癌放疗,肺癌化学疗法,吸烟,接触污染物,超敏感性肺炎,反应性/阻塞性肺疾病,吸入性化学性肺炎/肺炎,肺炎,鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔感染,结缔组织病,韦格纳氏肉芽肿病,古德帕斯彻病,急性嗜酸性肺炎,慢性嗜酸性肺炎,药疗法相关的肺损伤,隐源性机化性肺炎,丘-施综合征,先天性肺病或器质性肺病的症状或临床病征。

[0013] 以上概述并非意图描述本发明的每个公开的实施方案或每种实现。下面的描述更特别地例示了举例说明性实施方案。在整个申请中的几个地方,通过实例表提供了指导,所述实例可以以各种组合使用。在每种情况下,所述的表仅充当代表性组,且不应解释为排他性表。

[0014] 附图简述

专利或申请文件含有至少一幅彩色附图或照片。专利局将于请求且支付必要的费用时提供带有彩色附图或照片的本专利或专利申请公开的副本。

[0015] 图1. 来自急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 患者和正常人的肺组织中酶脱碘酶-3 (D3) 的免疫组织化学定位。(A) ARDS组织样品显示具有在多种细胞类型中弥漫性阳性D3染色的特性弥漫性肺泡损伤和气腔中的蛋白质肺泡充填 (proteinaceous alveolar filling)。(D) ARDS组织样品显示具有II型肺泡肺细胞D3-阳性染色的透明膜形成。(G) ARDS组织样品显示具有纺锤形细胞和毛细血管内皮D3-阳性染色的间质中的增殖和炎性细胞。(B, E, H) 来自正常人肺的对照组织样品显示没有显著的D3染色的正常的肺泡和间质的组织结构。(C, F, I) 用正常小鼠血清而不是第一抗体 (作为特异性对照) 处理的ARDS样品也未显示显著的D3染色。

[0016] 图2. ARDS和正常人肺的肺组织中脱碘酶-3活性和T3量。在早期ARDS肺中, 肺D3酶促活性升高, 且早期和晚期ARDS肺两者中, 肺T3浓度降低。在死后人早期ARDS ($n = 3$)、晚期ARDS ($n = 5$) 和正常对照 ($n = 4$) 肺中测量D3活性 (A) 和总T3浓度 (B)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。根据单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和Tukey氏多重比较检验 (Tukey's multiple comparison test), 没有共有共同上标的组显著不同 ($P < 0.05$)。

[0017] 图3. 单次或两次T3给药规程后的游离T3水平。对于仅接受三碘甲腺原氨酸快速灌注剂 (bolus) 的人患者按给药组的平均值 $\pm$ SD游离三碘甲腺原氨酸 (T3) 水平如下: 于0小时的 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg} +$ 于3小时的 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (空心三角形), 于0小时的 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (实心圆), 或于0小时的 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ (实心菱形)。阴影框代表血清游离三碘甲腺原氨酸水平的正常范围。

[0018] 图4. FDA批准的用于治疗ARDS的T3滴注的I/II期临床人试验的设计。

[0019] 图5. 在大鼠模型中依时间为转移的血清T3浓度 (平均值 $\pm$ SEM) 变化的时程。通过气管内滴注以 $2.7 \mu\text{g}$ ($\sim 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) 的剂量施用单剂T3。使用化学发光测定分析样品的总T3。只要有可能, 就从三个动物/性别/时间点得到平均浓度。

[0020] 图6. 向大鼠静脉内或气管内施用碘甲腺氨酸钠 ($300 \mu\text{l}$ 中 $2.7 \mu\text{g}$, pH 7.5) 后的血清T3浓度 (平均值 $\pm$ SEM)。静脉内 (菱形) 或通过气管内滴注 (正方形) 施用单剂T3。使用化学发光测定分析样品的总T3。

[0021] 图7. T3在95%氧下和在常氧 (normoxia) 中恢复过程中增加RLE-6TN细胞存活。(A) T3在高氧应激下增加RLE-6TN细胞存活。将细胞在2%处理的 (stripped) FBS培养基中在有T3 (对于A为 10^{-6} M) 或RT3 (A为 10^{-6} M) 的情况下于90% O_2 和5% CO_2 中温育72小时。(B) 在高氧下RLE-6TN细胞存活的T3剂量曲线。将细胞在具有10% FBS的DMEM/F12中在21% O_2 和5% CO_2 中培养过夜。然后在补加了2%处理的FBS的DMEM/F12培养基中, 在有指示浓度的T3的情况下, 将细胞在90% O_2 和5% CO_2 中温育72小时。(C) 将RLE-6TN细胞在高氧中在有/没有T3的情况下温育72小时, 且然后将细胞转移到室内空气 (room air) 中, 并在具有10% FBS的DMEM/F12中再培养72小时。72-小时的高氧暴露后立即计数活细胞。用锥虫蓝评估细胞生存力。在特定条件下活细胞的量表示为来自单独高氧的细胞数目的百分比。数据是四个独立实验的平均值 $\pm$ s.d., 同时 $* = P < 0.05$; $** = P < 0.01$ 。

[0022] 图8. T3在高氧损伤后增加RLE-6TN细胞的数目。(A) 将RLE-6TN细胞暴露于高氧达24小时, 然后在补加了2%处理的FBS的DMEM/F12培养基中, 在有T3或rT3的情况下, 转移到

室内空气达48小时。(B)将RLE-6TN细胞暴露于高氧达48小时,然后在补加了2%处理的FBS的DMEM/F12培养基中,在有T3或rT3的情况下,转移到室内空气达48小时。在(A)和(B)两者中,在特定条件下活细胞的数目表示为相同实验中与单独高氧相关的细胞数目的百分比。数据是四个独立实验的平均值 $\pm$ s.d.,同时 $*$ = $P < 0.05$; $**$ = $P < 0.01$ 。

[0023] 图9. T3对ATIII的高氧损伤的保护效应需要Nrf2激活。将RLE-6TN细胞在补加了2%处理的FBS的DMEM/F12培养基中,在有T3(10^{-6} M)的情况下,在90%O₂和5%CO₂中有或没有 10^{-6} M T3的情况下温育24小时。然后收集细胞用于蛋白印迹分析。(A)Nrf2的细胞总蛋白。(B)核Nrf2。

[0024] 图10. 高氧中T3-增加的RLE-6TN细胞存活需要HO-1上调。(A)在高氧下,T3增加总细胞HO-1蛋白。在有T3(10^{-6} M)的情况下,将细胞在90%O₂和5%CO₂中温育72小时。然后收集细胞用于蛋白印迹分析。(B)在有HO-1抑制剂锡原卟啉IX(10^{-6} M)tinT3(10^{-6} M)的情况下,将细胞在21%O₂和5%CO₂中温育72小时。(C)在有T3(10^{-6} M)或锡原卟啉(10^{-6} M)的情况下,将细胞在90%O₂和5%CO₂中温育72小时。用锥虫蓝评估细胞生存力。在特定条件下活细胞的数目表示为与单独高氧相关的细胞数目的百分比。数据是三个独立实验的平均值 $\pm$ s.d.,同时 $*$ = $P < 0.05$; $**$ = $P < 0.01$ 。

[0025] 图11. PI3K抑制剂渥曼青霉素阻断高氧中T3-诱导的细胞存活。在有T3(10^{-6} M)或渥曼青霉素(10^{-6} M)的情况下,在补加了2%处理的FBS的DMEM/F12培养基中,将细胞在90%O₂和5%CO₂中温育72小时。用锥虫蓝评估细胞生存力。在特定条件下活细胞的数目表示为与单独高氧相关的细胞数目的百分比。数据是四个独立实验的平均值 $\pm$ s.d.,同时 $*$ = $P < 0.05$; $**$ = $P < 0.01$ 。

[0026] 图12. 在高氧中,通过PI3K的T3-诱导的Nrf2和HO-1蛋白的增加。(A)总Nrf2的蛋白印迹和光密度测定法数据。(B)细胞质Nrf2的蛋白印迹和光密度测定法数据。(C)核Nrf2的蛋白印迹和光密度测定法数据。

[0027] 图13. 高氧降低血清总T3浓度。大鼠暴露于~95%的氧达60小时。高氧暴露24小时后开始T3补加。数据表示为独立实验的平均值 $\pm$ 标准差(SD)(对于室内空气对照的8只大鼠,对于高氧的10只大鼠,对于T3补加的6只大鼠)***, $p < 0.001$ 。RA:室内空气对照。

[0028] 图14. T3对高氧诱导的征候(indicia)的影响。(A)T3减少了高氧诱导的湿/干肺重量比的增加。(B)T3减少了高氧诱导的支气管肺泡灌洗(BAL)液蛋白浓度的增加。数据表示为独立实验的平均值 $\pm$ SD(来自48-小时暴露的两个实验的四只大鼠;来自60-小时暴露的三个实验的三只大鼠)。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。RA:室内空气对照。

[0029] 图15. T3减少高氧诱导的BALF具核细胞的增加。数据表示为独立实验的平均值 $\pm$ SD(来自48-小时暴露的两个实验的四只大鼠;来自60-小时暴露的三个实验的四只大鼠)。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。RA:室内空气对照。

[0030] 图16. T3降低肺组织中高氧诱导的髓过氧化物酶(MPO)活性。数据表示为独立实验的平均值 $\pm$ SD(来自48-小时暴露的两个实验的四只大鼠;来自60-小时暴露的三个实验的四只大鼠)。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。RA:室内空气对照。

[0031] 图17. T3减少高氧后的肺嗜中性粒细胞(MPO-阳性细胞)。在有/没有T3注射的情况下的高氧暴露后60小时,获得肺组织。用第一:抗-MPO抗体进行免疫染色。黑点代表MPO-阳性细胞。

[0032] 图18. T3注射减轻形态学高氧肺损伤。在有/没有T3注射的情况下,高氧暴露60小时的大鼠肺组织用苏木精染色,并通过光学显微镜术检查。(A)对照:室内空气;(B)高氧;(C)高氧+ T3。

[0033] 举例说明性实施方案详述

本公开内容描述了包含三碘甲腺原氨酸(T3)的组合物对于治疗肺水肿和/或肺炎有效,如例如在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中发生的过程。将T3组合物配制为以液体形式或作为气溶胶直接施用于肺中。本公开内容进一步描述了通过将T3制剂直接施用于鼻窦、气管内、支气管内或肺泡腔来治疗肺炎的方法。

[0034] 肺是甲状腺激素(TH)的靶组织。甲状腺激素影响肺发育、肺功能和肺组织损伤的修复。在啮齿类动物中,甲状腺功能减退损害肺发育过程中气腔液的清除率,而全身性T3增加成体大鼠肺中的肺泡液清除率。肺泡液清除率的T3刺激在肺中局部且快速发生。进一步地,具有甲状腺激素受体(TR) α 或 β 基因敲除的小鼠模型具有改变的肺发育以及对应激和损伤的反应。在羊模型中,当倍他米松注射液中添加甲状腺素时,早产羔羊显示围产期肺功能的显著改善。

[0035] 临床上,甲状腺疾病与多样的肺症状有关。甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进两者均可引起呼吸肌无力和/或降低的肺功能。甲状腺功能减退降低呼吸动力(respiratory drive),且也还引起阻塞性睡眠呼吸暂停或胸膜积液。相反,甲状腺功能亢进增加呼吸动力,且可能引起运动性呼吸困难。甲状腺功能减退或甲状腺功能亢进可与特发性原发性肺动脉高压(IPPAH)有关。进一步地,尽管尚未确立与发病机理有关的确切机制,但治疗基础的甲状腺疾病可逆转肺动脉高压。

[0036] 在细胞水平上,甲状腺激素状态影响肺泡数目、肺泡II型肺细胞的数目和大小及其表面活性剂的产生。T3通过增加的钠、钾ATP酶活性来增加肺泡上皮细胞中的肺泡液清除率(AFC)。主动钠吸收与在出生时的肺中、急性肺损伤(ALI)中、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中和心源性水肿如充血性心力衰竭中清除肺(肺泡性)水肿有关。相反,降低肺中的T3水平可加重肺泡性水肿。

[0037] 本公开内容描述了包括通过例如喷雾、吸入、雾化或滴注将T3直接施用于鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔的方法。虽然本文在其中肺泡性水肿和/或肺炎与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)有关的示例性实施方案的背景中进行描述,但是本文所述的组合物和方法可以用于治疗肺泡性水肿和/或肺组织的炎症,不管炎症的根本原因是什么。使用本文所述的组合物和方法可治疗的肺炎或肺泡性水肿的示例性其他原因包括,例如,早产,胸部创伤,充血性心力衰竭,肺移植前和/或肺移植后,肺癌放疗或化学疗法前和/或肺癌放疗或化学疗法后,肺炎,脓毒症,吸烟(或者烟草或者THC),接触污染物(或者环境或者职业性,例如,石棉沉着病,硅沉着病,铍中毒(berylliosis),煤工,尘肺,气体接触(gas exposure),热损伤或其他尘肺),超敏感性肺炎,反应性或阻塞性肺疾病(例如,哮喘,慢性支气管炎,反应性气道功能障碍综合征或其他反应性气道病),吸入性化学性肺炎或肺炎,肺炎或鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔感染(例如,细菌、病毒、真菌),结缔组织病(例如,类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,硬皮病,结节病和其他相关疾病),韦格纳氏肉芽肿病,古德帕斯彻病,急性或慢性嗜酸性肺炎,药疗法相关的肺损伤(例如,由于使用乙胺碘呋酮、博来霉素、白消安、丝裂霉素C、氨甲蝶呤、阿朴吗啡、硝基呋喃托英或其他肺毒性(pneumotoxic)药物的损

伤), 隐源性机化性肺炎, 丘-施综合征, 或先天性或器质性肺病(例如, 囊性纤维化, 支气管扩张。

[0038] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的特征在于具有降低的肺泡液清除率(AFC)和高死亡率的出血性炎症性肺水肿。三碘甲腺原氨酸(T3)作用于肺泡II型肺细胞, 以增加其钠、钾ATP酶活性, 从而提升水肿液清除率并增加氧向毛细血管中的扩散。T3被酶碘化甲腺氨酸脱碘酶III型(D3)灭活。大多数ARDS患者具有降低的清除肺泡性水肿液的能力。此外, 肺泡液清除率的较慢速率与更高的死亡率和更长的对机械通气支持的需要有关。因此, 改善肺泡液清除率可以改善ARDS患者的结果。本公开内容报道D3表达和活性在早期ARDS人肺组织中升高。早期ARDS中的D3诱导伴随有局部肺T3失活, 从而导致肺组织中肺T3浓度的降低。已知T3刺激肺泡液清除率, D3-诱导的肺T3失活可能妨碍ARDS中的肺泡液清除率, 从而有助于肺泡被流体浸没的程度和持续性低氧血。

[0039] ARDS肺组织样品显示具有气腔中的蛋白质肺泡充填的特性弥漫性肺泡损伤、透明膜形成和间质中的炎性细胞(图1A, 1D, 1G)。对照组织样品显示正常的肺泡和间质的组织结构(图1B, 1E, 1H)。D3在ARDS组织中的免疫组织化学定位揭示了在肺泡II型肺细胞(图1A, 1D)、纺锤形间质细胞和毛细血管内皮细胞(图1G)中高水平的D3表达。正常对照组织在所有这些细胞类型中均显示出少得多的D3抗体染色(图1B, 1E, 1H)。作为特异性对照, 第一抗体的去除不导致任何组织切片的显著D3染色(图1C, 1F, 1I)。

[0040] 为了确定ARDS肺中D3表达的增加是否与增加的酶促活性有关, 在早期ARDS($n = 3$)、晚期ARDS($n = 5$)和对照($n = 4$)肺样品中测量了D3酶活性。与正常对照组织比较, 在早期ARDS中, 肺D3酶活性为约11.3倍(1.57 对 $0.14 \pm \text{SEM}$ fmol/mg/分钟, $p < 0.0001$) (图2A)。与对照肺比较, 在晚期ARDS中, D3活性为约2.5倍(0.34 对 0.14 fmol/mg/分钟, $p = 0.29$, n.s.)。与对照肺水平相比, 早期和晚期ARDS中的肺T3水平分别低65%和77% (图2B)。这些数据一起证明在早期ARDS患者的肺中显著诱导了D3表达和活性, 并且增加的D3与总组织T3的局部减少有关。这些数据将T3在ARDS中提升肺泡液清除率(AFC)的作用与D3在低氧、炎性状况中引起T3失活的作用联系起来。

[0041] 在肺损伤中, 肺泡上皮和毛细血管内皮的透性增加, 从而允许蛋白、溶质和流体到间质和肺泡腔中的迅速跨毛细血管(transcapillary)扩散。间质性水肿且特别是肺泡性水肿液的吸收对于肺泡中有效的气体交换关系重大。肺泡液清除率通过经由基底外侧钠、钾ATP酶泵和顶端钠转运蛋白的联合作用跨肺泡上皮屏障的主动肺泡上皮钠吸收驱动。

[0042] 在正常的和损伤的大鼠肺两者中, T3滴注均显著增加肺泡液清除率。局部和/或全身炎症可能起始ARDS肺中的D3诱导。急性细菌感染和/或梗塞/局部缺血可触发D3表达。所述研究的患者中的ARDS是由多种病因学引起的, 包括肺炎(病毒性或细菌性)、脓毒症、创伤和外科手术后肺损伤, 所有这些均具有炎症作为到D3诱导和后来的T3耗尽的可能共同途径。ARDS肺中降低的局部T3浓度妨碍肺泡液清除率。降低的肺泡液清除率损害氧扩散并加重低氧血, 这是ARDS的标志。在正常情况中的基线, 呼吸和肺功能的机构消耗了全身氧摄取的5%。在危急疾病例如呼吸衰竭中, 肺的代谢需求通常显著增加, 以维持足够的氧合和通气。在ARDS中, 全身和局部炎症可能增加D3的全身和局部表达, 从而降低T3水平并在可能期望加速的功能时下调肺代谢。因为所有其他器官都依赖于肺的氧气体交换, 并且因为T3与维持肺泡液清除率和扩散能力有关, 所以肺中T3缺乏具有有害作用。

[0043] T3滴注增加正常和高氧损伤的肺组织中的肺泡液清除率。高氧诱导的肺损伤(HALI)是非常确实的急性肺损伤动物模型。高氧产生的活性氧类别(ROS)通过凋亡和坏死导致肺泡上皮和内皮细胞死亡,从而促使肺损伤。氧中毒的分子基础由直接来源于分子氧和/或间接来源于分子氧与其他种类相互作用的自由基ROS(活性氧类别)介导。因此,氧化剂介导急性和慢性肺损伤的发展。甲状腺激素影响成体和发育中的大鼠脑和肺的抗氧化剂防御。本公开内容提供了评价全身性T3补加对HALI模型中的肺炎和损伤的影响的数据。

[0044] 高氧降低血清总T3水平。危急疾病经常引起具有血清总和游离T3浓度降低的甲状腺机能正常病综合征或非甲状腺病。图13显示了测量在有或没有腹膜内T3补加(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/24小时)的情况下暴露于95%氧达60小时的大鼠中的总血清T3水平的数据。与常氧室内空气(RA)大鼠相比,高氧显著降低血清总T3(RA: 82.97 ± 14.4399 , 高氧: 53.9 ± 11.2953 , $p = 0.00043$),且补加增加血清总T3。

