(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102257130 B
(45)授权公告日 2016.07.06

(21)申请号 200980151710.1
(22)申请日 2009.10.22
(30)优先权数据
61/107,480 2008.10.22 US
61/107,453 2008.10.22 US
12/258,210 2008.10.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.06.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/061710 2009.10.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/048425 EN 2010.04.29
(73)专利权人 利发利希奥公司
地址 美国华盛顿州
(72)发明人 理查德·L·华森 安东尼·B·伍德 格雷戈里·J·阿咸宾
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 王旭
(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)
C12N 5/02(2006.01)
审查员 高宇

权利要求书3页 说明书40页 附图9页

(54)发明名称

用于治疗胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的病症的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的方法，包括施用动电学改变的水性流体，该水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水性溶液，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于大约100纳米的平均直径，并且以足以治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的量稳定地配置在所述离子水性流体中。优选的是，所述电荷稳定的含氧纳米结构以足以提供调整细胞膜电位和/或电导率的量稳定地配置在所述流体中。包括调整或下调TSLP表达和/或活性的某些方面具有用于治疗本文公开的TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症(例如，免疫系统的紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病和食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、IgE介导的紊乱和鼻结膜炎)的效用。

CN 102257130 B

1.动电学改变的水性流体在制备用于治疗TSLP介导的或TSLPR介导的免疫系统的疾病或病症的药物中的用途，所述水性流体包含电荷稳定的含氧纳米气泡的氧合离子水性溶液，所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于100纳米的平均直径，并且稳定地配置在所述离子水性流体中，其中所述TSLP介导的或TSLPR介导的免疫系统的疾病或病症包括变应性炎症和炎性关节炎中的至少一种。

2.根据权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡以在所述流体与活细胞相接触时足以提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的调整的量稳定地配置在所述离子水性流体中。

3.根据权利要求1所述的用途，其中所述氧合流体中作为所述电荷稳定的含氧纳米气泡溶解的氧分子的百分比是大于0.01％的百分比。

4.根据权利要求3所述的用途，其中总溶解氧以所述电荷稳定的含氧纳米气泡存在。

5.根据权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于90nm的平均直径。

6.根据权利要求1所述的用途，其中所述离子水溶液包括盐水溶液。

7.根据权利要求1所述的用途，其中所述流体是超氧合的。

8.根据权利要求1所述的用途，其中所述流体包括溶剂化电子的形式。

9.根据权利要求1所述的用途，其中所述动电学改变的水性流体暴露于动力诱导的局部动电学效应。

10.根据权利要求9所述的用途，其中暴露于所述局部动电学效应包括暴露于电压脉冲和电流脉冲中的至少一种。

11.根据权利要求9所述的用途，其中所述流体暴露于流体动力诱导的局部动电学效应包括所述流体暴露于用以产生所述流体的装置的诱导动电学效应的结构部件。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中所述变应性炎症包括变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、IgE介导的紊乱、鼻结膜炎和食物变态反应中的至少一种。

13.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中所述炎性关节炎包括类风湿关节炎和银屑病中的至少一种。

14.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，还包括联合疗法，其中至少一种另外的治疗剂被施用于患者。

15.根据权利要求14所述的用途，其中所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：短效β_2-激动剂、长效β2-激动剂、抗胆碱能药、皮质类固醇、全身性皮质类固醇、肥大细胞稳定剂、白三烯调节剂、甲基黄嘌呤及其组合。

16.根据权利要求14所述的用途，其中所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：由β_2-激动剂和抗胆碱能药组成的支气管扩张剂；皮质类固醇；白三烯调节剂；肥大细胞稳定剂；甲基黄嘌呤；组合药物；抗组胺剂；免疫系统调节药物；环孢霉素；硫唑嘌呤；吗替麦考酚酯；以及它们的组合。