[0045] T3降低了高氧诱导的肺水肿和支气管肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度的增加。暴露于95%氧达60小时的成体大鼠具有显著的肺损伤,如通过BALF蛋白浓度、透性和肺水肿的增加所证明的。与常氧大鼠肺相比,高氧诱导增加的湿干肺重量比(分别为 6.49 ± 0.27 对 5.3 ± 0.16 , $p = 0.004$)。图14A显示,与室内空气相比,高氧60小时再次显著增加了湿干肺重量比(O_2 6.61 ± 0.60 对 RA 4.82 ± 0.14)。用腹膜内T3治疗(每12小时注射 $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)显著降低了所述高氧诱导的增加(O_2 : 6.61 ± 0.604 ; 具有T3的 O_2 : 5.82 ± 0.197 , 与 O_2 处理比较, $p = 0.0495$) (图14A)。高氧在48小时和60小时的时间点两者也显著增加了BALF蛋白浓度,并且T3施用显著减弱了在两个时间点的BALF蛋白浓度的高氧增加(图14B)。因此,T3补加减少高氧引起的肺水肿程度和肺泡上皮屏障的功能障碍。

[0046] T3减少了BALF细胞构成和肺组织嗜中性粒细胞累积的高氧增加。在成体大鼠肺中,95%氧暴露增加了BALF中炎性细胞的数目。实际上,与室内空气中的对照大鼠相比,暴露于95%氧48小时或60小时显著增加了支气管肺泡灌洗(BAL)细胞的数目。大多数BAL细胞是单核的细胞和巨噬细胞,但未进行分类细胞计数。与其仅高氧的对应物相比,高氧期间的T3施用两个时间点均显著降低了BALF细胞数目(图15)。

[0047] 嗜中性粒细胞浸润到肺中是肺炎的一个组成部分,其经常是肺损伤的前兆和组成部分。然而,高氧后相对少的BALF细胞是嗜中性粒细胞(数据未显示)。以两种方式直接评估T3对高氧下肺组织嗜中性粒细胞的影响:测量肺匀浆中的髓过氧化物酶(MPO)活性和对于MPO的肺免疫染色。尽管在48小时高氧不改变肺MPO活性(图16,左图),但是与室内空气对照相比,在高氧60小时,肺MPO活性显著增加(图16,右图)。T3补加显著降低了高氧诱导的MPO活性(图16,右图)。类似地,细胞化学证明,与没有T3补加的高氧肺相比,暴露于95%氧达60小时的T3-注射的大鼠在肺中显示出更少的MPO-阳性细胞,从而证实了MPO活性的结果(图17)。全身性T3补加抑制在肺组织内的高氧诱导的嗜中性粒细胞累积。

[0048] T3减轻了高氧诱导的形态学肺损伤。还进行了肺切片的组织病理学评价,以定性评估T3是否减轻了高氧肺损伤。如所预期的,单独高氧引起肺泡隔加厚、肺水肿和肺泡炎性细胞(图18A和18B)。比较起来,全身性T3补加导致实际上正常的肺形态学的持久性(图18C)。肺组织学的显著差异进一步证明,T3补加显著减弱高氧性肺损伤。

[0049] 因此,本公开内容提供了数据,其显示,与高氧暴露相伴的T3施用显著降低了高氧诱导的大鼠肺损伤的严重性,包括减少的肺中嗜中性粒细胞的累积、减少的肺水肿和较少

的肺泡上皮透性屏障的破坏在内。T3补加显著减少,但并未完全消除高氧肺损伤和炎症。这些结果强烈提示T3对高氧肺损伤的保护性抗炎作用。

[0050] 高氧暴露降低了血清总T3浓度(图13)。腹膜内注射T3在成体大鼠中恢复血清总T3(图13),并显著降低高氧介导的肺损伤,如通过减少以下各项的增加所测量的:(1)60小时时的湿/干肺重量比(图14A);(2)暴露后48小时或60小时时的BAL:液总蛋白浓度(图14B);(3)48小时或60小时时BAL液中具核细胞的数目(图15);(4)60小时时肺组织中嗜中性粒细胞的累积(图16和图17);和(5)60小时时大鼠肺中的组织病理学弥漫性肺泡壁损伤和炎性细胞浸润(图18)。这些结果证明,T3减少了高氧介导的肺炎和损伤。

[0051] 甲状腺激素通常未被鉴定为肺功能的重要调节剂。然而,甲状腺激素对肺有多种作用。例如,甲状腺激素增加肺泡II型细胞的数目、片层体的数目和表面活性剂释放。全身或局部T3施用增强正常和高氧损伤的大鼠肺和高氧损伤的大鼠肺两者中的肺泡性水肿液清除率。气腔T3施用迅速恢复大鼠肺中高氧诱导的肺损伤所降低的AFC。T3还显著增加II型肺泡上皮细胞钠、钾ATP酶活性,与其从肺泡腔去除水肿液的作用一致。T3的这种作用包括PI-3激酶(PI3K)/Akt和ERK1/2途径两者的协同作用。PI-3K/Akt途径与许多细胞对应激的应答有关,包括炎症。

[0052] 滴注的T3还增强暴露于高氧应激的肺泡II型细胞的存活。高氧暴露引起肺泡上皮细胞凋亡和坏死两者。肺泡II型(AT2)细胞的存活对于氧化剂诱导的肺损伤后的恢复是重要的。甲状腺激素(T3)减少了体内暴露于>95%氧的成体大鼠的高氧诱导的肺炎。

[0053] 动物中高氧诱导的急性肺损伤(HALI)是非常确实的急性肺损伤和ARDS的模型。长时间暴露于高氧导致产生过量的活性氧类别,从而导致伴有高肺泡水平的促炎细胞因子和过量的白细胞浸润的肺泡内皮和上皮细胞损伤和死亡。

[0054] 肺泡上皮和内皮细胞维持肺泡-毛细血管屏障的完整性,并防御氧化损伤。长时间暴露于高氧产生过量的活性氧类别(ROS),从而通过压倒氧还稳态来损伤细胞。核因子红细胞2-相关因子2(Nrf2)转录因子通过一组抗氧化剂/解毒酶的协同转录激活保护细胞以抗氧化损伤和化学致癌剂,包括血红素加氧酶-1(HO-1)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、NAD(P)H:醌氧化还原酶-1(NQO-1)、谷氨酸半胱氨酸连接酶、过氧化物氧还蛋白3、过氧化物氧还蛋白6、锰超氧化物歧化酶和过氧化氢酶。Nrf2的基因缺损增强了高氧诱导的肺损伤,而内源性Nrf2活性的加强减弱了HALI。肺上皮细胞中增加的抗氧化酶和2相解毒酶的表达保护以抗由高氧产生的ROS引起的损伤。Nrf2-调节的HO-1通过抑制凋亡在各种肺损伤模型中赋予抵抗细胞死亡的细胞保护作用。Nrf2激活促进氧化应激过程中肺泡细胞的存活。

[0055] 在暴露于90%氧72小时后,T3增加了活的AT2细胞的数目。体内高氧引起类似于早期ARDS的大鼠肺炎和损伤,且体外高氧暴露是研究ARDS中肺泡上皮细胞损伤和功能的广泛使用的模型。使用MDCK细胞,细胞密度决定了高氧暴露期间凋亡、坏死和细胞增殖的平衡。体内高氧暴露显著降低血清T3,而T3补加减弱高氧诱导的肺炎。图7显示,T3保护肺泡上皮细胞免受高氧损伤并增加其存活。在有或没有T3或rT3(失活的甲状腺激素)的情况下,将大鼠成体的AT II-样细胞系RLE-6TN暴露于90%氧达72小时,并通过锥虫蓝排除测量活细胞的数目。与室内空气(21%氧)培养条件相比,高氧使存活AT2细胞的数目显著减少几乎75%(图7A)。与高氧对照相比,T3使高氧应激下的存活细胞数目显著增加到~2.5-倍。比较起来,rT3在细胞存活中没有作用。横过一系列药理浓度观察到T3的保护作用(10^{-7} 至 10^{-5} M)(图

7B)。当允许在有或没有外源性T3的情况下已暴露于高氧达72小时的AT2细胞在室内空气中恢复另外72小时(无补加T3)时,T3对活的AT2细胞数目的保护作用继续存在,并且是具有相似的大小(图7C)。在高氧期间具有以药理浓度存在的T3的有益作用表现为即使在室内空气中恢复时间段后仍有更多存活的AT2细胞。这些结果证明,T3在高氧期间显著保护AT2细胞的存活。

[0056] T3增加了高氧损伤后恢复的AT2细胞数目。肺炎和损伤后肺泡上皮的恢复促进ARDS患者的恢复。图8显示,高氧诱导的损伤后,T3对AT2细胞的恢复有积极影响。将RLE-6TN细胞暴露于90%氧达24小时或48小时。然后,在有或没有T3或rT3的情况下,细胞在21%O₂/5%CO₂中恢复48小时。损伤24或48小时(分别为图8A和图8B)继之以恢复后,在恢复48小时时,T3显著增加了活AT2细胞的数目,而rT3没有保护作用。因此,如果T3仅在恢复阶段存在,则它对AT2细胞从高氧恢复也具有有益的作用。

[0057] T3增加高氧应激下Nrf-2蛋白的表达和核易位。转录因子Nrf2(NF-E2-相关因子2)促进细胞稳恒性,尤其是在暴露于化学或氧化应激的过程中。Nrf2调节许多抗氧化剂蛋白、解毒酶和生物异源物质转运蛋白的基础和诱导型表达。图9显示T3增加Nrf2活性。在高氧暴露24小时时评估总的细胞和核Nrf2蛋白。高氧令人惊讶地在没有改变核Nrf2蛋白水平的情况下降低了总的Nrf2蛋白表达。高氧期间的T3处理显著增加了总细胞和核Nrf-2蛋白的表达(图9)。

[0058] 高氧中T3-增加的RLE-6TN细胞存活需要T3-诱导的HO-1的增加。血红素加氧酶-1(HO-1)是抗炎、抗氧化和细胞保护酶,其由主要转录因子Nrf2的激活调节。HO-1是血红素降解的第一和限速酶的诱导型同工型,且其诱导保护以抗氧化应激和凋亡细胞死亡。脱氧丹叶大黄素(Desoxyrhapontigenin)上调巨噬细胞和炎症肺损伤中Nrf2-介导的血红素加氧酶-1的表达。图10显示在高氧期间T3改变了AT2细胞中的HO-1表达。将RLE-6TN细胞暴露于90%O₂达24小时,且然后测量细胞存活和HO-1表达。还测定了HO-1抑制剂锡原卟啉对细胞存活的影响。在高氧期间,T3处理显著增强了HO-1的总细胞蛋白(图10A)。锡原卟啉对室内空气中的AT2细胞数目没有影响(图10B),但是它阻断了T3-引起的细胞存活增加并增加了细胞死亡(图10C)。因此,T3在高氧期间增加HO-1表达,并且HO-1上调促进T3对AT2细胞存活的保护作用。

[0059] PI3-激酶活性介导T3对AT2细胞存活、Nrf2活性和HO-1表达的影响。PI3K/Akt是抗凋亡存活途径,并由许多受体依赖性机制调节。T3刺激PI3K活性,且所述途径的激活促进T3-诱导的钠、钾-ATP酶活性和质膜表达的增加。在血管内皮中,PI3K激活增加HO-1的表达,而PI3K激活增加其他细胞类型中的Nrf2蛋白水平和HO-1激活。为了检测高氧期间T3对肺泡细胞存活、Nrf2活性和HO-1蛋白水平的保护作用是否需要PI3K/Akt途径,将RLE-6TN细胞在高氧中在有10⁻⁶ M T3和/或100 nM渥曼青霉素的情况下培养72小时。渥曼青霉素在高氧期间阻断了T3-诱导的细胞存活,并导致几乎所有细胞死亡(图11)。

[0060] 图12显示了PI3K通过磷酸化对Akt激活的作用。将RLE-6TN细胞暴露于高氧达24小时,且向一些细胞添加T3达20分钟。与室内空气对照细胞相比,单独的高氧不改变总的或磷酸-Akt的量,而与室内空气对照和单独的高氧相比,T3增加了Ser473处Akt的磷酸化(图12A)。PI3激酶在高氧期间被T3激活,且所述途径的激活促进T3对AT2细胞存活的保护作用。此外,PI3K抑制剂渥曼青霉素也阻断了T3-诱导的Nrf2总细胞蛋白和核蛋白(图12B)以及

H0-1蛋白的总细胞量(图12C)两者的增加。因此,PI3-激酶途径在高氧期间被T3激活,并且所述途径的激活与T3对细胞保护性效应物H0-1和Nrf2以及对AT2细胞存活的有益作用有关。

[0061] 肺泡上皮屏障的恢复是从ARDS恢复的组成部分。保护肺泡上皮细胞免于在损伤过程中死亡和/或增加上皮再形成是加速愈合的策略。甲状腺激素尚未被认为是肺愈合的决定因素,但是在患有急性肺损伤的人和大鼠两者中,血清T3水平均降低。肺组织T3水平也显著降低。AT2细胞通过PI3K/Akt和MAP激酶介导的途径两者对T3的药理和生理浓度起反应,这增加钠、钾ATP酶活性且也增加体内肺泡液清除率。

[0062] 本公开内容提供了数据,其显示,药理浓度的T3增加了在高氧期间的AT2细胞存活,并加速了高氧后AT2细胞数目的恢复。这些作用与PI3激酶和Nrf2的激活以及H0-1表达的上调有关。当PI3K激活被渥曼青霉素阻断或当H0-1表达被锡原卟啉阻断时,T3的细胞保护作用被取消。这些发现提示肺中的T3增加增加了肺泡上皮修复。

[0063] 在许多研究中,肺上皮细胞暴露于高氧达60-72小时引起细胞死亡。然而,本公开内容提供了数据,其显示,与未处理的对照相比,在暴露于高氧之前用T3处理RLE-6TN细胞增加了活细胞数目。T3对细胞数目的作用可能至少部分归因于保持细胞增殖、减少通过坏死的细胞死亡、减少通过凋亡的细胞死亡和/或其他机制。T3通过PI3K途径活性(人神经胶质瘤、人胰胰岛素瘤)增加一些选择的细胞类型中的增殖,但抑制其他(人近端小管细胞系(HK2)和肾癌细胞系(Caki-2,Caki-1))中的增殖。过去对培养的AT2细胞的研究尚未证明甲状腺激素刺激增殖。因此,T3对细胞增殖的作用看来似乎是细胞类型特异性的。尚未仔细检查甲状腺激素对横过多种细胞类型的细胞死亡的作用。

[0064] AT2细胞的高氧暴露引起细胞增殖的阻断,并通过坏死和凋亡的组合增加细胞死亡。本公开内容提供了数据,其显示,在有T3的情况下,在高氧应激下存活的AT2细胞的数目是单独的高氧中的2.5-倍(图7),这很可能归因于T3在高氧中的强的细胞保护作用。肺损伤后肺泡细胞的再生和/或恢复改善了正常肺结构和功能的恢复。T3还增强了RLE-6TN细胞从高氧损伤的恢复(图8)。

[0065] Nrf-2与调节抗氧化剂防御有关。响应氧化剂暴露的Nrf-2激活与诱导减轻细胞应激的几种抗氧化和细胞保护酶有关。在动物研究中,Nrf-2表达与保护以抗高氧肺损伤有关。氢气,活性氧类别(ROS)的清除剂,通过Nrf-2途径减轻高氧肺损伤。肺上皮和内皮细胞死亡是高氧肺损伤的主要特征。本公开内容提供了数据,其显示高氧中的T3增加了Nrf2表达和核累积(图9),从而表明T3增加了肺泡上皮细胞中的Nrf2活性。Nrf2胞质至核的转运可能代表T3限制自由基或亲电子物质毒性的新细胞保护机制。

[0066] Nrf2,作为氧化/亲电子应激的传感物,在细胞质中通过Keap 1/滞蛋白3/Ring Box 1(Cul3/Rbx1)E3泛素连接酶复合体途径继续不断地降解。当细胞暴露于氧化应激时,Nrf2从Keap 1复合体解离,稳定并转运到细胞核中,从而导致ARE-介导的基因表达的激活。包括PKC、MAPK/ERK、p38、PERK和PI3K/Akt在内的几种蛋白激酶可以激活Nrf2,而活性可被Ser9处Akt-介导的磷酸化抑制的GSK-3 β 使Nrf2失活。GSK-3 β 使酪氨酸激酶Fyn磷酸化,从而导致Fyn的核定位。Fyn使Nrf2的酪氨酸568磷酸化,从而导致Nrf2的核输出、与Keap 1的结合以及Nrf2的降解。暴露于高氧60分钟通过PI3K/Akt在肺上皮细胞中增加Nrf2活性。本公开内容提供了显示PI3K抑制剂渥曼青霉素消除了高氧中T3-诱导的Nrf2的核水平增加的数

据(图12B),从而提示由T3激活PI3K与Nrf2核易位有关。

[0067] 血红素加氧酶-1(HO-1)是抗氧化酶,其介导针对氧化应激的细胞保护作用。HO-1在小鼠模型中防止高氧诱导的肺内皮死亡。通过PI3K/Akt途径在中国仓鼠肺成纤维细胞(V79-4)细胞中通过鹅掌菜酚(eckol)的Nrf2-介导的血红素加氧酶-1表达的上调。本公开内容提供了证明在高氧条件下T3增加了肺泡上皮细胞中HO-1表达的数据(图10A)。HO-1抑制剂TIN阻断T3-诱导的细胞存活增加(图10C)。这些结果表明,HO-1促进了T3在高氧中的细胞保护作用。

[0068] 总之,Nrf-2对抗氧化和细胞保护基因表达的上调响应高氧应激介导肺泡上皮细胞存活和/或减少细胞死亡。T3增加了肺泡上皮细胞的存活,并加速了细胞从高氧损伤的恢复。T3的这些细胞保护作用包括Nrf2的激活和经由T3-激活的PI3K的HO-1基因表达的上调。

[0069] 因此,本公开内容描述了用于维持或恢复主体中T3水平的组合物和方法。一般,主体是人。所述组合物通常包含改进的制剂中的T3。改进的配方结果产生具有有限的全身暴露的充分耐受的滴注剂(instillant)。在改进的制剂中滴注的T3可以有效减少——在一些情况下消除——肺炎(例如,与肺移植、放疗或化学疗法有关的)、增加肺水肿液清除率、减少肺损伤和/或治疗与肺疾病或损伤有关的肺炎(例如ARDS)。直接施用于肺而不是全身施用的T3是对肺炎的安全预防性和/或治疗性治疗。

[0070] 常规的T3液体制剂被FDA批准用于临床使用,以通过直接向血流中静脉内施用来治疗粘液性水肿昏迷/前驱昏迷。常规制剂没有进行pH调节,这是因为静脉内施用到血流中使T3被血清蛋白和其他血液组分的缓冲能力迅速稀释和缓冲。当将常规T3制剂直接施用于肺时,其浓度不立即被稀释,并且肺,气管支气管树和肺泡-衬液(lining fluids)的缓冲能力程度是不确定的。因此,直接从制造商的小瓶将T3滴注入气道和肺中——即,在不调节pH值的情况下——对大鼠肺黏膜和气腔是极其有毒的。

[0071] 本文所述的改进的制剂包含调节至中性pH(5.5-8.5)的T3。T3可以与任何合适的药学上可接受的载体一起配制。如本文所用的,“载体”包括任何溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和/或抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。对于药物活性物质的这种介质和/或试剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容或已知对肺组织有害,否则预期其在治疗用组合物中的使用。也可以将辅助活性成分并入组合物中。如本文所用的,“药学上可接受的”是指非生物或其他方面不期望的材料,即,材料可以在不引起任何不期望的生物效应或以有害的方式与包含其的药物组合物的任何其他组分相互作用的情况下与T3一道施用给个体。

[0072] 因此可以将T3配制成药物组合物。可以将药物组合物以适合于递送至鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔的多种形式配制。药物组合物可以施用至黏膜表面,例如通过施用至例如呼吸黏膜(例如,通过喷雾、气溶胶、雾化或滴注)。组合物也可以通过持续或延迟释放来施用。持续或延迟释放可以通过用于持续或延迟药物递送的常规的、通用技术来达到。持续释放也可以通过将T3与抑制从肺中降解或清除T3的机制的第二种药物组合来达到。一种示例性的第二种药物是D3的抑制剂,如例如,碘番酸(iopanoic acid)。

[0073] 本文所述的改进的制剂包含调节至中性pH的T3。如本文所用的,术语“中性pH”是指为pH 7.0 ± 1.5 ——即,pH 5.5至8.5的pH。在一些实施方案中,可以将制剂缓冲至至少5.5、至少6.0、至少6.5、至少7.0或至少7.5的最小pH。在一些实施方案中,可以将制剂缓冲

至不大于8.5、不大于8.0、不大于7.5、不大于7.0或不大于6.5的最大pH。在一些实施方案中,可以将制剂缓冲至落入具有由上面列举的任何最小pH和大于所述最小pH的上面列举的任何最大pH所限定的端点的范围内的pH。因此,例如,可以将制剂缓冲至5.5-8.5的pH,如例如,5.5-7.0的pH、6.0-8.0的pH、6.0-7.0的pH或6.5-7.5的pH。

[0074] 因此,可以以任何合适的形式提供T3,包括,但不限于,溶液、悬浮液、乳剂、喷雾剂、气溶胶或任何形式的混合物。所述组合物可以在具有任何药学上可接受的赋形剂、载体或媒介物的制剂中递送。示例性的合适赋形剂包括,但不限于,葡萄糖和氢氧化铵。例如,制剂可以以适合于直接递送至肺的剂量形式递送,如例如,气溶胶制剂、非气溶胶喷雾剂、溶液、液体悬浮液等。制剂可以进一步包含一种或多种添加剂,包括如例如,佐剂、着色剂、香料、调味剂等。

[0075] 制剂可以方便地以单位剂量形式提供,并且可以通过药剂学领域众所周知的方法制备。制备具有用药学上可接受的载体的组合物的方法包括使T3与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。通常,可以通过均匀地和/或紧密地使活性化合物与液体载体、细碎的固体载体或两者缔合来制备制剂。

[0076] 施用的T3的量可以取决于各种因素而变化,包括,但不限于,主体的重量、身体状况和/或年龄;主体表现出的特定临床病征或症状;肺炎或肺水肿的类型或原因;和/或施用方法。因此,包含在给定单位剂量形式中的T3的绝对量可以广泛变化,并且取决于诸如主体的物种、年龄、体重和身体状况和/或施用方法的因素。因此,普遍地陈述构成对所有可能的应用有效的T3量的量是不实际的。在细胞水平上的生理活性T3浓度已经得到确定,并取决于细胞类型和具体的激素靶作用而变化。可以设计T3的给药以达到生理或药理局部组织水平。然而,本领域普通技术人员可以在适当考虑这种因素的情况下确定适当的量。

[0077] 例如,可以以与T3已经得到管理机构批准的相同的剂量和频率施用T3以治疗肺水肿或肺炎。在其他情况中,可以以与在临床或临床前研究中评价药物相同的剂量和频率施用T3用于治疗肺泡性水肿或肺炎。人们可以如所需要的改变剂量和/或频率以达到所期望的T3水平。因此,人们可以如所需要的使用标准/已知的给药方案和/或定制给药。然而,T3的主要活性形式——即,它具有最大生理活性的形式——是当T3“游离”时——例如,不与大蛋白如清蛋白结合。因此,给定量的T3的生理效应也可能会受到蛋白及其引入的环境的其他方面的影响。因此,对于本文所述的方法——即,以“游离”状态并直接递送至鼻窦、气管内、支气管内或肺泡气腔——可能需要比根据通过静脉内递送治疗其他状况得到管理机构批准的T3剂量更少的量的T3,以实现有效的药物递送剂量。

[0078] 在一些实施方案中,所述方法可以包括施用足够的T3以向主体提供例如约0.5 μg 至约2.0 mg的沉积剂量(deposited dose),尽管在一些实施方案中,所述方法可以通过以所述范围之外的剂量施用T3来进行。在这些实施方案的一些中,所述方法包括施用足够的T3以向主体提供约5 μg 至约50 μg 的沉积剂量。在 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基础上,计算的达到生理效果的施用的T3剂量可从低至2 ng/kg 一直到1 mg/kg 。作为一个实例,50 μg 剂量可提供从约0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (对于160 kg的人)到高达25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (对于2 kg的早产婴儿的 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量范围。然而,在许多情况下,在 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 基础上的给药较不相关,这是因为直接滴注入肺组织不像例如静脉内施用一样经受全身稀释。成体的肺大小不随着体重而显著变化,因此,所递送的T3的质量经常是适当剂量更相关的量度。

[0079] 如本文所用的,术语“沉积剂量”或“肺递送的”剂量是指沉积到呼吸道表面的T3的量。对于滴注,所述沉积剂量基本上是所滴注的全部剂量。然而,在气溶胶或雾化制剂中,沉积剂量常规地是被气溶胶化或雾化的药物的10%或更少。预计90%的药物在递送装置中丧失和/或呼出。在损伤的ARDS肺中这可能更大。因此,人们可以气溶胶化或雾化500 μg 的T3以实现气溶胶化或雾化的50 μg 沉积剂量。术语“沉积剂量”或“肺递送的”剂量的使用跨不同施用途径使剂量归一化。

[0080] 足够的沉积剂量或肺递送的剂量可提供至少5 ng的最小T3量的递送,如例如至少100 ng、至少1 μg 、至少10 μg 、至少50 μg 、至少100 μg 、至少250 μg 、至少500 μg 、至少1 mg、至少1.5 mg、至少2 mg、至少5 mg、至少10 mg、至少15 mg、至少20 mg或至少25 mg。

[0081] 足够的沉积剂量或肺递送的剂量可提供不多于50 mg的最大T3量的递送,如例如不多于30 mg、不多于20 mg、不多于15 mg、不多于10 mg、不多于5 mg、不多于4 mg、不多于3 mg、不多于2 mg、不多于1.5 mg、不多于1 mg、不多于500 μg 、不多于300 μg 、不多于200 μg 、不多于100 μg 、不多于50 μg 、不多于30 μg 、不多于20 μg 或不多于10 μg 。

[0082] 足够的沉积剂量或肺递送的剂量也可以由任何范围来表征,所述范围包括上文确定的最小沉积剂量或肺递送的剂量与大于所述最小沉积剂量或肺递送的剂量的上文确定的任何最大沉积剂量或肺递送的剂量的任意组合作为端点。例如,在一些实施方案中,沉积剂量或肺递送的剂量可以是1 μg 至1.5 mg,如例如,5 μg 至50 μg 。

[0083] 在一些实施方案中,T3可以例如每天从单剂到多剂进行施用,尽管在一些实施方案中,所述方法可以通过以这个范围之外的频率施用T3来进行。当在某一时间段内使用多剂时,每剂的量可以相同或不同。例如,一天中50 μg 的剂量可以作为50 μg 的单剂、25 μg 的两剂或不等的多剂施用。同样,当在某一时间段内使用多剂时,剂间的时间间隔可以相同或不同。在某些实施方案中,T3可以每天约一次、每天四次或连续施用。

[0084] 在一些实施方案中,T3可以例如从单剂至多天的持续时间施用,尽管在一些实施方案中,所述方法可以通过施用T3达所述范围之外的时间段来进行。在某些实施方案中,T3可以一次、在3天的时间段内或在7天的时间段内施用。在某些实施方案中,T3可以每天约一次、每天四次或连续施用。通常,每天使用甲状腺素T4或T4和T3的组合供应人临床甲状腺功能减退的甲状腺激素置换。最近使用口服单剂50微克碘甲腺氨酸的研究导致在2.5小时的最高血清浓度,而平均半衰期为22.5小时。在最高血清浓度与五小时时增加的心搏率的生理效应之间存在滞后。(Jonklaas等人,*Ther Drug Monit.* 37(1): 110-118, 2015)。对于具有粘液性水肿昏迷的急性严重人疾病,存在从每4小时到每12-24小时的宽的推荐的静脉内T3施用频率。因此,在一些实施方案中,T3可以在有频繁的血流动力学参数的生理测量和较不频繁的血管外肺水(extravascular lung water) (EVLW)的情况下每天一次通过气管内滴注以逐步上升的剂量施用。

[0085] 治疗肺泡性水肿、肺炎或相关状况可以是预防地或另一方面,可以在主体表现出肺水肿或肺炎的发病或状况的相关症状或临床病征后起始。预防性的治疗——例如,在主体经历事件(例如,癌症放疗)或表现状况的症状或临床病征(例如,在感染仍处于亚临床时)之前起始的——在本文中称为对“处于”患有所述状况“的危险之中”的主体的治疗。如本文所用的,术语“处于危险之中”是指可能或可能不实际上具有所描述的危险的主体。因此,例如,“处于”传染状况“危险之中”的主体是这样的主体,其存在于其中其他个体已被确

定为患有传染状况的区域中,和/或即使所述主体尚未表现任何可检测的微生物感染指征且无论主体是否可能携带亚临床量的微生物,也很可能暴露于传染原。作为另一个实例,“处于”非传染状况“危险之中”的主体是具有与所述状况有关的一种或多种危险因素的主体,例如,遗传易感性、世系、年龄、性别、地理位置或病史。

[0086] 因此,包含T3的药物组合物可以在主体首先表现出肺水肿、肺炎或相关状况的其他症状或临床病征之前、期间或之后,或者在传染状况的情况下,在主体首先与传染原接触之前、期间或之后施用。与未施用所述组合物的主体相比,在所述主体首先表现出肺水肿或肺炎或另一种相关症状或临床病征之前起始的治疗可导致降低所述主体经历临床后果的可能,从而降低了严重性和/或完全消除了肺异常。与未施用所述组合物的主体相比,在所述主体首先表现出临床表现之后起始的治疗可导致降低所述主体经历的肺水肿和/或肺炎的严重性和/或完全消除。

[0087] 例如,当在有害的高氧暴露之前或与之同时给予T3时,对体内大鼠和肺泡II型细胞的高氧损伤减少。在体外,肺泡II型细胞死亡显著减少。在体内,肺炎、肺损伤、嗜中性粒细胞浸润和蛋白渗漏到肺泡腔中显著减少。

[0088] 因此,所述方法包括将有效量的T3组合物施用于患有肺水肿或肺炎或处于患有肺水肿或肺炎危险之中的主体。在这个方面,“有效量”是在任何程度上有效减少、限制进展、改善或消除肺水肿或肺炎的量。例如,“有效量”的T3药物组合物可增加肺泡液清除率、增加肺泡II型肺细胞的群体、增加肺泡II型肺细胞的大小、增加肺泡上皮细胞中的钠、钾ATP酶活性、降低或修复肺泡损伤、降低低氧血和/或减少整个呼吸道的炎症(例如,鼻窦、气管内、支气管内和肺泡气腔)。

[0089] 初步研究证明了通过气管内滴注施用T3组合物的安全性。安全性研究在下面的实施例3中描述。在按照优质实验室规范(Good Laboratory Practices)(GLP)进行的安全性研究中,连续5天每天通过气管内滴注向重250-350克的大鼠施用0.3 mL(300 μ l)。使用组织病理学、生理学和实验室值评估的组合,在施用材料的情况下未观察到显著的并发症或变化。所有大鼠均接受相同剂量的T3(0.3 mL中 $\sim$ 2.7 μ g)。基于第1天体重施用的T3计算剂量为10 μ g/kg。基于肺重量的计算剂量为约1.57 μ g/g湿肺重量。

[0090] 在给药之前和整个给药过程中,雄性和雌性大鼠两者均观察到具有轻微/轻度的卟啉染色。这很可能反映了以麻醉和插管法处理和运输5天诱导的轻度非特异性应激。因为这是在习服和处理时间段期间且在非T3-处理的大鼠中发生的,所以有关卟啉染色的观察结果都不能直接归因于用T3处理。

[0091] 平均来说,所有组的体重在给药的前两天内趋于下降。在最终安死术时,除稍微小于其给药前(predose)重量的T3雌性之外,体重恢复到大于给药前的体重。在最终安死术之前,雄性毒性阶段动物重267.17 g至309.60 g,平均值 $\pm$ 标准差为 285.28 ± 11.10 g。雌性毒性阶段动物重240.11 g至278.44 g,平均值 $\pm$ 标准差为 258.24 ± 9.79 g。

[0092] 除以下指出的在严重性和原因方面不同的少数麻醉恢复并发症之外,从编入研究时直到安死术为止的每日观察期间,在任何动物上均未注意到临床上显著的异常。在整个研究过程中,没有其他显著的并发症。所有其他存活的动物在最终安死术前均明显身体健康。在研究的毒性阶段,有四只盐水对照动物和一只媒介物对照动物在给药后从麻醉中恢复过程中死亡。这些死亡发生在给药后约30-60分钟,并由进行尸检的兽医病理学家判断是

由在加热垫上从麻醉中恢复过程中暴露于过高温度引起的。有两只剂量施用后死亡的T3测试动物。对于这些死亡中的一个,大体病理学发现表明其归因于结肠嵌塞,而在另一只动物中,原因未确定但被认为归因于滴注程序过程中的损伤。在用测试或对照物品给药的所有动物中,七例早期死亡中只有两例是用碘甲腺氨酸钠注射液治疗的动物。尽管有这些丧失,但每组的备用动物给药仍确保达到研究设计中概述的每个性别/组的计划动物数目。

[0093] 除一只由于凝固的样品而未接受血液学分析的动物之外,对存活至预定终点的所有毒性阶段动物进行血液学和血清化学评价。

[0094] 雌性血液学结果显示与对照组相比轻度增加的T3组中网织红细胞计数和多染色性程度(很可能临床上不重要)。在雄性中,在血液学参数中没有统计学上或临床上显著的变化。在雌性大鼠的化学结果中,唯一的发现是T3组和对照组之间平均清蛋白浓度中的微小统计差异(很可能临床上不重要)。在雄性中,化学值中的唯一差异是T3组和对照组之间平均球蛋白水平中的微小差异。在雌性中的平均清蛋白和平均球蛋白中T3组与对照组之间的差异被认为在临床上不重要,这是因为所述变化是极小的,且在实验室数据中没有其他临床上显著的变化。考虑到缺乏真实参考区间,并且已知不存在血细胞比容、血红蛋白、RBC计数的同时降低,异常RBC形态学或红细胞周转增加的迹象,T3-处理的雌性大鼠组中稍微更高的网织红细胞计数很可能临床上不重要。

[0095] 通常,在T3组和对照组之间注意到的变化在临床上被认为是不重要的,且不与T3直接相关。

[0096] 动物尸体剖检和大体病理学观察由博士George Ruth, DVM, PhD, DACVP或Rebecca Rose, DVM, PhD, DACVP进行。除了七例早期死亡外,所有毒性阶段动物都在预定的安死术时间点实施安死术。除在死亡第二天对其进行尸体剖检的从麻醉中恢复过程中死亡的五只动物外,在死亡当天对所有动物进行尸体剖检。在任何尸体剖检过程中都没有明显的并发症,并且在这项研究中,在任何动物的肺中均未检测到肉眼损害。在三个治疗组中,在其指定的终点日期在总计四只动物中检测到损害,所述损害很可能与最终的腹内注射有关。大体上未观察到毒性迹象,且尸体剖检过程中未注意到与施用测试或对照物品有关的临床显著异常。

[0097] 对动物的组织学评价结果产生以下推论。不存在与T3治疗相关的肺器官重量中的差异。所有肉眼可见的发现均和濒死期变化、自溶和或与腹膜内注射和/或气管内滴注相关的变化一致。在各治疗组中,肺中的所有显微镜发现在强度和频率上都相似。

[0098] 在这项研究中有7例计划外死亡:1例媒介物对照、4例盐水对照和2例碘甲腺氨酸钠注射动物。在所有情况下,动物在气管内注射后不久死亡或在给药后发现死亡。所有动物的肉眼可见和显微镜发现均与自溶和/或濒死期变化一致,且碘甲腺氨酸钠注射动物的死亡原因很可能与滴注程序有关,而不是测试物品相关的。在检查的任何终末器官中均没有被确定为与用碘甲腺氨酸钠注射液治疗有关的肉眼可见或显微镜发现。

[0099] T3对所有提交的样品成功地进行了定量。所有报道的值均在测定的定量范围内(10 pg/mL-460 pg/mL)。可测量的值在图5中示出(平均值±标准误)。与雄性比较雌性中更大的血清T3浓度很可能归因于雌性稍微较低的体重,以及雌性平均具有比雄性更大的肺重量/体重比的初步研究发现;相对较大的肺表面积允许T3到体循环中的更大吸收。

[0100] 因此,在最小限度的测试材料相关的有害事件或并发症的情况下通过直接滴注将

T3施用到肺中。在给药程序后,七只毒性阶段和零毒物动力学阶段的动物死亡。

[0101] 在研究过程期间未观察到有害的T3相关的临床观察结果。施用了碘甲腺氨酸钠的处于毒性阶段的雌性大鼠不以与雄性或对照组相同的速率恢复体重。在T3组和对照组之间注意到的临床病理学中的变化被认为在临床上不重要,且不与T3直接相关。

[0102] 在雄性的一小时时间点和雌性的两小时时间点观察到T3的最高水平。雄性的值始终如一地低于雌性的相应时间点。所有动物,无论体重怎样,均接受相同剂量的T3。平均来说,雌性具有比雄性更低的体重,且因此接受了比雄性稍微更高的按体重计的计算的剂量和稍微更高的按计算的湿肺重量计的剂量。

[0103] 在施用五天后评价的在大鼠模型中通过气管内滴注施用T3、生理盐水或T3媒介物未导致可归因于测试或对照物品的计划外死亡、肺重量中的差异以及被认为与用T3治疗有关的肉眼可见或显微镜发现。因此,所有测试材料均已在没有有害事件或临床上显著的测试材料相关并发症的情况下成功给药。

[0104] 在初步的剂量发现研究中,单次静脉内递送后或在气管内递送3.0 μg 中性pH T3五天后,对生理参数(例如呼吸频率、 O_2 饱和或心搏率)没有急性影响。同样,当气管内给予3.0 μg T3时,T3 C_{max} 为静脉内施用3.0 μg T3后所观察到的 $\sim 1/17$,且AUC为 $\sim 1/5$ (数据未显示)。