17.根据权利要求16所述的用途，其中所述β_2-激动剂选自由沙丁胺醇、左旋沙丁胺醇、吡布特罗、阿福特罗、福莫特罗和沙美特罗组成的组。

18.根据权利要求16所述的用途，其中所述抗胆碱能药选自由异丙托铵和噻托铵组成

的组。

19.根据权利要求16所述的用途，其中所述皮质类固醇选自由倍氯米松、布地奈德、氟尼缩松、氟替卡松、莫米松、曲安西龙、甲泼尼龙、泼尼松龙和泼尼松组成的组。

20.根据权利要求16所述的用途，其中所述白三烯调节剂选自由孟鲁司特、扎鲁司特和齐留通组成的组。

21.根据权利要求16所述的用途，其中所述肥大细胞稳定剂选自由色甘酸和奈多罗米组成的组。

22.根据权利要求16所述的用途，其中所述甲基黄嘌呤是茶碱。

23.根据权利要求16所述的用途，其中所述组合药物选自由异丙托铵和沙丁胺醇、氟替卡松和沙美特罗、布地奈德和福莫特罗组成的组。

24.根据权利要求16所述的用途，其中所述抗组胺剂选自由羟嗪、苯海拉明、氯雷他定、西替利嗪和氢化可的松组成的组。

25.根据权利要求16所述的用途，其中所述免疫系统调节药物选自由他克莫司和吡美莫司组成的组。

26.根据权利要求14所述的用途，其中所述至少一种另外的治疗剂为TSLP和/或TSLPR拮抗剂。

27.根据权利要求26所述的用途，其中所述TSLP和/或TSLPR拮抗剂选自由下列各项组成的组：对TSLP与TSLP受体特异的中和抗体、可溶性TSLP受体分子和TSLP受体融合蛋白。

28.根据权利要求27所述的用途，其中所述TSLP和/或TSLPR拮抗剂是TSLPR-免疫球蛋白Fc分子或编码超过一个受体链的组分的多肽。

29.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括改变细胞膜结构或功能中的至少一种，所述改变细胞膜结构或功能包括改变膜相关蛋白或构成成分的构象、配体结合活性和催化活性中的至少一种。

30.根据权利要求29所述的用途，其中所述膜相关蛋白包括选自由以下各项组成的组的至少一种：受体、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞黏附蛋白、整联蛋白。

31.根据权利要求30所述的用途，其中所述受体包括跨膜受体。

32.根据权利要求31所述的用途，其中所述跨膜受体包括G蛋白偶联受体(GPCR)。

33.根据权利要求32所述的用途，其中所述G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白α亚基相互作用。

34.根据权利要求33所述的用途，其中所述G蛋白α亚基包括选自由以下各项组成的组的至少一种：$G\alpha_s$、$G\alpha_i$、$G\alpha_q$和$G\alpha_{12}$。

35.根据权利要求34所述的用途，其中所述至少一种G蛋白α亚基是$G\alpha_q$。

36.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整全细胞电导。

37.根据权利要求36所述的用途，其中调整全细胞电导包括调整所述全细胞电导的线性和非线性电压依赖性贡献中的至少一种。

38.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整钙依赖性细胞信息传递途径或系统。

39.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包

括调整磷脂酶C活性。

40.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整腺苷酸环化酶(AC)活性。

41.根据权利要求2所述的用途，其中调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整与免疫系统的疾病或紊乱有关的细胞内信号转导，其中所述免疫系统的疾病或紊乱包括变应性炎症，变应性气道炎症，DC介导的炎性Th2反应，特应性皮炎，特应性湿疹，IgE介导的紊乱，鼻结膜炎，食物变态反应，炎性关节炎，类风湿性关节炎，或银屑病。

42.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，包括将所述动电学改变的水性流体施用于细胞网络或层，并且还包括调整其中的细胞间连接。

43.根据权利要求42所述的用途，其中所述细胞间连接包括选自由紧密连接、间隙连接、黏附区和桥粒组成的组的至少一种。

44.根据权利要求42所述的用途，其中所述细胞网络或层包括选自由肺上皮细胞、支气管上皮细胞和肠上皮细胞组成的组的至少一种。

45.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中所述动电学改变的水性流体是氧合的，并且其中所述流体中的氧在大气压下以至少8ppm的量存在。

46.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中所述动电学改变的水性流体包括溶剂化电子、和动电学改性或荷电的氧物种中的至少一种。

47.根据权利要求46所述的用途，其中所述溶剂化电子或者动电学改性或荷电的氧物种的形式以至少0.01ppm的量存在。

48.根据权利要求46所述的用途，其中所述动电学改变的水性流体包括由分子氧稳定的溶剂化电子的形式。

49.根据权利要求2所述的用途，其中所述调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的能力在封闭的气密容器中持续至少2个月的时间。