[0105] 在这项研究中使用的最大可行剂量(在按肺重量计 μg T3的基础上)为提议的首先在人中的(first-in-human)临床试验的起始剂量的300-倍,从而提供了显著的安全系数。

[0106] 在前面的描述和后面的权利要求中,术语“和/或”是指所列要素中的一个或全部,或者所列要素中的任何两个或更多个的组合;术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”及其变化形式应被解释为开放式的——即,额外的要素或步骤是任选的,且可能存在或可能不存在;除非另行说明,否则“一个(a)”、“一种(an)”、“所述(the)”和“至少一个/种”可互换使用,且意指一个或不止一个;并且按端点陈述数值范围包括所述范围内包括的所有数字(例如,1到5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0107] 在前面的描述中,为了清楚起见,可以单独地描述特定实施方案。除非另行明确说明特定实施方案的特征与另一实施方案的特征不相容,否则某些实施方案可以包括本文关于一个或多个实施方案所述的相容特征的组合。

[0108] 对于本文公开的包括分开的步骤的任何方法,所述步骤可以以任何可行的顺序进行。并且,适当时,可以同时两个或更多个步骤的任何组合。

[0109] 通过以下实施例举例说明本发明。要理解的是,特定的实施例、材料、量和程序要根据本文所述的本发明的范围和精神来广义地解释。

实施例

[0110] 实施例1

人肺组织获得

死后肺组织获自具有ARDS临床诊断的连续成年患者(男性和女性)。尸体解剖从2008年12月至2009年10月由机构审查委员会(Institutional Review Board)批准,并在获得家庭同意后进行。ARDS的诊断基于以下标准: $\text{PaO}_2/\text{FI}\text{O}_2 < 200\text{mmHg}$,楔压(wedge) $< 18\text{mmHg}$ 或CVP $< 12\text{mmHg}$ 和具有两侧斑片状浸润(patchy infiltrate)的CXR,如由欧美共识会议(American

European Consensus Conference)所定义的。ARDS是由多种病因学引起的,包括肺炎(病毒性或细菌性)、脓毒症、创伤和外科手术后肺损伤(表1)。死于非肺原因并由医学检查者进行尸体解剖的连续成年患者被用作对照(例如,酒精过量、体温过低、心肌梗死和汽车创伤(表1)。

[0111] 表1. ARDS患者和正常对照

ARDS 患者	ARDS 病因学	游离 T3 (pg/mL)
23 岁男性	H1N1 流感性肺炎	1.2
44 岁男性	H1N1 流感性肺炎	
46 岁女性	MRSA 肺炎/脓毒症	
64 岁男性	PCP/CMV 肺炎	
80 岁男性	肺炎球菌性肺炎/脓毒症	
40 岁男性	胆囊炎/脓毒症	
63 岁女性	CABG 外科手术后	1.5
65 岁女性	汽车创伤	
正常对照	死亡原因	游离 T3 (pg/mL)
23 岁男性	酒精过量	
63 岁男性	体温过低	
54 岁男性	急性心肌梗死	3.8
48 岁女性	汽车创伤	

MRSA:二甲氧基苄青霉素抗性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),PCP:卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)(耶氏(*jirovecii*))肺炎;CMV:巨细胞病毒;CABG:冠状动脉旁路搭桥术。

[0112] 死亡后四到十二小时内获得肺样品。从前肺区的周围/胸膜下实质解剖组织样品,切片为2-cm x 2-cm的片,在液氮中瞬间冻结,并贮藏于-80℃用于将来的测定或固定在福尔马林中并包埋用于组织学和免疫化学分析。主任(staff)病理学家(Department of Pathology and Laboratory Medicine, Essentia Health- St. Mary's Medical Center 和Duluth Clinic, Duluth, MN)对每组组织分配了组织学诊断。显示弥漫性肺泡损伤(DAD),包括细胞过多和透明膜/血纤蛋白沉积的肺样品被用作研究组织。将来自死于非肺原因并显示正常肺组织学构造的患者的肺样品用作对照组织。排除所有具有模棱两可的组织学的样品。

[0113] 人肺脱碘酶III(D3)免疫组织化学

使用第一兔抗脱碘酶3抗体(1:100;Domenico Salvatore, M.D., Ph.D., University of Naples Federico II, Naples, Italy惠赠)和生物素化的山羊抗兔第二抗体再加上抗生物素蛋白生物素复合体(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)进行用于检测D3的免疫组织化学。二氨基联苯胺(DAB)用作色原。使用以下规程:将载玻片在二甲苯中脱蜡,并用在甲醇中的0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性。将载玻片再水化并于90℃

用胰蛋白酶处理30分钟。冷却后,将切片用在PBS + 0.1%吐温-20中的10%正常山羊血清封闭30分钟。于室温将抗-D3抗体(1:100)添加1小时,继之以在PBS中洗涤,并与第二生物素化的山羊抗兔IgG抗体于室温温育60分钟。将抗生物素蛋白生物素复合体(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)与组织一起温育30分钟,继之以二氨基联苯胺的显色,直到达到所期望的染色强度为止。用苏木精将载玻片复染一分钟,脱水并检查。所有组织均以相等的暴露时间进行相同处理。使用光学显微镜(DMRB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, 德国)进行检查和照相。

[0114] D3酶促活性

将冷冻的肺组织样品解冻,并在具有10 mM二硫苏糖醇和0.25 M蔗糖的pH 6.9的0.1 M磷酸盐和1 mM EDTA中超声处理。D3活性在各反应中通过HPLC使用150 μ g细胞蛋白、200,000 cpm的3,5,[125I]3'-三碘甲腺原氨酸(PerkinElmer, Inc., Waltham, MA)、1 mM 6N-丙硫尿嘧啶(PTU)、10 mM二硫苏糖醇(DTT)和0-500 nM未标记的T3进行测定,如以前所述的(Simonides等人, *J Clin Invest* 118:975-983; 2008)。通过添加甲醇来终止反应,并通过HPLC对脱碘的产物进行定量,如以前所述的(Richard等人, *J Clin Endocrinol Metab* 83:2868-2874; 1998)。D3速度表示为每分钟每mg超声处理蛋白脱碘的T3内环的fmol (fmol/mg/分钟)。速度低于测定的检出限的样品被调整到最小可检测活性(MDA)值,0.05 fmol/mg/分钟。MDA被统计学计算为超过背景活性三个标准差。

[0115] 肺总组织T3测量

使用以前描述的方法(Excobare等人, *Endocrinology* 117:1890-1900; 1985)的改良,从重~0.5 g的人肺样品中提取甲状腺激素。用转子定子式匀浆器于~30,000 rpm将组织在每克组织含1 mM PTU的4 mL甲醇(甲醇-PTU)中匀浆30秒。为了评估个别样品百分比回收,向每个样品添加100 μ L ^{125} I-T4示踪物(在甲醇-PTU中的0.02 pg/ μ L)。添加两倍于甲醇-PTU体积的氯仿,并通过涡旋混合样品。将混合物于2000 rpm离心15分钟,且然后将上清液转移至干净的50 mL管中。通过在每克组织5 mL氯仿:甲醇(2:1)中涡旋、于2000 rpm离心15分钟并将上清液取出且与第一提取液合并,使剩余的沉淀经历两次额外的提取。向合并的提取液中,每5 mL提取液添加1 mL 0.05%CaCl₂。将所述混合物涡旋并于2000 rpm离心5分钟。将含有甲状腺激素的上部水层转移到干净的50-mL管。将下部有机层用等于以前步骤中取出的上层的量的体积的纯上层(氯仿:甲醇:0.05%CaCl₂,3:49:48)再提取两次。使合并的提取的上层经历旋转蒸发以除去剩余的氯仿和甲醇。将水混合物进行壳型冷冻(shell-frozen),并通过冷冻干燥蒸发至完全干燥。将每种冷冻干燥的样品溶解在500 μ L处理的大鼠血清中,并使用血清总T3 RIA测定试剂盒(Siemens Medical Solutions Diagnostics; Los Angeles, CA)测量T3水平,如以前所述的(Bastian等人, *Endocrinology* 151:4055-4065; 2010)。

[0116] 统计分析

使用单因素方差分析和Tukey氏事后(post hoc)多重比较检验进行D3活性和组织T3水平的统计分析。使用Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA)软件包进行统计分析和数据作图。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。选择 $\alpha = 0.05$ 以定义显著差异。

[0117] 实施例2

研究设计:如FDA-批准的研究中的新药(Investigative New Drug)(#126204)中所述

的首先在人中的临床试验。

[0118] 在施用研究药物之前的24-小时内获得知情同意。对于治疗组(介入)和对照组(非介入)两者,研究规程将从时间0开始,同时进行6-小时EVLWI/PVPI测量、12-小时EVLWI/PVPI测量、24-小时EVLWI/PVPI测量、48-小时EVLWI/PVPI测量、72-小时EVLWI/PVPI测量和96-小时EVLWI/PVPI测量。

[0119] 研究药物

人ARDS患者使用碘甲腺氨酸钠(T3)治疗,后者是甲状腺激素T3的合成形式。在含有6.8%酒精(按体积计)、0.175 mg无水柠檬酸和2.19 mg氢氧化铵的无菌非热原性水溶液中的10 µg(1 ml小瓶中的10 mcg/ml)碘甲腺氨酸钠的琥珀色玻璃小瓶中提供碘甲腺氨酸钠。滴注之前,由适当训练的药剂师在无菌条件下在0.9%生理盐水(NS)中稀释之前,通过添加1.0 N HCL将碘甲腺氨酸钠调节至中性pH(6-8)。

[0120] 碘甲腺氨酸钠如下配制用于施用:5 µg剂量(0.5 ml碘甲腺氨酸钠+ 0.9%NS至10 ml总体积);10 µg剂量(1.0 ml碘甲腺氨酸钠+ 0.9%NS至10 ml总体积);25 µg剂量(2.5 ml碘甲腺氨酸钠+ 0.9%NS至10 ml总体积);50 µg剂量(5.0 ml碘甲腺氨酸钠+ 0.9%NS至10 ml总体积)。

[0121] 治疗组(介入)

50位患者接受治疗。在编入并测量基线值时,患者通过气道滴注接受5 µg T3。对于副作用和EVLWI的变化,监控患者达24小时。24小时后,如果未观察到副作用且EVLWI和/或PVPI不变,则患者通过气道滴注接受2X逐步上升剂量的10 µg T3。对于副作用和EVLWI和/或PVPI的变化,监控患者达24小时。在从首次T3剂量起的t = 48小时,如果未观察到副作用且EVLWI不变,则患者通过气道滴注接受2.5X逐步上升剂量的25 µg T3。对于副作用和EVLWI和/或PVPI的变化,监控患者达24小时。在从首次T3剂量起的t = 72小时,如果未观察到副作用且EVLWI不变,则患者通过气道滴注接受2X逐步上升剂量的50 µg T3。在时间= 96小时(结束时间点),最终T3剂量后24-小时,进行最终EVLWI和PVPI测量。

[0122] 对照组(非介入)

对照组包括18名患者。在编入和测量基线值时,对照患者不接受研究介入。对照主体接受标准治疗(standard of care)。在时间0(治疗前)、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时和96小时测量EVLWI和PVPI。

[0123] 第一研究终点

在开始研究规程之前和此后连续地评估气道对滴注的T3疗法的安全性和可允许性。将对于复合终点监控主体,包括肺事件(例如,进行性咯血;量 $\geq$ 30ml血迹痰),心事件(例如,新的持续室性心律失常(持续时间 $>$ 30秒);具有恶化的低血压的新的持续加速交界性心律失常(accelerated junctional arrhythmia)(频率 $>$ 80 bpm);具有恶化的低血压的新的具有快速心室反应的持续心房纤颤(心室率 $>$ 160 bpm);或心脏停搏(心搏停止或无脉性电活动(pulseless electrical activity));和/或高血压危象(收缩期 $>$ 200,或舒张期 $>$ 120,或MAP的变化 $>$ 20 mmHg)。

[0124] 第二研究终点

为了评估气道滴注的T3降低ARDS患者中的EVLWI和/或PVPI的功效,从基线(T = 0)开始且在此后6小时、12 小时、24小时、48小时、72小时和96小时对于治疗组和对照组两者的

主体测量EVLWI、PVPI和氧合(动脉血气,ABG)。额外的系列测量包括血压(BP)、平均动脉压(MAP)、中心静脉压(CVP)、心指数(CI)、全身血管阻力指数(systemic vascular resistance index)(SVRI)、氧饱和 C_{2sat} ,最后在每个时间间隔测量血清游离T3、游离T4和TSH。

[0125] 实施例3

测试系统

这项研究是使用雄性和雌性Sprague-Dawley大鼠(Envigo, Huntingdon, United Kingdom)进行的。在人临床试验中用于碘甲腺氨酸钠注射的气管滴注途径的安全性的评价可以在适当剂量水平在所述物种中完成。此外,大鼠中对甲状腺激素的反应与人中的反应相似,且大鼠模型的选择很大程度上基于来自大鼠肺中甲状腺激素和相关受体以及生理反应的研究的药理数据。University of Minnesota由国际实验动物评估和认可委员会(Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International)(AAALAC)认可并由美国农业部(United States Department of Agriculture)注册,以进行实验动物研究。动物研究符合NIH指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH publication No. 86-23. 1985年修订)。在研究起始或执行更改的活动之前,适用时,由University of Minnesota的Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)对规程进行审查和批准,以符合规定。

[0126] 毒理学研究设计摘要

表1显示了研究设计的细节。麻醉60只动物(加上两只备用动物/性别/组),并通过气管内滴注测试或对照材料给药连续五天。在最后给药的次日,进行了最终血液收集用于临床病理学,其后对动物实施安死术,并由委员会认证的(board certified)兽医病理学家对所有器官进行了大体检查。收集选择的组织用于组织病理学。将二十四只处于毒物动力学(TK)阶段的动物麻醉,并以单气管内滴注T3进行给药。一直到施用后24小时,每只动物在两个指定的时间点进行最终血液收集,用于毒物动力学评价。在最终血液收集后,在没有进一步评价的情况下对TK动物实施安死术。在给药程序之前,使所有动物习服最少七天。在起始研究之前,对动物进行基线观察和检查,并且在整个研究的活体(in-life)部分进行了临床观察和体重监控。所有动物接受相同剂量体积(0.3 mL)的测试或对照材料。所述最大可行剂量(MFD)受可安全地且可重复地(在五天内)滴注入重250 g至350 g的大鼠肺中的最大体积约束,其在初步毒理学研究中确定为0.3 mL。递送的实际剂量报道为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重和 $\mu\text{g}/\text{gm}$ 湿肺重量。起始给药时,毒性阶段动物为72-135天龄。雄性重256.52 g至307.50 g,平均值 $\pm$ 标准差为 286.74 ± 11.77 g,且雌性重250.46 g至299.01 g,平均值 $\pm$ 标准差为 260.64 ± 10.34 g。起始给药时,TK阶段动物为68-144天龄。雄性重261.23克至316.19克;雌性重250.06克至280.32克。

[0127] 表1. 研究设计

	毒性阶段		毒物动力学（TK）阶段		剂量 体积
组	毒性动物数目		TK 动物数目		
	M	F	M	F	
1 T3 媒介物（对照）	10 + 2 ^a	10 + 2 ^a	0	0	300 μL
2 生理盐水（对照）	10 + 2 ^a	10 + 4 ^a	0	0	
3 T3（测试物品）	10 + 2 ^a	10 + 2 ^a	12+ 2 ^b	12+ 2 ^b	
总计	30 + 6	30 + 8	12 + 2	12 + 2	
	60 + 14		24 +4		
给药频率和持续时间	*每天一次达 5 天		单剂		
预定终点	最后给药后 1 天		第 1 天		
TK 血液收集	NA		在指定的时间点		
组织学	是		NA		

F =雌性, M =雄性, NA =不适用

^a备用物的使用-每个性别/毒性组的两只备用动物均同来自各组的动物一道给药,以便它们在相似的时间范围内可以用于置换。由于归因于非测试材料相关的问题所经历的早期死亡,在第2组中对另外两只雌性进行给药。对备用动物进行最终临床病理学和大体尸体剖检评价。

[0128] ^b备用物的使用-在研究主任 (Study Director) 的指导下从研究中释放了四 (4) 只额外的未使用的备用物。

[0129] 测试和对照材料

用于这项研究的T3是以1.0 mL中10 μ g的浓度在1.0 mL琥珀色玻璃小瓶中供应的碘甲腺氨酸钠注射液 (X-GEN Pharmaceuticals, Inc., Horseheads, NY)。每mL碘甲腺氨酸钠注射液在无菌的、非热原性USP级水中含有相当于10 μ g碘甲腺氨酸 (T3) 的碘甲腺氨酸钠、按体积计6.8%的酒精、0.175 mg无水柠檬酸和2.19 mg氨 (作为氢氧化铵)。在初步研究中,确定大鼠不耐受在如在商业上供应的 > 10.0的pH的碘甲腺氨酸钠的气管内滴注。因此,在气管内滴注到动物中之前,由在生物安全橱中无菌地添加的无菌的1.0 N HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 将碘甲腺氨酸钠和媒介物调节至中性pH (6.0-8.0)。使用无菌技术,打开碘甲腺氨酸钠小瓶,并将全部内含物转移到无菌的1.5 mL Eppendorf管中。向所述管中添加80-90 μ L 1.0 N HCl并慢慢涡旋,且使用pH测试条 (pH 4.5至10.0, Ricca Chemical Co., Arlington, TX) 测量pH。需要时,逐渐滴定额外的HCl,直到pH在所期望的范围内为止。用1.0 N HCl将pH调节至中性后,体积增加约10%,从而导致碘甲腺氨酸钠的最终浓度为约2.73 μ g T3/300 μ L (9.17 μ g/ml)。将所述溶液贮藏于4°C,并在最多到pH调节程序后26小时使用。媒介物对照溶液在无菌的、非热原性USP级水 (USP/EP Purified, Ricca Chemical Co., Arlington, TX) 中制备,且每mL溶液含按体积计6.8%的乙醇 (Decon Laboratories, Inc., King of Prussia, PA)、0.175 mg无水柠檬酸 (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO)和2.19 mg氨(J.T. Baker Chemical Co., Avantor Performance Materials LLC, Radnor, PA),氨溶液,强27.0-30.0%,N.F.-F.C.C.)。如上所述,也用1.0 N HCl将媒介物调节至中性pH(6.0-8.0)。使用无菌技术将媒介物过滤除菌,并等分试样到21个无菌一次性管中(各5 mL)且于4℃贮藏,并对于每天使用打开新管。生理盐水(0.9%氯化钠注射液USP,B. Braun Medical, Inc., Bethlehem, PA)贮藏于室温。对于每天使用打开新包装。

[0130] 活体动物护理

到达后,由经专门训练的工作人员对动物进行目视检查,然后称重,计数,辨识性别,并适当地分到容纳箱中。在起始给药之前,每只动物都接受了含个体标识符的金属耳标签。在卫生条件下,将动物安置在AAALAC认可的栏中,并进行群居安置,以提供充实(enrichment)和伙伴关系。最少每天一次监控安置区域的温度和湿度。在给药起始前使动物习服最少七天。在所述时间段期间允许进行预处理,以使动物习服它们将在称重、检查和给药程序过程中经历的处理。不限量地给所有动物食物(TEKLAD, Envigo, Huntingdon, United Kingdom)和饮用自来水。对于程序动物不禁食。在整个研究过程中都可获得兽医护理。从研究编入时起直到安死术为止,由经专门训练的技术人员至少每天一次进行总体健康的观察并进行记录,包括动物活动、外观、食物和水摄取、死亡率/垂死率(moribundity)和其他终点(表2)。把活动或外观异常通知兽医。为了防止在观察、健康问题或治疗方面的偏见,未通知兽医和一般动物护理人员剂量组分布。

[0131] 表2. 活体观察/评估和健康监控

活动	频率
处理和约束预处理	在到达后2天内开始SID
体重（克）	在起始给药之前1天内和/或起始给药日。 在给药期间最低2-3次/周 终点日
笼侧观察 • 死亡率/活的或死的 • 排粪 • 排尿 • 行为/发声 • 姿势/状态/活动 • 可获得的食物 • 可获得的水，完整的瓶 • 足够的铺盖	在起始给药之前3天内开始最低SID。 终点日
详细的临床观察 • 姿势/状态 • 体被/毛 • 眼 • 耳 • 鼻 • 呼吸 • 肌骨骼的 • 尿生殖 • 胃肠的 • 神经学	在起始给药之前至少一次 在起始给药之后至少一次 终点日

给药程序

使用无菌技术将测试和对照材料抽到给药注射器中。使用18G针，将0.5 mL空气抽到1 cc注射器中，再加上0.3 mL (300 μ L) 溶液。用腹膜内 (IP) 40 mg/kg至200 mg/kg的氯胺酮和1 mg/kg至7 mg/kg的塞拉嗪的组合有效麻醉动物。需要时，基于个体动物的反应和恢复，每天调整剂量。通过捏趾 (toe pinch) 评价麻醉深度，并将眼润滑剂应用于眼。在给药程序过程中，通过由其前切牙把动物挂在立式倾斜支架顶端的柔软、非乳胶橡皮圈上，将所述支架用于将动物支撑在所期望的位置。在用气管导管的插管法之前，用钝管饲法针将最多到20 μ L的2%利多卡因局部应用到咽喉后部，以将喉痉挛减至最小并促进气管放置。在利多卡因生效的同时，将动物从支架取出并以俯卧位安置。

[0132] 在提供足够的时间使利多卡因生效后，将动物再次挂在装置上，并通过首先借助于射向咽喉的外部光源透过口腔观察喉来将导管 (INTRAMEDIC 1.19 mm内径, 1.70 mm外径, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 插入气管。用钝镊子和用水浸湿的纱布将舌保持在一边有助于目视观察气道。将导管推进到气管中至差约1.0 cm未达到主支气管分支点的预定深度 (在具有暴露的气管和支气管的尸体动物上测量的)。通过放置在导管开口处的口腔镜的成雾来验证导管在气道中的放置。然后将给药注射器上的针插入导管内，并

以1-2秒的时间间隔快速递送测试材料和气团(bolus of air)。如使用染料溶液的初步实验所证实的,在测试材料之后施用的气团促进流体施用到下气道中,并确保流体不保留在气管或主支气管中。将气管导管从气道中取出,并将动物从支撑装置慢慢取出。滴注后,在胸部抬高的情况下将动物以俯卧位放置在加热垫上达最少两分钟。两分钟后,将动物平放在加热垫上直到完全恢复为止。

[0133] 最终安死术程序

用于临床病理学的血液收集(血液学和临床化学)

在最终(第五次)气管内给药后一天,收集来自毒性阶段动物的血液样品用于临床病理学。需要时,通过经由鼻锥(nose cone)吸入麻醉用2-5%异氟烷和1-1.5 L/分钟氧麻醉动物。对于血液学, ≥ 0.5 mL全血经由眶窦通过扁平的或包被的微量红细胞压积毛细管收集到含有额外30 μ L的2%EDTA溶液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的K₂EDTA收集管(BD Biosciences, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)中,并保持在4℃直到同一天分析为止。对于血清化学, ≥ 0.75 mL全血经由眶窦通过未包被的毛细管收集到红顶血清微量管(red top serum microtube)(Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, 德国)中。对于血清收集,在收集后将管于室温保持30至60分钟,且然后以 $10,000 \times g$ 于4℃离心5分钟。如果要在第二天发生行分析,则将作为结果而产生的血清分离并贮藏于 $\leq -70^\circ\text{C}$,或者保持于4℃用于同一天分析。所有样品均送至University of Minnesota-Veterinary Medical Center (VMC)临床病理学实验室用于分析。表3中提供了对于血液学评价的参数。表4中提供了对于临床化学评价的参数。血液收集后,在尸体剖检前,以 ≥ 86 mg/kg IP的EUTHASOL (Virbac Corp., Fort Worth, TX)对动物有效实施安死术。由Jill Schappa Faustich, DVM, DACVP, University of Minnesota进行临床病理学值的评估。

[0134] 表3. 血液学

红细胞计数 (RBC)	红细胞分布宽度 (RDW)
血红蛋白浓度 (HGB)	白细胞计数 (WBC)
游离血浆HGB	分叶核嗜中性粒细胞计数 (NEUT 绝对和相对)
血细胞比容 (HCT)	带状核嗜中性粒细胞计数 (BAND 绝对和相对)
红细胞平均容积 (MCV)	淋巴细胞计数 (LYMPH 绝对和相对)
红细胞平均血红蛋白量 (MCH)	单核细胞计数 (MONO 绝对和相对)
平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)	嗜酸性粒细胞计数 (EOS 绝对和相对)
网织红细胞计数 (Retic绝对和相对)	嗜碱性粒细胞计数 (BASO 绝对和相对)
血小板计数 (Plt & PCT绝对和相对)	肥大细胞 (绝对和相对)
血小板平均容积 (MPV)	未分类的细胞计数 (绝对和相对)
血小板分布宽度 (PDW)	

表4. 血清化学

血液尿素氮 (BUN)	重量摩尔渗透压浓度 (Osmol)
肌酸酐 (Creat)	阴离子间隙 (An Gap)
钙 (Ca)	总胆红素 (T.Bili)
亚磷 (Phos)	碱性磷酸酶 (ALP)
镁 (Mg)	γ -谷氨酰转移酶 (GGT)
蛋白 (TP)	丙氨酸转移酶 (ALT)
清蛋白 (Alb)	天冬氨酸转移酶 (AST)
球蛋白 (Glob)	肌酸激酶 (CK)
Alb/Glob比 ^a	葡萄糖 (Gluc)
钠 (Na)	胆固醇 (Chol)
氯化物 (Cl)	淀粉酶
钾 (K)	脂血症黄疸溶血 (LIH)
碳酸氢盐 (HCO ₃)	

毒物动力学 (TK)

血液收集

对于毒物动力学实验,将大鼠用腹膜内 (IP) 40 mg/kg至200 mg/kg的氯胺酮和1 mg/kg至7 mg/kg的塞拉嗪的组合进行有效麻醉用于给药程序,并用碘甲腺氨酸钠注射液气管内给药,如前所述的。表5和表6提供了TK样品收集规程的细节。取决于给药与第一或第二血液收集时间点之间的持续时间,动物或者在仍借助可注射的麻醉剂麻醉的同时收集了血液,或者如果恢复的话,则需要时,通过经由鼻锥吸入麻醉用2-5%异氟烷和1-1.5 L/分钟氧麻醉它们,以维持足够的麻醉深度(通过捏趾评估的)。在进行第一血液收集之前,将局部丙对卡因(proparicaine)麻醉眼用溶液应用于每只眼,并留出时间以生效。如上文针对于血清化学样品所述,收集用于TK分析的血清样品,并将样品贮藏于 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 直到测定为止。在最终血液收集后,以 ≥ 86 mg/kg IP的EUTHASOL (Virbac Corp., Fort Worth, TX)对动物有效实施安死术。

[0135] 表5:毒物动力学血液收集

TK 组	雄性/雌性总 数	样品收集时间点 每种场合动物 M/F 数目 (给药后靶时间) 每只动物两个时间点							
		T0	15 分 钟	30 分 钟	1 小 时	2 小 时	4 小 时	6 小 时	24 小 时
测试 物品	12/12	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

表6. 每个时间点的毒物动力学动物分布

	T0	15 分 钟	30 分 钟	1 小 时	2 小 时	4 小 时	6 小 时	24 小 时
雄性	X		X					
雄性		X			X			
雄性				X				X
雄性						X	X	
雌性	X				X			
雌性		X	X					
雌性				X				X
雌性						X	X	

每个性别/时间点三只动物

生物分析程序

对于血清T₃水平的评估,将样品送至Fairview University of Minnesota Medical Center East Bank Diagnostic Laboratory用于分析,该实验室是经CLIA和CAP认证的临床实验室。在将血清样品送至分析实验室之前,将每种样品在生理(0.9%)盐水中1:4或1:8稀释。在初步研究中测定的这些稀度确保样品的总T₃浓度将落在测定范围内(10 pg/mL至460 pg/mL)。通过化学发光测定分析样品的总三碘甲腺原氨酸(T₃)。

[0136] TK分析

由Dick Brundage, PhD, University of Minnesota进行TK分析的评价。使用Phoenix 64 WinNonlin药物代谢动力学软件7.0版(Pharsight Corp., Mountain View, California)估计毒物动力学参数。将与施用途径一致的非房室(NCA)方法用于参数估计。除非另有说明,否则所有参数(表7)均从来自所有时间点的血清中的平均T₃浓度产生。只要有可能,平均浓度就得自三只动物/性别/时间点。使用相对于每次给药施用开始的采样时间来估计参数。通过将pg/dl值除以100,并然后乘以所述样品的稀释倍数(4或8),将原始数据转换为ng/ml血清。将低于定量范围的值计算为0。

[0137] 表7. 估计的TK参数

参数	参数描述
$C_{\max}$	给药后测量的最大观测 T_3 算术平均浓度。
$C_{\max}/D$	$C_{\max}$ 除以施用的剂量。
$T_{\max}$	观察到最大观测 T_3 算术平均浓度时的给药后时间。
$AUC_{(0-t)}$	通过线性或线性/对数梯形法估计的从时间0到观察到最后可定量的浓度时的给药后时间的 T_3 算术平均浓度对时间曲线下的面积。
$AUC_{(0-t)}/D$	$AUC_{(0-t)}$ 除以施用的剂量。
当数据允许时, 通过对数-线性回归测定各算术平均浓度对时间曲线的最终消除阶段的斜率, 并估计下述额外的参数:	
估计的额外参数	
参数	参数描述
$T_{1/2}$	表观最终消除半衰期。
$AUC_{(0-inf)}$	从时间0到无穷大的算术平均浓度对时间曲线下的面积。
$AUC_{(0-inf)}/D$	$AUC_{(0-inf)}$ 除以施用的剂量。
CL	清除率: 静脉内给药后每单位时间清除了 T_3 的血浆的表观体积。
V_d	从静脉内给药后的最终消除阶段测定的 T_3 分布的表观体积。

为了报道起见, 在EXCEL (Microsoft, Corp., Redmond, WA) 中执行/重复了基质浓度数据的算术平均值和标准差的计算。除了来自平均浓度对时间曲线的参数估计值外, 使用WINNONLIN (Cetara USA, Inc., Princeton, NJ) 产生了按剂量组、日和性别 (适当时) 的 $AUC_{(0-t)}$ 和 $C_{\max}$ 的标准误。

[0138] 通过检查数据获得 $C_{\max}$ 和 $T_{\max}$ 。由于基于在时间0观察到的浓度存在可测量的内源性化合物, 所以进行了基线扣除。使用平均浓度数据, 从雄性和雌性动物的剩余浓度中减去在时间0的浓度。基线扣除的浓度的曲线下的面积 (AUC) 使用线性梯形法则计算。由于雄性和雌性动物两者中的24-小时浓度都已大致恢复到基线 (给药前) 浓度, 所以在计算AUC和半衰期时忽略了这些观察结果。从在2小时、4小时和6小时的最后三个观察结果计算最终消除半衰期。WinNonlin NCA对浓度的对数进行线性回归。选择了均匀加权方案 (Uniform weighting scheme)。NCA的默认回归算法在半衰期的计算中将不使用 $C_{\max}$, 即使它看来似乎是对数线性分布的一部分, 也将不仅基于两个观察结果提供任何半衰期。使用雄性动物的默认回归。然而, 对于雌性动物, 两小时时的浓度也是 $C_{\max}$ 值。由于它看来似乎落在所有三个浓度的回归线上 (调整R方= 1.0), 所以将其包括在半衰期的计算中。参数随评价人员的意思适当时进行评价。结果作为个别值提供, 并在可能时包括每适当的组的使用 EXCEL (Microsoft, Corp., Redmond, WA) 和WINNONLIN (Cetara USA, Inc., Princeton, NJ) 的平均值和标准误作图。

[0139] 尸体剖检程序

大体病理学

使在预定终点时被实施安死术或在预定终点前被发现死亡或被实施安死术的毒性阶段动物经受由委员会认证的兽医病理学家进行的彻底的尸体剖检。尸体剖检包括检查动物尸体和肌骨骼系统, 外表面及所有其孔口, 以及颈, 胸, 腹和骨盆区域, 腔和内含物。由于最终的眼眶血液收集方法, 未检查眼。

[0140] 组织病理学

所述研究中关于组织病理学变化评估的主要靶组织包括肺、气管支气管分支点和气管支气管淋巴结。从完整的动物中取出完整的包括上面提到所有靶组织的心肺内脏。称重心肺内脏，照相并然后通过气管用10%中性缓冲的福尔马林(NBF)将肺灌注膨胀。对于膨胀，将连接到10%NBF的储存器的18 g蝶形导管插入气管，并于~20-25 cm的恒压将肺膨胀2分钟，此后用缝合线将气管打结以在固定过程中维持肺的膨胀。然后将整个心肺内脏浸没固定在10%NBF中。在进一步处理用于组织学之前，将心、气管和任何其他粘连组织从肺去除并称重。当从尸体剖检时获得的心肺内脏的重量中减去所述重量时提供了用于后来递送的实际剂量计算的湿肺重量。对包括脑、心、肝、脾、胰、肾和肾上腺的非靶组织关于肉眼损害进行了评价。除肝之外，完整收集非靶器官，在肝中，从前右叶收集代表性样品，并贮藏于10%NBF中用于可能将来的分析。组织学处理和评估由Joan Wicks博士，DVM，PhD，DACVP，Alizée Pathology，LLC，Thurmont，MD进行。

[0141] 剂量施用

所有剂量均通过气管内滴注以可以每天一次安全且可重复地递送连续五天的最大体积施用，在初步研究中确定为对于重250-350克的大鼠0.3 mL (300 μ l)。除在对LRT 633的剂量3施用期间(T3媒介物组)从给药注射器顶部出来20-50 μ l媒介物对照物品的一种情况之外，在材料施用的情况下没有明显的并发症。

[0142] 表8详述了基于起始施用日(第1天)的体重和基于计算的湿肺重量计算的施用的T3剂量。

[0143] 表8. 计算的T3剂量。毒性阶段

计算的剂量		第3组全部	第3组雄性	第3组雌性
μ g T3/g 湿肺重量	平均值(SD)	1.57 (0.61)	1.50 (0.15)	1.63 (0.14)
μ g T3/kg 体重	平均值(SD)	10.00 (0.64)	9.45 (0.33)	10.55 (0.25)

1.0 mL T3(10 μ g/mL)用~100 μ l 1.0 N HCl稀释至pH, 1.10 mL中10 μ g = 300 μ l中2.73 μ g剂量

毒物动力学(TK)

对所有提交的样品成功地定量了碘甲腺氨酸钠(T3)。所有报道的值均在测定的定量范围内(10 pg/mL-460 pg/mL)。

[0144] 可测量的值在表9中列出并在图5中作图(平均值 $\pm$ 标准误)。对来自接受单T3剂量的所有24只动物的稀释样品进行TK分析(表10)。

[0145] 表9. 在单剂量TK研究中在血清中检测的T3

T ₃ (ng/mL) 平均值和平均值的标准误(SEM)								
	0	15分钟	30分钟	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	24 hr
雄性	1.16	2.24	3.48	8.44	6.72	6.08	3.96	0.76
	1.28	2.52	3.76	6.84	6.92	4.52	3.24	0.80
	1.20	2.44	3.36	8.16	7.28	5.36	3.64	0.72
平均值	1.21	2.40	3.53	7.81	6.97	5.32	3.61	0.76

SEM	0.04	0.08	0.12	0.49	0.16	0.45	0.21	0.02
雌性	1.44	2.56	4.92	15.60	17.68	12.32	7.52	1.84
	0.88	3.20	5.16	16.08	18.32	11.48	6.92	1.24
	1.04	3.24	7.44	13.68	16.96	10.00	7.64	1.60
平均值	1.12	3.00	5.84	15.12	17.65	11.27	7.36	1.56
SEM	0.17	0.22	0.80	0.73	0.39	0.68	0.22	0.17

表10. TK样品的非房室分析

性别	Cmax (ng/mL)	Cmax_D (ng/mL/ug)	Tmax (hr)	HL_Lambda_z (hr)	AUClast (hr*ng/mL)
F	16.53	6.12	2.00	2.85	64.08
M	6.60	2.44	1.00	3.17	25.38
性别	AUCINF_obs (hr*ng/mL)	AUCINF_D_obs (hr*ng/mL/ug)	Cl_F_obs (mL/hr)	Vz_F_obs (mL)	
F	89.70	33.22	30.10	123.60	
M	36.34	13.46	74.29	339.44	

实施例4

细胞培养和高氧暴露

成体大鼠AT2细胞系RLE-6TN(ATCC, Manassa, VA)在具有10%FBS的DMEM/F12培养基中且在95%空气, 5%CO₂的环境中培养, 直到它们达到~50%汇合, 然后将细胞在有或没有T3的情况下在具有2%处理的FBS的DMEM/F12中暴露于95%O₂, 5%CO₂达指定时间段。在高氧暴露时间段结束时, 通过锥虫蓝染料排斥计数活细胞。

[0146] 核提取

按照制造商的说明书, 使用NE-PER核和细胞质提取试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)提取核。

[0147] 细胞裂解和蛋白印迹

在含有20 mM Tris • HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (vol/vol) Triton X-100与蛋白酶抑制剂(1 mM PMSF, 2 µg/ml胃蛋白酶抑制剂, 和各10 µg/ml的抑酶肽和亮抑酶肽), 和磷酸酶抑制剂(2.5 mM焦磷酸钠, 1 mM β-磷酸甘油和1 mM Na₃VO₄)的裂解缓冲液中裂解细胞。通过25-号针在冰上将裂解物抽提10次用于进一步裂解, 且然后于4℃以13,000 rpm离心15分钟。收集上清液, 并通过使用BCA蛋白质测定试剂盒(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)测定蛋白浓度。在所述步骤之后, 马上使等量的蛋白经受蛋白印迹分析。

[0148] 核提取。

[0149] 按照制造商的说明书, 使用NE-PER核和细胞质提取试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)提取核。