50.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中在所述动电学改变的水性流体的电荷稳定的含氧纳米气泡中存在的氧的量为在大气压下至少8ppm。

51.根据权利要求1-11中任一项所述的用途，其中治疗包括通过局部、吸入、鼻内和静脉内中的至少一种方式施用。

52.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于50纳米的平均直径。

53.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于40纳米的平均直径。

54.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于30纳米的平均直径。

55.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于20纳米的平均直径。

56.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于10纳米的平均直径。

57.权利要求1所述的用途，其中所述电荷稳定的含氧纳米气泡具有小于5纳米的平均直径。

用于治疗胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的病症的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明总体而言涉及胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)和TSLP介导的病症，更具体而言，本发明涉及TSLP和TSLP受体介导的病症(例如，免疫系统的紊乱、变应性炎症(allergic inflammation)、变应性气道炎症(allergic airway inflammation)、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、变应性哮喘(allergic asthma)、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病和食物变态反应(food allergies)、炎性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、IgE介导的紊乱和鼻结膜炎)。特别优选的方面涉及通过施用本文所公开的包含至少一种动电学产生的流体(包括富含气体(例如富含氧)的动电学产生的流体)的治疗组合物，以及在进一步联合疗法方面中通过将所述动电学流体与至少一种另外的治疗剂联合施用，来调整(例如治疗)TSLP和TSLP受体介导的病症。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求均于2008年10月22日提交的美国临时专利申请系列号61/107,480和61/107,453、以及2008年10月24日提交的美国实用新型专利申请系列号12/258,210的优先权，这两份申请文件以引用方式全文并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)是IL-7样细胞因子，其促发树状细胞介导的Th2-型炎性反应，并被认为是变应性炎症的总开关。TSLP是B细胞和T细胞发育和成熟的必要生长因子。特别是，鼠TSLP支持B淋巴细胞增殖并且是B细胞增殖所需要的。鼠TSLP在控制T细胞受体-γ(TCRγ)基因座重排中起重要作用并且对胸腺细胞和成熟T细胞具有明显刺激作用。参见例如Friend等，Exp.Hematol.，22:321-328，1994；Ray等，Eur.J.Immunol.，26:10-16，1996；Candeias等，Immunology Letters，57:9-14，1997。

[0006] TSLP具有与IL-7类似的细胞因子活性例如，TSLP可以取代IL-7刺激B细胞增殖反应(Friend等，同上)。尽管TSLP和IL-7介导类似的对靶细胞的作用，但是它们似乎具有不同的信号传导途径并且可能具有不同的生物反应。例如，尽管TSLP调整STAT5的活性，但是其未能活化任何Janus家族酪氨酸激酶成员(Levin等，J.Immunol.，162:677-683，1999)。

[0007] TSLP对树突细胞和TNF生成的作用在人TSLP和人TSLP受体在2001年被克隆后，发现人TSLP有效活化不成熟的CD11c+髓样树状细胞(mDC)(参见例如，Reche等，J.Immunol.，167:336-343，2001和Soumelis等，Nat.Immunol.，3:673-680，2002)。Th2细胞一般在免疫学教科书和文献中被定义产生IL-4、IL-5、IL-13和IL-10的CD4+T细胞。而Th1细胞(例如CD4+T细胞)产生IFN-γ和有时产生TNF。当TSLP-DC用于在体外刺激未致敏的同种异体CD4+T细胞时，Th2细胞的独特型被诱导，其产生经典的Th2细胞因子IL-4、IL-5和IL-13和大量TNF，但很少或没有IL-10或干扰素-γ(Reche等，同上)(还参见例如，Soumelis等，Nat.Immunol.，3:673-680，2002)。TNF通常不被认为是Th2细胞因子。然而，TNF在哮喘气道中是重要的，并且与增加的TNF分泌关联的基因型与增加的哮喘风险相关。参见Shah等，

Clin.Exp.Allergy.,25:1038-1044,1995以及Moffatt,M.F.和Cookson,W.O.,Hum.Mol.Genet.,6:551-554,1997。

[0008] TSLP诱导人mDC以在mRNA和蛋白质两个水平上表达TNF超家族蛋白OX40L(Ito等,J.Exp.Med.,202:1213-1223)。TSLP-DC对OX40L的表达对于炎性Th2细胞的加工是重要的。因此,TSLP活化的DC通过上调OX40L而不诱导产生Th1极化的细胞因子而产生Th2许可的微环境。同上。