[0150] 统计学

除非另外指出, 否则所有数据均表示为最少三个或更多个独立实验的平均值±SD。在大多数实验中, 实验中的个别数据点代表至少两次重复实验的平均值。通过ANOVA和事后成

对比较分析涉及三个或更多个组的比较。平均值之间的差异在 $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0151] 实施例5

实验设计

所有用于动物治疗的实验规程均得到 University of Minnesota Institutional Animal Care and Use Committee批准。接受腹膜内(ip)盐水或T3注射的无特定病原(SPF)成体雄性Sprague Dawley大鼠(250 g–300 g)于室温在不限量地获得食物和水的情况下在室中暴露于正常气压的高氧($FI_{O_2} > 95\%$, 5 LPM)达48或60小时,以诱导肺炎症和损伤。室内空气对照大鼠被保持在大学动物安置设施中。将大鼠于表11中总结的两种规程中详述的的剂量和时间点用T3或盐水腹膜内注射。高氧暴露结束时,通过腹膜内戊巴比妥注射将大鼠处死,并收获肺;分配右叶用于组织病理学,测量肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性和湿与干重量比。左叶进行支气管肺泡灌洗(BAL),以确定BAL蛋白浓度和分类细胞计数。

[0152] 表11. 实验规程

	0 小时	12 小时	24 小时	36 小时	48 小时	60 小时
规程 1						
对照 (盐水)	ip	ip	ip	ip	ip	结束
T3 (12.5 $\mu\text{g/kg}$)	ip	ip	ip	ip	ip	结束
规程 2						
对照 (盐水)	ip		ip		结束	
T3 (15.0 $\mu\text{g/kg}$)	ip		ip		结束	

湿-干肺重量比

右肺的一部分用PBS短暂冲洗,吸干,且然后称重以获得“湿”重量。然后将肺在80℃的烤箱中干燥7天以获得“干”重量。

[0153] 肺灌洗分析

左肺的支气管肺泡灌洗(BAL)使用以前描述的方法(Pace等人, *Exp Lung Res* 35: 380–398, 2009)的改良进行。简言之,在分析灌洗液之前,将4 ml冰冷的1x PBS(pH 7.4)滴注入左肺,抽出,并再滴注连续两次。将回收的BAL液以1500 rpm离心10分钟以去除细胞和碎片。将细胞沉淀重悬浮于1 ml 1x PBS(pH 7.4)中,并使用血细胞计数器计数总细胞数。使用Hema3染色试剂盒(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)对BAL cytopspin制剂进行染色,以鉴定具核细胞。使用标准BCA测定(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)在BAL液的上清液上测定蛋白浓度。

[0154] 髓过氧化物酶(MPO)测定

为了定量肺中的嗜中性粒细胞活性,如以前所述(Abraham等人, *J Immunol* 165: 2950–2954, 2000)测定MPO活性。将没有在先灌洗的肺组织在液氮中冷冻,称重,并贮藏于–86℃。将肺在1.5 ml 20 mM磷酸钾,pH 7.4中匀浆30秒,并于4℃以40,000 $\times g$ 离心30分钟。将沉淀重悬浮于含有0.5%十六烷基三甲基溴化铵的1.5 ml 50 mM磷酸钾,pH 6.0中,超声处理90秒,于60℃温育2小时,并于4℃以14,000 rpm离心30分钟。测定上清液的相对于肺重量校正的过氧化物酶活性。MPO表示为每克肺组织的活性。

[0155] 组织化学

取出肺组织,并于20 cm水压在4%低聚甲醛中膨胀固定,石蜡包埋,作为5微米的切片切割,并封固在聚-L-赖氨酸载玻片上。将切片在二甲苯中脱蜡,通过在甲醇中的等级醇系列再水化,并在柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中放置于98℃水浴中达30分钟用于抗原回收。用PBS中的0.3%过氧化氢猝灭后,将切片在正常血清中各自与抗生物素蛋白/生物素封闭试剂盒(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)温育30分钟和15分钟。与髓过氧化物酶Ab-1(Thermo Fisher Scientific, Inc., Fremont, CA)于4℃过夜温育后,生物素化的山羊抗兔IgG(1:500)和RTU链霉抗生物素蛋白(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)序贯应用30分钟,并将3,3'-二氨基联苯胺用作过氧化物酶底物。将切片用苏木精复染。图像分析和摄影使用Leica Leitz DMRB显微镜。

[0156] 血清T3测量

在高氧60小时结束时收集血液样品,并于4℃以13,000 rpm离心30分钟。将上清液贮藏于-20℃。血清总T3浓度用商业RIA试剂盒(Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA)如以前所述的(Bastian等人, *Endocrinology* 151:4055-4065, 2010)进行测量。

[0157] 统计分析

值表示为最少三个实验的平均值±SD。通过ANOVA和事后成对比较分析涉及三个或更多个组的比较。平均值之间的差异在 $p < 0.05$ 被认为是显著的,对于比较数进行了调整。

[0158] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物以及可通过电子方式获得的材料(包括,例如,在例如GenBank和RefSeq中的核苷酸序列提交,以及在例如SwissProt、PIR、PRF、PDB中的氨基酸序列提交,以及在GenBank和RefSeq中从注释的编码区的翻译)的完整公开内容均整体引入作为参考。万一在本申请的公开内容与一种或多种引入本文作为参考的任何文件的公开内容之间存在任何不一致,应以本申请的公开内容为准。仅为了清楚理解,已给出了前面的详述和实施例。不能从其中理解不必要的限制。由于对于本领域技术人员显而易见的变化将包括在由权利要求所限定的本发明之内,所以本发明不限于所示出和描述的确切细节。

[0159] 除非另外指出,否则在本说明书和权利要求中使用的表示组分的量、分子量等的所有数字均要理解为在所有情况下均被术语“约”修饰。因此,除非另有相反指示,否则说明书和权利要求中陈述的数值参数是近似值,其可以取决于本发明试图获得的所期望的性质而变化。起码,且不试图限制对于权利要求的范围的等同原则,每个数值参数应至少根据所报道的有效数字的数目并通过应用普通的四舍五入技术来解释。

[0160] 尽管陈述本发明的宽范围的数值范围和参数是近似值,但是在具体实施例中陈述的数值被尽可能精确地报道。然而,所有数值固有地都含有必定由其各自的测试测量结果中发现的标准差产生的范围。

[0161] 除非另有说明,否则所有标题都是为了读者的方便,且不应将其用于限制标题后面的文字的含义。

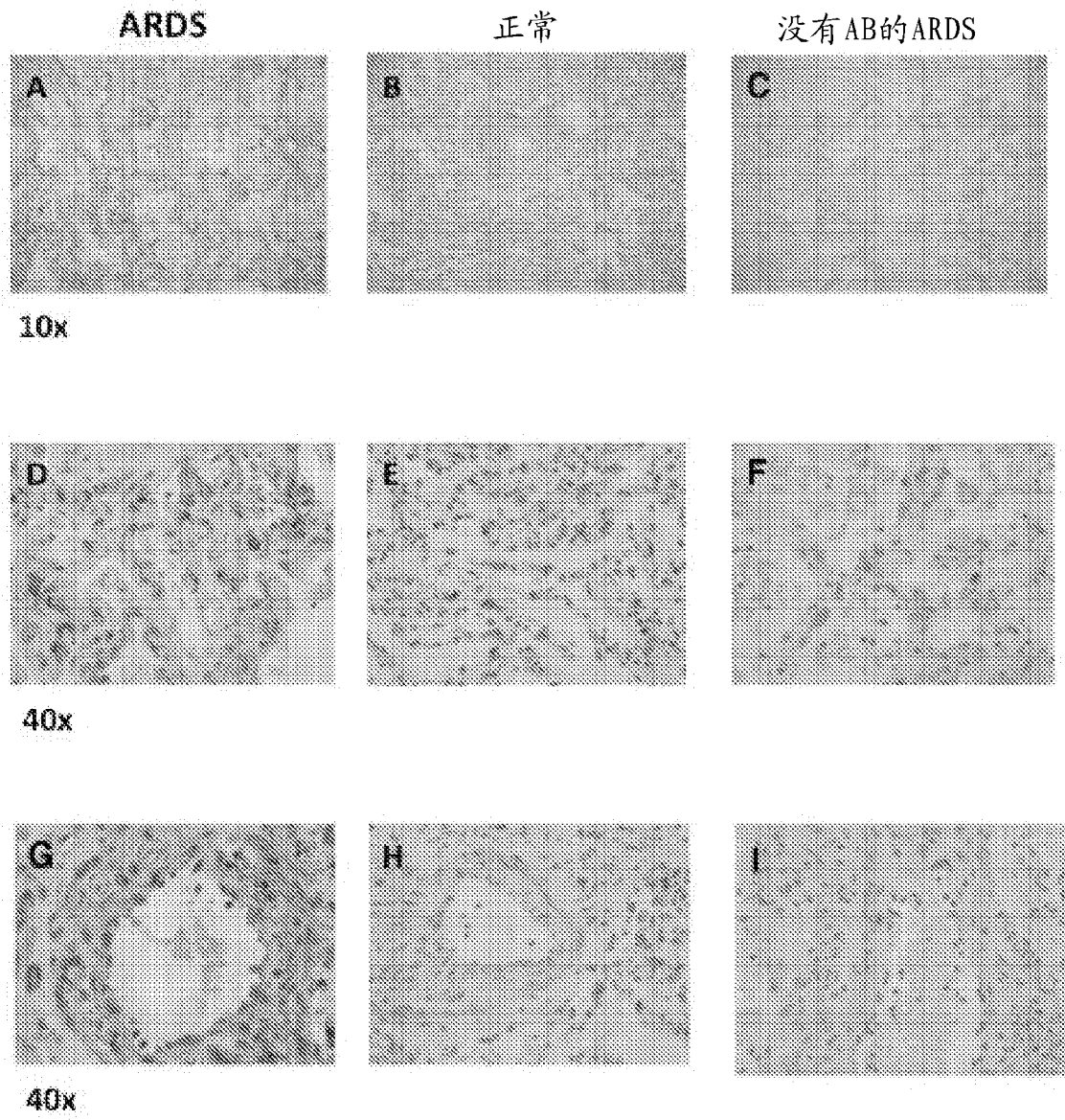
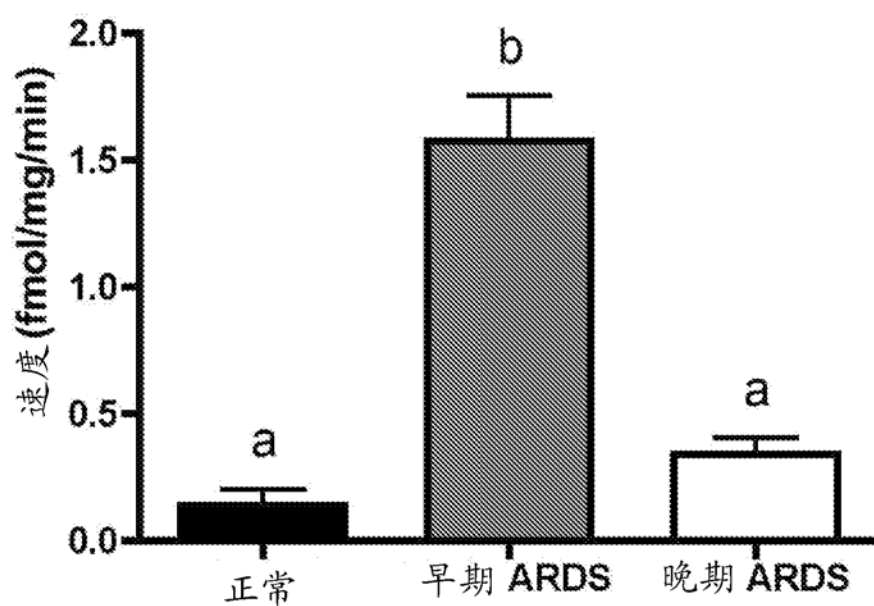


图 1

A



B

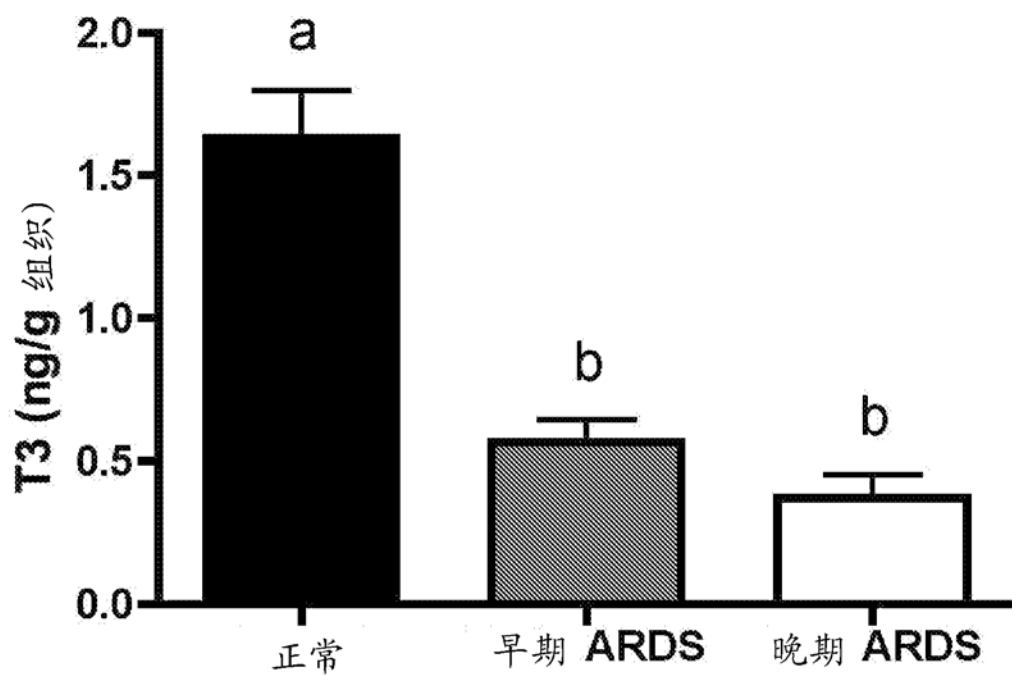


图 2

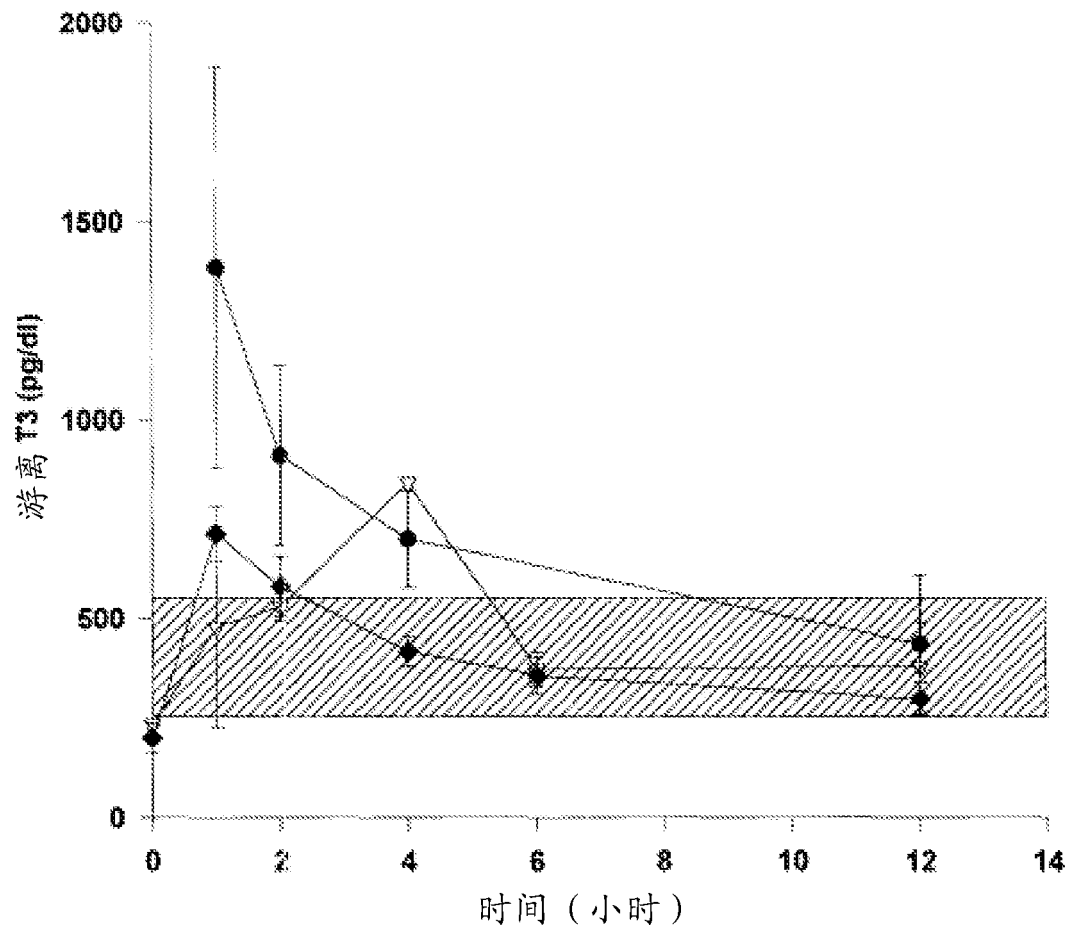


图 3

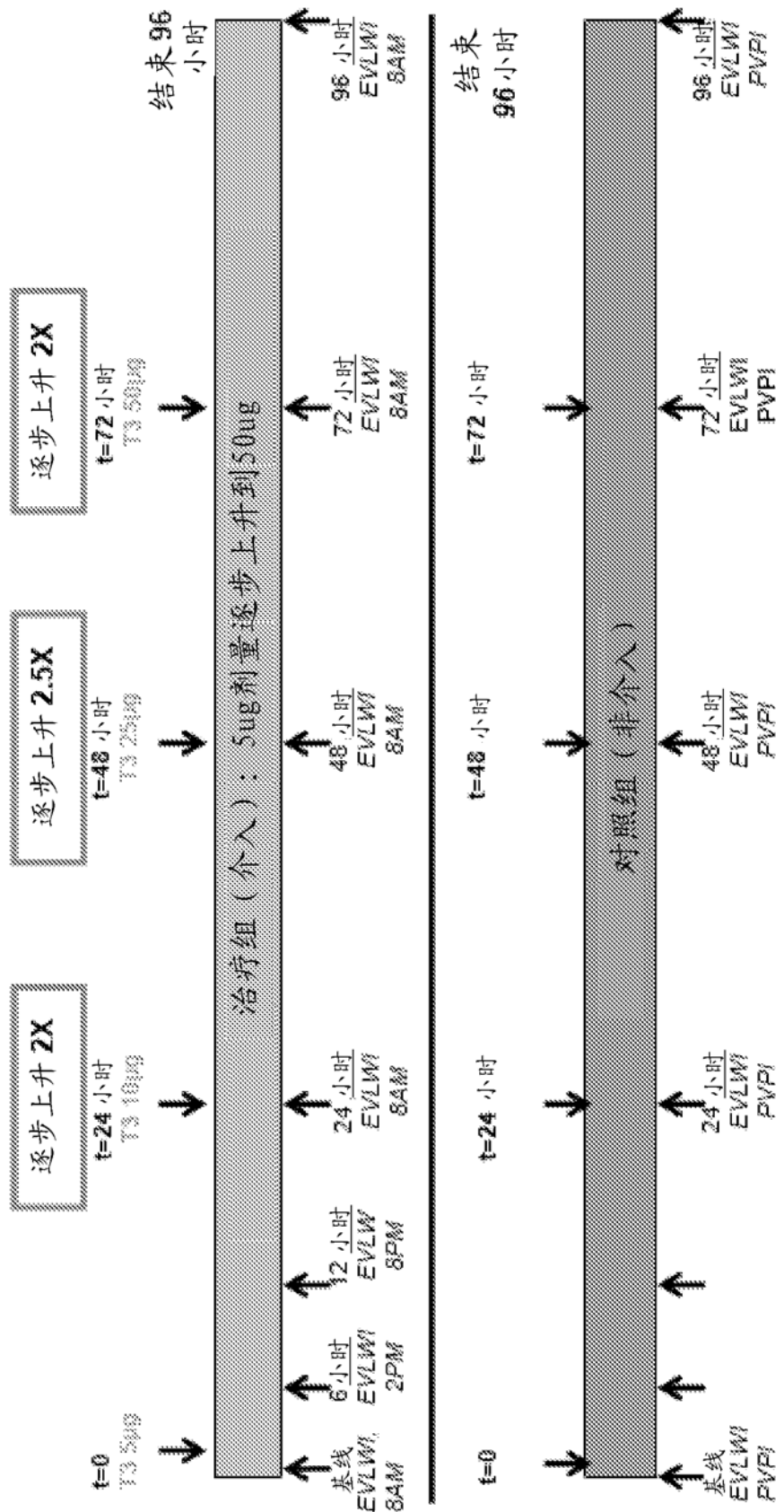


图 4

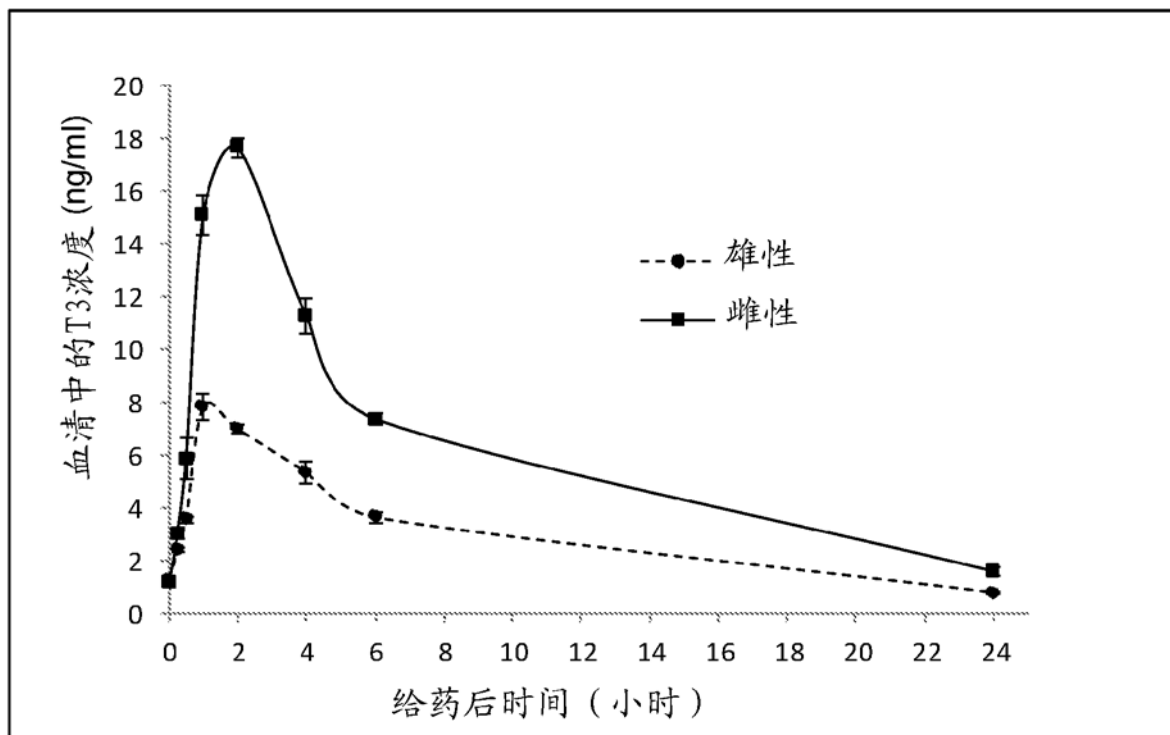


图 5

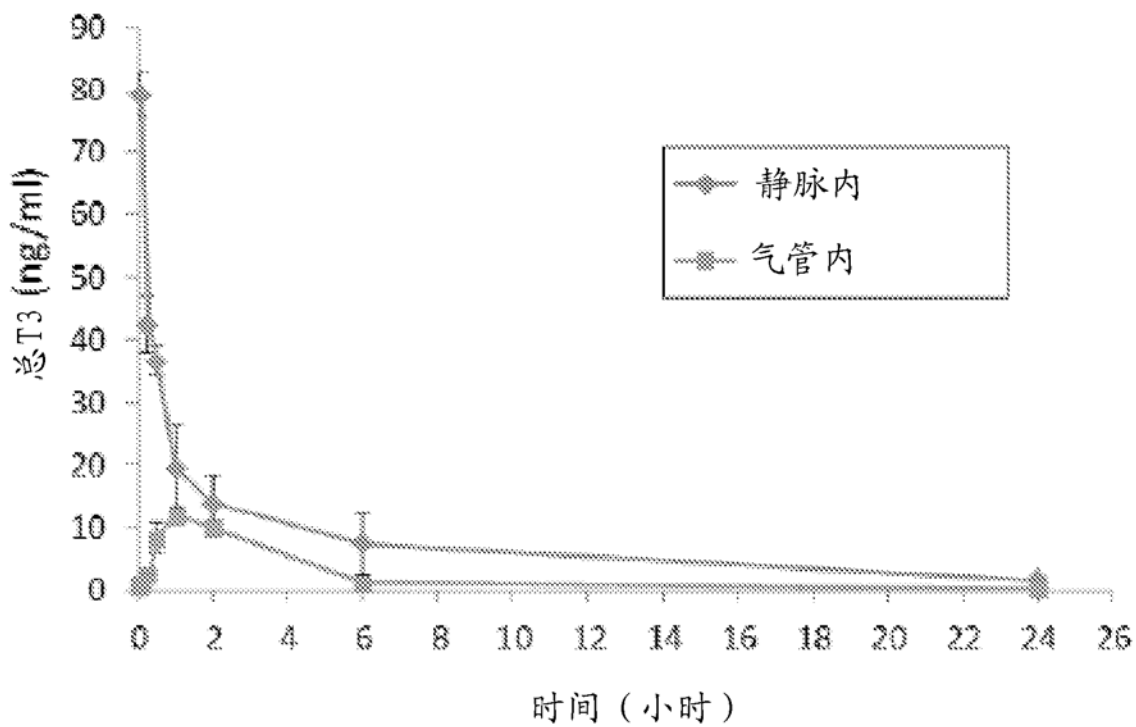


图 6

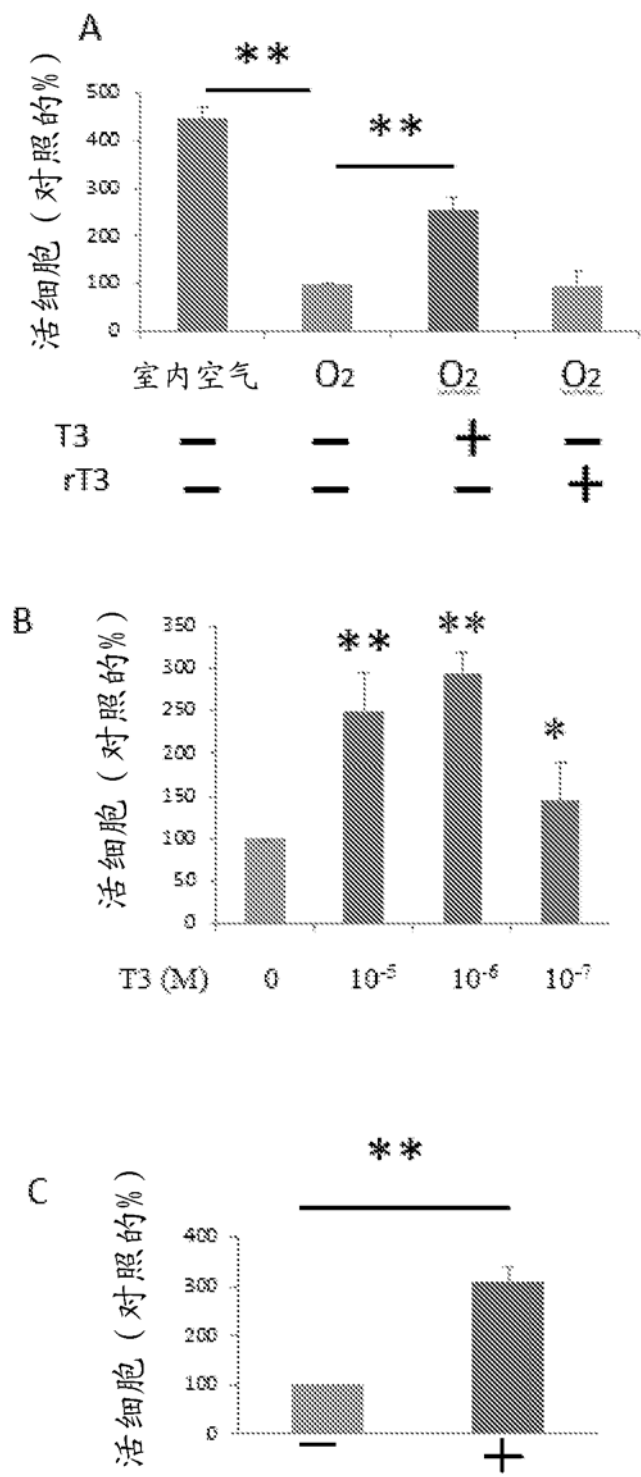


图 7

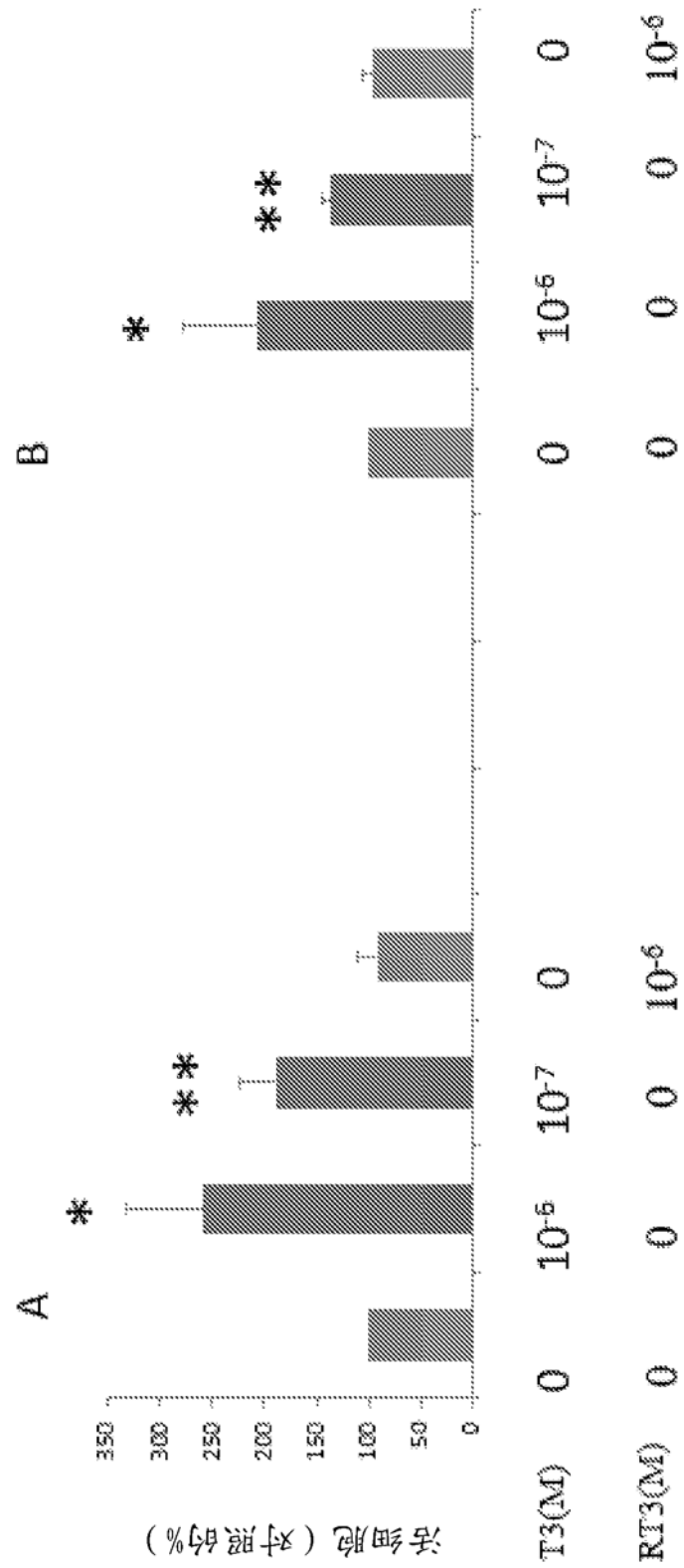


图 8

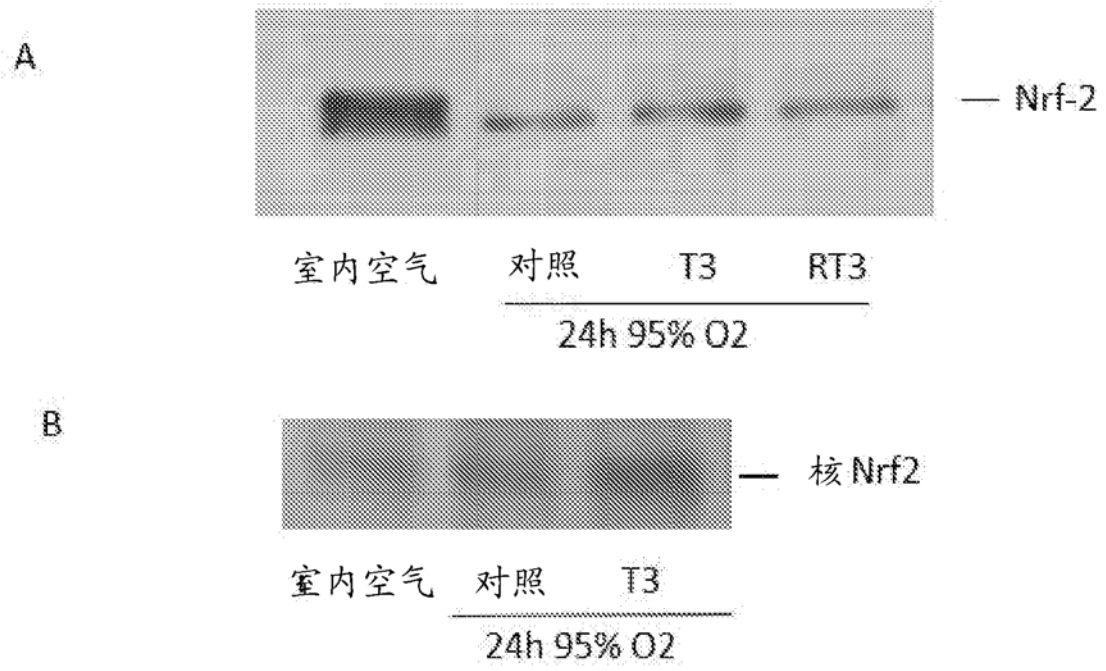


图 9