[0009] TSLP表达、变应原特异性反应和哮喘早期研究已经显示TSLPmRNA由人原代皮肤角质形成细胞、支气管上皮细胞、平滑肌细胞和肺成纤维细胞高度表达(Soumelis等,Nat.Immunol.,3:673-680,2002)。因为TSLP主要表达在表皮顶层的角质形成细胞中,这表明TSLP生成是完全分化的角质形成细胞的特征。特应性皮炎患者中TSLP的表达与朗格汉斯细胞迁移和原位活化相关,这表明TSLP可以直接促成这些细胞的活化,随后这些细胞迁移入引流淋巴结并引发变应原特异性反应。同上。在更近期的研究中,通过原位杂交显示,TSLP表达在哮喘气道中增加并与Th2吸引趋化因子的表达和疾病严重度相关,提供了TSLP与哮喘之间的关联(Ying等,J.Immunol.,174:8183-8190,2005)。

[0010] TSLP受体(TSLPR)和变应性哮喘TSLP受体(TSLPR)是大约50kDa的蛋白并且与共用γ-链具有显著相似性。TSLPR是新的1型细胞因子受体,其与IL-7Rα(CD127)组合,构成例如Pandey等,Nat.Immunol.,1:59-64,2000描述的TSLP受体复合物。TSLPR在其羧基末端附近具有酪氨酸残基,其可以与磷酸化STAT5缔合并在结合TSLP时介导多种生物功能(Isaksen等,J.Immunol.,168:3288-3294,2002)。

[0011] 人TSLPR由单核细胞和CD11c+树状细胞表达,并且TSLP结合诱导吸引T_H2细胞的趋化因子CCL17和CCL22的表达。而且,如上所述,TSLPR诱导的树状细胞活化间接导致T_H2细胞因子IL-4、IL-5和IL-13的分泌增加,这可以能是调节CD4+T细胞体内平衡所必需的。在小鼠中,TSLPR的缺乏对淋巴细胞数目没有影响。然而,TSLPR和共用γ-链的缺乏导致与仅缺乏公共γ-链的小鼠相比更少的淋巴细胞。参见Reche等,J.Immunol.,167:336-343,2001和Soumelis等,Nat.Immunol.,3:673-680,2002。

[0012] 研究发现,TSLP和TSLPR在小鼠中引发变应性疾病中起重要作用。在一项研究中,证明了被改造为在皮肤中过表达TSLP的小鼠发生特应性皮炎,特征为含有炎性浸润的湿疹性皮肤损害、循环Th2细胞的急剧增加和血清IgE升高(Yoo等,J.Exp.Med.,202:541-549,2005)。研究表明TSLP可以直接活化小鼠中的DC。在Li等进行的另一项研究中,该研究组证实在皮肤中过表达TSLP的转基因小鼠发生特应性皮炎,这加强了TSLP与发生特应性皮炎之间的关联。

[0013] 另一组研究证明,TSLP是在小鼠体内引发变应性气道炎症所需要的。在一项研究中,Zhou等证明了TSLP转基因的肺特异性表达诱导了变应性气道炎症(哮喘),其特征为大量白细胞浸润(包括Th2细胞)、杯状细胞增生和上皮下纤维化,以及增加的血清IgE水平(Zhou等,Nat.Immunol.,6:1047-1053,2005)。然而,相反,缺乏TSLPR的小鼠未能响应吸入的抗原而发生哮喘(Zhou等,同上,和Al-Shami等,J.Exp.Med.,202:829-839,2005)。因此,这些研究一起证明了TSLP是引发小鼠变应性气道炎症所需要的。

[0014] 另外,在Yong-Jun等进行的研究中,证明了上皮细胞衍生的TSLP在人中促发DC介导的炎性Th2反应,这表明TSLP是上皮细胞-DC界面的变应性炎症的总开关(Yong-Jun等,