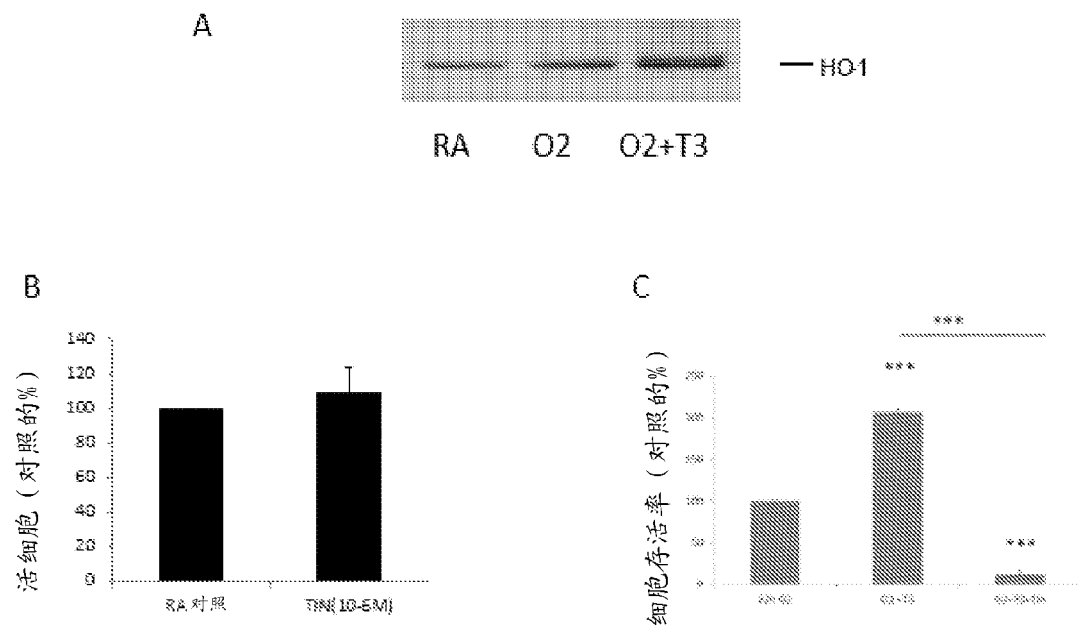


图 10

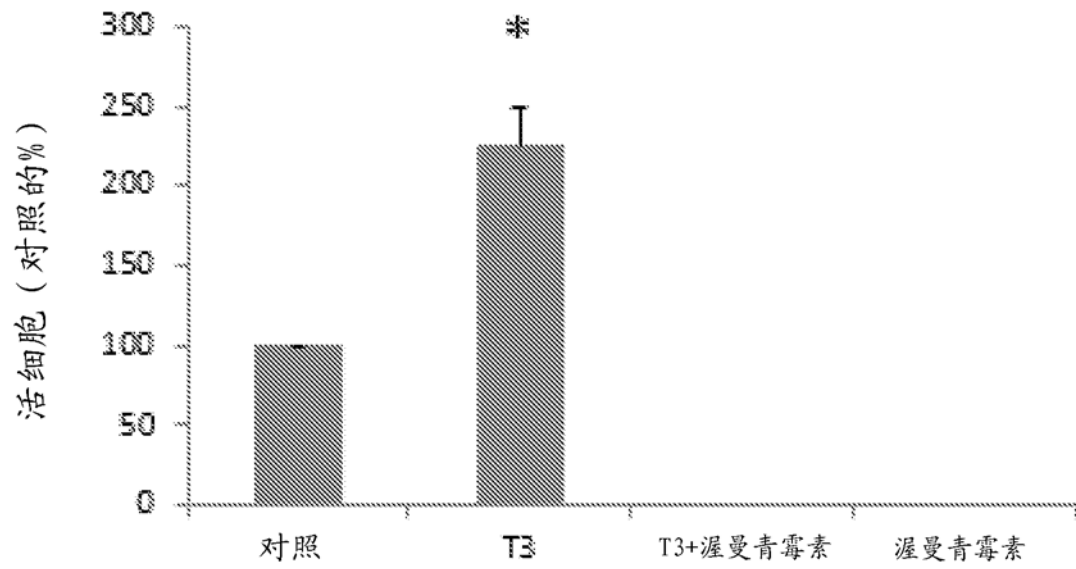


图 11

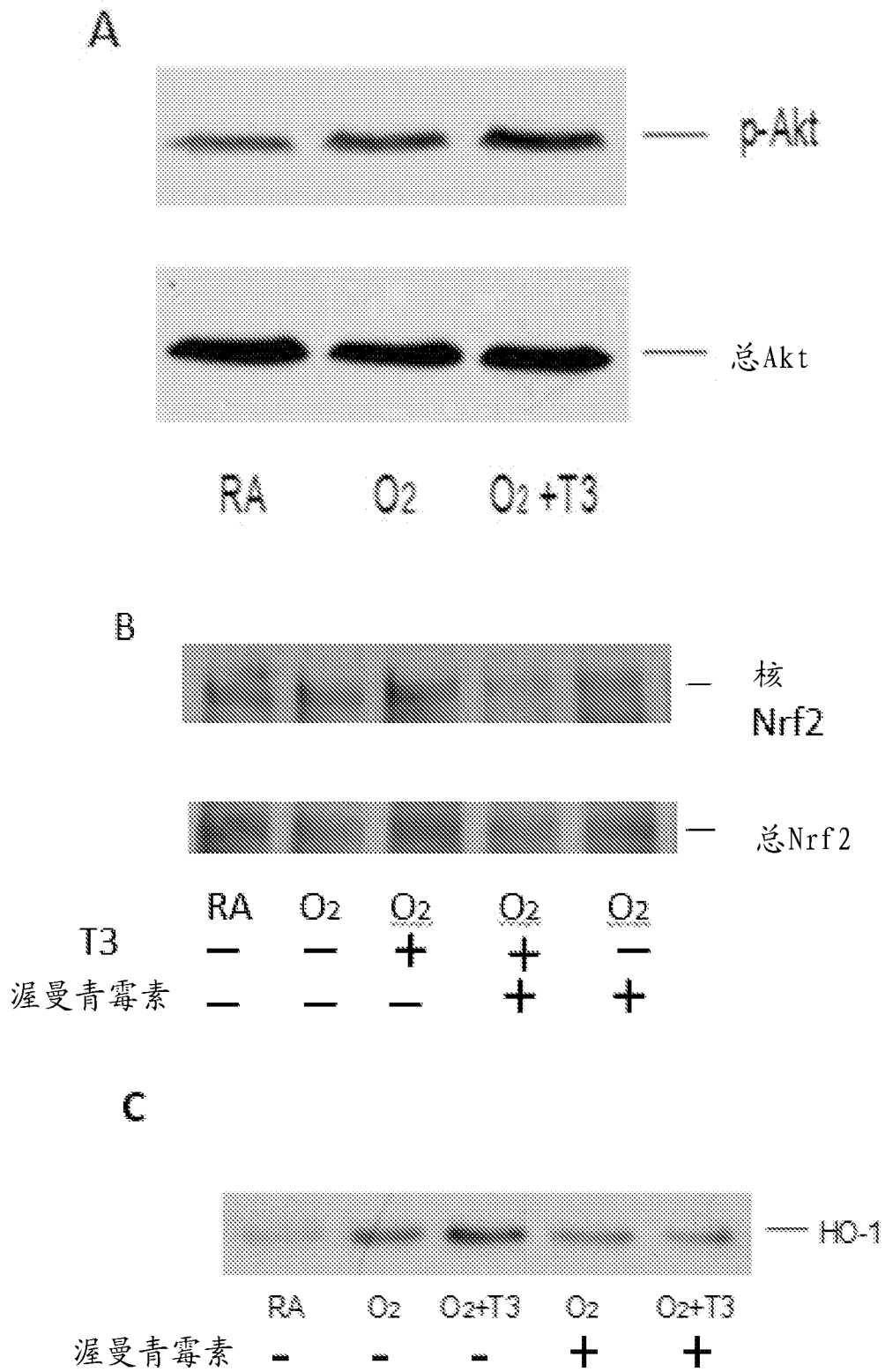


图 12

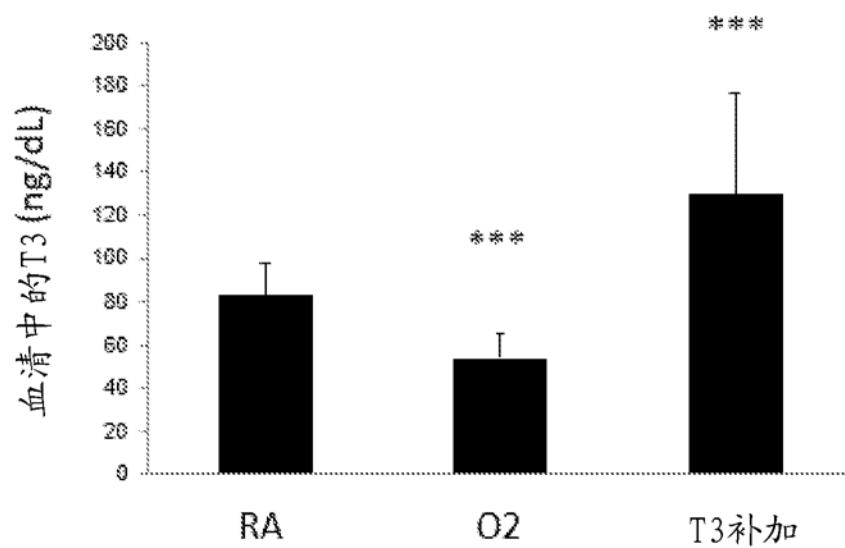


图 13

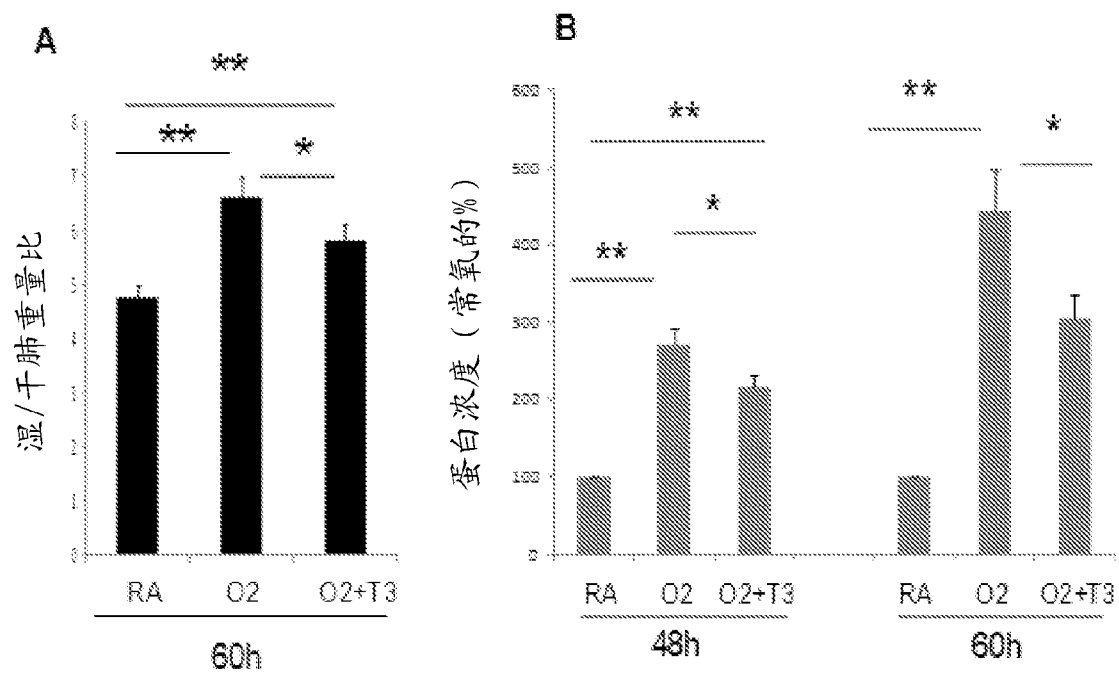


图 14

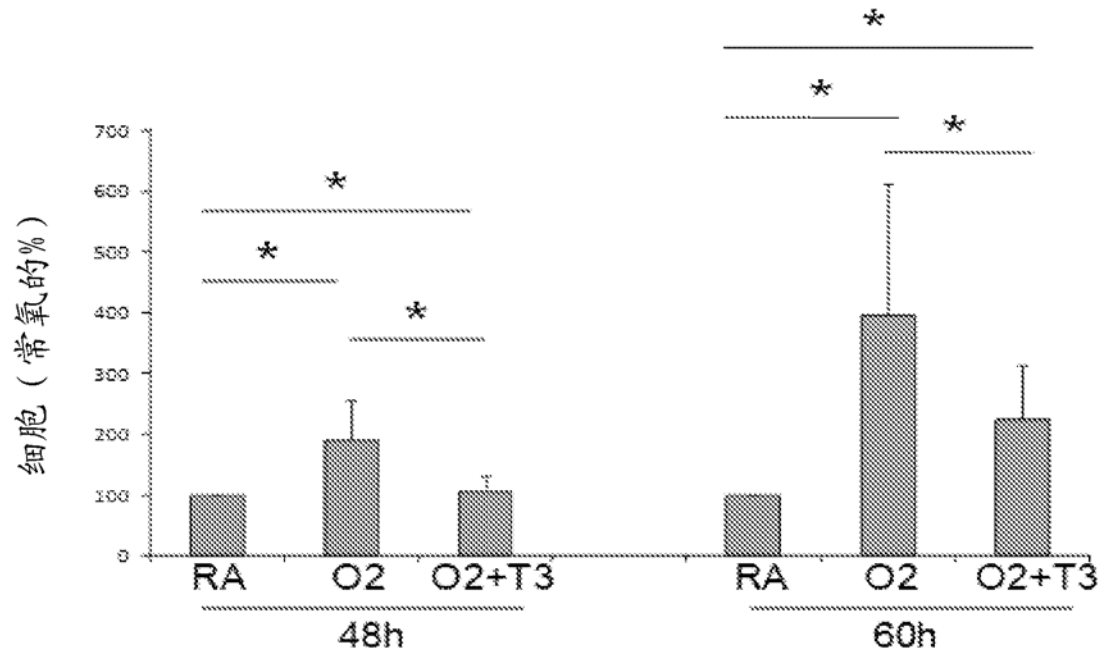


图 15

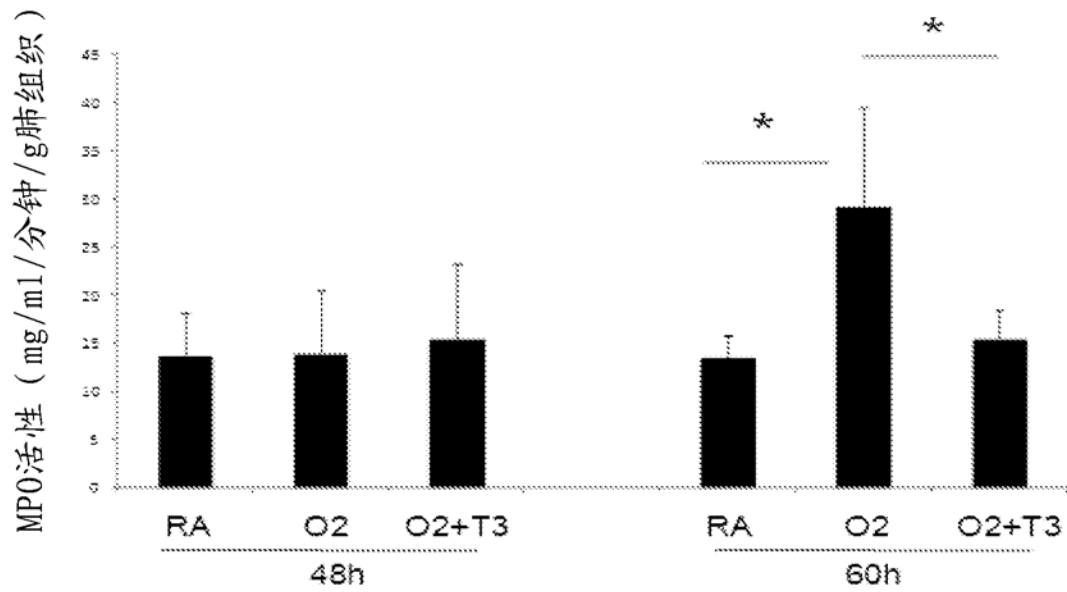


图 16

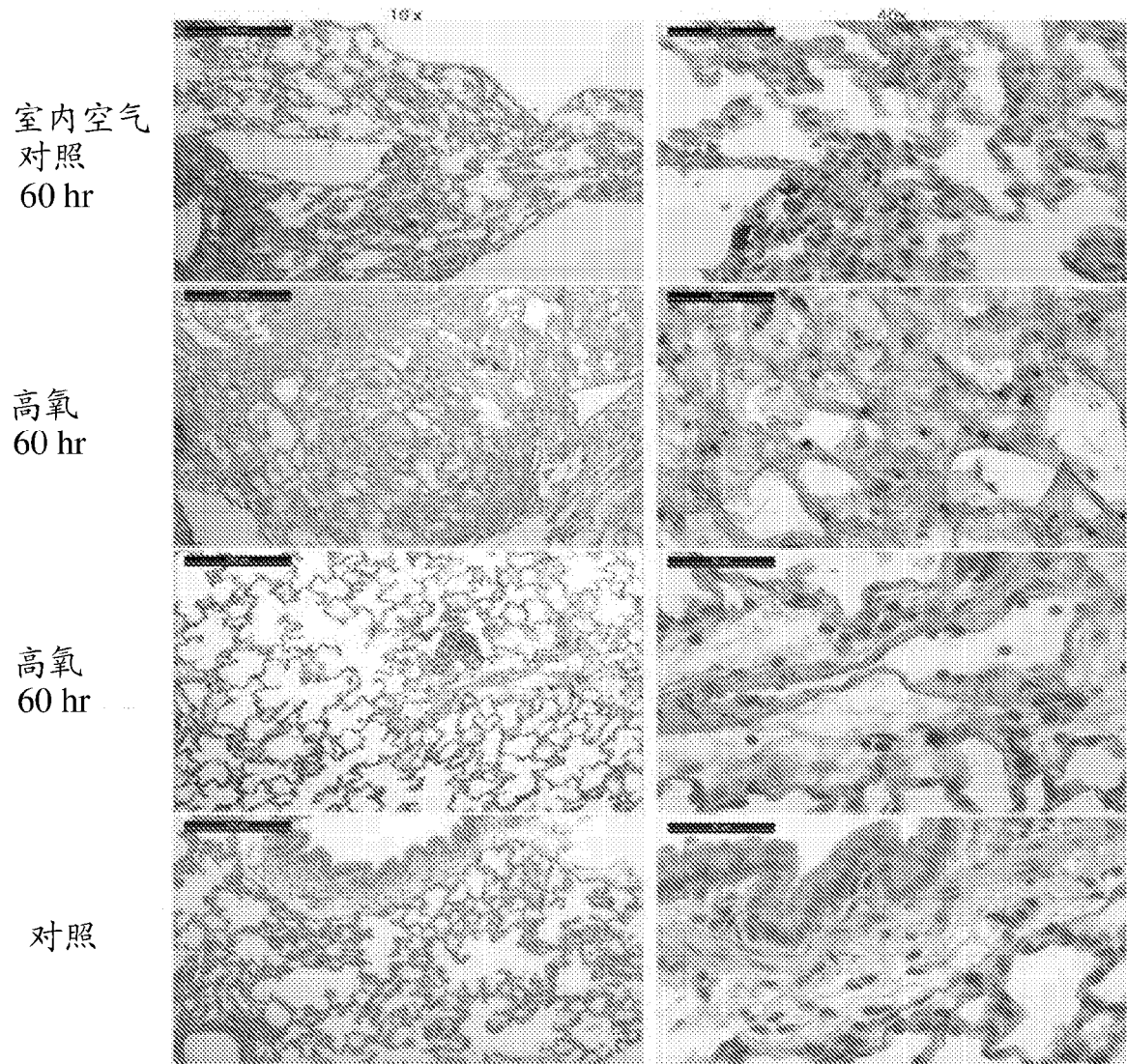


图 17

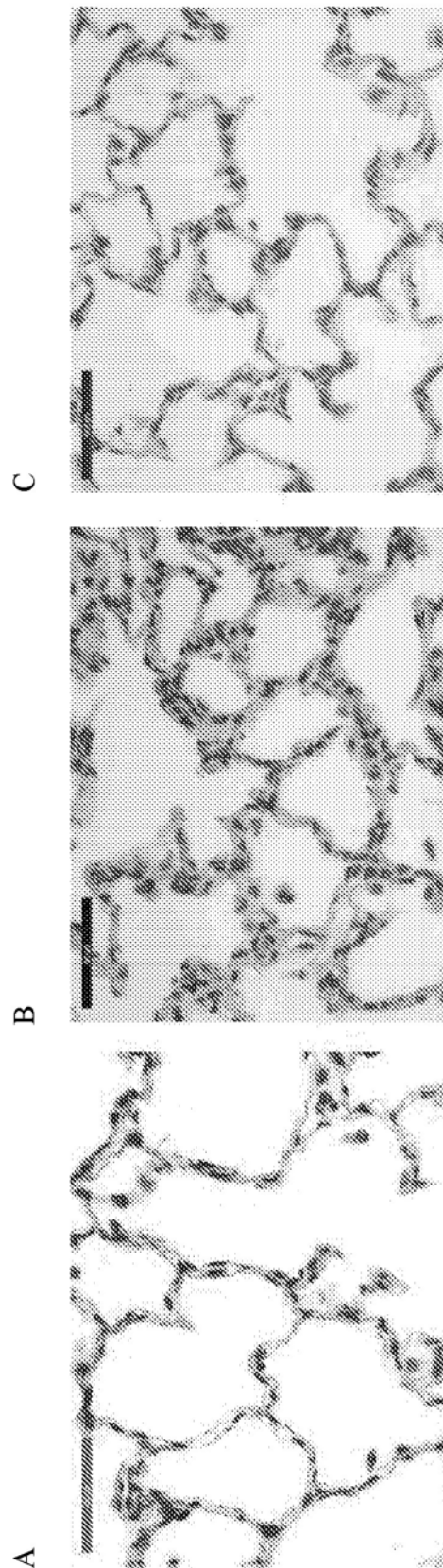


图 18