J.Exp.Med.,203:269-273,2006)。

[0015] 在最近研究中显示,通过抑制TSLPR调整DC功能减轻了小鼠中的严重度(Liyun Shi等,Clin.Immunol.,129:202-210,2008)。在另一组研究中,证明TSLPR不仅在DC中表达,而且在巨噬细胞、肥大细胞和CD4+T细胞上表达(Rochman等,J.Immunol.,178:6720-6724,2007,和Omori M.和Ziegler S.,J.Immunol.,178:1396-1404,2007)。为了相除TSLPR中和对CD4+T细胞或变应性炎症中其他效应细胞的直接影响,Liyun Shi等进行了实验,其中OVA-负载的DC在过继转移至未致敏小鼠气道之前用抗TSLPR体内治疗。之前已经发现,OVA-DC促发强嗜酸性气道炎症并伴随诸如IL-4和IL-5等Th2细胞因子的大量产生(Sung等,J.Immunol.,166:1261-1271和Lambrecht等,J.Clin.Invest.,106:551-559,2000)。然而,用抗-TSLPR预治疗OVA-DC导致嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润以及IL-4和IL-5水平的显著下降,进一步说明了TSLPR在DC引发的变应性疾病中起的作用。该结果还支持TSLPR对DC的阻断将帮助控制气道炎症(Liyun Shi等,同上)。

[0016] 有越来越多的实验涉及TSLP/TSLPR在各种生理和病理过程中的作用。TSLP的生理学作用包括调整免疫系统,特别是刺激B和T细胞增殖、发育和成熟。TSLP在变应性哮喘的病理学和局部抗体介导的TSLP受体功能阻断以缓解变应性疾病中起至关重要的作用。因此,TSLP和TSLP受体之间的相互作用被认为在许多生理疾病过程中是重要的,例如:变应性炎症、患有特应性皮炎或特应性湿疹的患者的皮肤损害、变应性哮喘和哮喘。

[0017] 附图简述

[0018] 图1示出本发明的动电学产生的流体(例如,Rev-60和Solas)分别减少支气管上皮细胞(BEC)中的DEP诱导的TSLP受体表达大约90%和50%,而生理盐水(NS)仅有边际效应。此外,非动电学对照压力罐流体PP60导致DEP诱导的TSLP受体表达减少大约50%。

[0019] 图2示出本发明的动电学产生的流体(例如,Revera 60和Solas)分别抑制支气管上皮细胞中的DEP诱导的细胞表面结合的MMP9水平大约80%和70%,而生理盐水(NS)仅有边际效应。此外,非动电学对照压力罐流体PP60导致DEP诱导的细胞表面结合的MMP9水平减少大约30%。

[0020] 图3A-C证实一系列膜片钳实验的结果,所述实验在两个时间点(15分钟(左图板)和2小时(右图板))和不同的电压方案中评价动电学产生的流体(例如,RNS-60和Solas)对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0021] 关于图3A-C所涉及的实验,图4A-C示出在3种电压方案中(A,从0mV阶跃;B,从-60mV阶跃;C,从-120mV阶跃)和2个时间点(15分钟(空心圆)和2小时(实心圆)),RNS-60电流数据减去Solas电流数据所得到的图。

[0022] 图5A-D证实一系列膜片钳实验的结果,所述实验利用不同的外部盐溶液和在不同的电压方案中(图板A和C显示从0mV的阶跃;图板B和D显示从-120mV的阶跃)评价动电学产生的流体(例如,Solas(图板A和B)和RNS-60(图板C和D))对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0023] 关于图5A-D所涉及的实验,图6A-D示出对于Solas(图板A和B)和Revera 60(图板C和D),在2种电压方案中(图板A和C,从0mV阶跃;图板B和D,从-120mV阶跃)从20mM $CaCl_2$(菱形符号)和40mM $CaCl_2$(方形符号)电流数据中减去CsCl电流数据(显示于图5中)所得到的图。

[0024] 图7A和B证明了膜片钳试验的结果，所述试验评价了稀释动电学产生的流体(例如，RNS-60)对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0025] 发明概述

[0026] 具体方面提供了用于治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的方法，包括向需要所述方法的哺乳动物施用治疗有效量的动电学改变的水性流体，所述水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水性溶液，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于大约100纳米的平均直径，并且以足以治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的量稳定地配置在所述离子水性流体中。在某些方面中，所述电荷稳定的含氧纳米结构以在所述流体与活细胞相接触时足以提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的调整的量稳定地配置在所述离子水性流体中。

[0027] 在某些方法方面中，所述电荷稳定的含氧纳米结构是所述流体中主要的电荷稳定的含气体纳米结构物种。在具体的实施方案中，所述流体中作为所述电荷稳定的含氧纳米结构存在的溶解氧分子的百分比是选自由以下各项组成的组的百分比：大于0.01％、大于0.1％、大于1％、大于5％；大于10％；大于15％；大于20％；大于25％；大于30％；大于35％；大于40％；大于45％；大于50％；大于55％；大于60％；大于65％；大于70％；大于75％；大于80％；大于85％；大于90％；和大于95％。在具体的方面中，全部的溶解氧基本上以所述电荷稳定的含氧纳米结构存在。在某些实施方案中，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于选自由以下各项组成的组的尺寸的平均直径：90nm；80nm；70nm；60nm；50nm；40nm；30nm；20nm；10nm；和小于5nm 。

[0028] 在具体的方法方面中，所述离子水性溶液包括盐水溶液。在某些方面中，动电学改变的水性流体是超氧合的。

[0029] 在具体的方法方面中，动电学改变的水性流体包括溶剂化电子的形式。

[0030] 在某些方面中，动电学改变的水性流体的改变包括所述流体暴露于流体动力诱导的局部动电学效应。在某些实施方案中，暴露于所述局部动电学效应包括暴露于电压脉冲和电流脉冲中的至少一种。在具体的方面中，所述流体暴露于流体动力诱导的局部动电学效应包括所述流体暴露于用以产生所述流体的装置的诱导动电学效应的结构部件。

[0031] 在具体的方面中，TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症包括免疫系统的疾病或紊乱，包括但不限于变应性炎症。在具体方面，变应性炎症包括变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、IgE介导的紊乱、鼻结膜炎和食物变态反应中的至少一种。在某些实施方案中，TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症包括炎性关节炎，例如包括类风湿性关节炎和银屑病中的至少一种。

[0032] 在某些方面中，所述的方法进一步包括联合疗法，其中至少一种另外的治疗剂被施用于患者。在具体的实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：短效β_2-激动剂、长效β2-激动剂、抗胆碱能药、皮质类固醇、全身性皮质类固醇、肥大细胞稳定剂、白三烯调节剂、甲基黄嘌呤及其组合。在某些方面，所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：由β_2-激动剂组成的支气管扩张剂，所述β_2-激动剂包括沙丁胺醇(albuterol)、左旋沙丁胺醇(levalbuterol)、吡布特罗(pirbuterol)、阿福特罗(artformoterol)、福莫特罗(formoterol)沙美特罗(salmeterol)；和抗胆碱能药，诸如异丙托铵(ipratropium)和噻托铵(tiotropium)；皮质类固醇，包括倍氯米松

(beclomethasone)、布地奈德(budesonide)、氟尼缩松(flunisolide)、氟替卡松(fluticasone)、莫米松(mometasone)、曲安西龙(triamcinolone)、甲泼尼龙(methyprednisolone)、泼尼松龙(prednisolone)、泼尼松(prednisone);白三烯调节剂,包括孟鲁司特(montelukast)、扎鲁司特(zafirlukast)和齐留通(zileuton);肥大细胞稳定剂,包括色甘酸(cromolyn)和奈多罗米(nedocromil);甲基黄嘌呤(methylxanthine),包括茶碱(theophylline);组合药物,包括异丙托铵和沙丁胺醇、氟替卡松和沙美特罗、布地奈德和福莫特罗;抗组胺剂,包括羟嗪(hydroxyzine)、苯海拉明(diphenhydramine)、氯雷他定(loratadine)、西替利嗪(cetirizine)、和氢化可的松(hydrocortisone);免疫系统调节药物,包括他克莫司(tacrolimus)和吡美莫司(pimecrolimus);环孢霉素(cyclosporine);硫唑嘌呤(azathioprine);吗替麦考酚酯(mycophenolatemofetil);以及它们的组合。在具体方面,所述至少一种另外的治疗剂为TSLP和/或TSLPR拮抗剂,并且在特定实施方案中,所述TSLP和/或TSLPR拮抗剂选自由下列各项组成的组:对TSLP与TSLP受体特异的中和抗体、可溶性TSLP受体分子和TSLP受体融合蛋白,包括TSLPR-免疫球蛋白Fc分子或编码超过一个受体链的组分的多肽。

[0033] 在具体方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括改变细胞膜结构或功能中的至少一种,所述改变细胞膜结构或功能包括改变膜相关蛋白或构成成分的构象、配体结合活性和催化活性中的至少一种。在某些方面,所述膜相关蛋白包括选自由以下各项组成的组的至少一种:受体、跨膜受体、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞黏附蛋白、整联蛋白等。在某些实施方案中,所述跨膜受体包括G蛋白偶联受体(GPCR)。在具体方面,所述G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白α亚基相互作用,例如,其中所述G蛋白α亚基包括选自由以下各项组成的组的至少一种:$G\alpha_s$、$G\alpha_i$、$G\alpha_q$和$G\alpha_{12}$,并且在某些实施方案中,所述至少一种G蛋白α亚基是$G\alpha_q$。

[0034] 在具体方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整全细胞电导,例如其中调整全细胞电导包括调整所述全细胞电导的线性和非线性电压依赖性贡献中的至少一种。

[0035] 在某些方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整钙依赖性细胞信息传递途径或系统。在某些方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整磷脂酶C活性性。在某些方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整腺苷酸环化酶(AC)活性。在某些方法方面,调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整与选自由以下各项组成的组的至少一种病症或症状有关的细胞内信号转导:免疫系统的疾病或紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、IgE介导的紊乱、鼻结膜炎、食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎和银屑病。

[0036] 具体方法方面包括将所述动电学流体施用于细胞网络或层,并且还包括调整其中的细胞间连接。在某些实施方案中,所述细胞间连接包括选自由紧密连接、间隙连接、黏附区(zona adherin)和桥粒(desmasome)组成的组的至少一种。在具体的方面中,所述细胞网络或层包括选自由肺上皮细胞、支气管上皮细胞和肠上皮细胞组成的组的至少一种。

[0037] 在某些方法方面,动电学改变的水性流体是氧合的,并且其中所述流体中的氧在大气压下以至少8ppm、至少15ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或至少

60ppm氧的量存在。

[0038] 在某些方法方面，所述动电学改变的水性流体包括溶剂化电子、和动电学改性或荷电的氧物种中的至少一种，例如，其中所述溶剂化电子或者动电学改性或荷电的氧物种的形式以至少0.01ppm、至少0.1ppm、至少0.5ppm、至少1ppm、至少3ppm、至少5ppm、至少7ppm、至少10ppm、至少15ppm或至少20ppm的量存在。在某些方面，所述动电学改变的水性流体包括由分子氧稳定的溶剂化电子的形式。

[0039] 在某些方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的能力在封闭的气密容器中持续至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少12个月或更长的时间。

[0040] 在某些方面，在所述动电学改变的流体的电荷稳定的含氧纳米结构中存在的氧的量为在大气压下至少8ppm、至少15ppm、至少20ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或者至少60ppm氧。

[0041] 在具体方面，治疗包括通过局部、吸入、鼻内和静脉内中的至少一种方式施用。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明提供了用于治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的方法，该方法包括施用动电学改变的水性流体，该水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水性溶液，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于大约100纳米的平均直径，并且以足以治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的量稳定地配置在所述离子水性流体中。优选的是，所述电荷稳定的含氧纳米结构以足以提供调整细胞膜电位和/或电导率的量稳定地配置在所述流体中。包括调整或下调TSLP表达和/或活性的某些方面具有用于治疗本文公开的TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症(例如，免疫系统的紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病和食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、IgE介导的紊乱和鼻结膜炎)的效用。

[0044] 动电学产生的流体：

[0045] 如本文所用的“动电学产生的流体”是指出于本文工作实施例的目的通过本文详细描述的示例性混合装置(还参见US200802190088和WO2008/052143，通过引用将二者整体并入本文)而产生的申请人发明的动电学产生的流体。如本文公开和呈现的资料所证明，动电学流体表示相对于现有技术非动电学流体，包括相对于现有技术氧合的非动电学流体(例如压力罐氧合的流体及类似物)的新颖的且从根本上不同的流体。如在本文各方面中所公开的那样，动电学产生的流体具有独特且新颖的物理和生物特性，包括但不限于以下：

[0046] 在具体的方面，动电学改变的水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水性溶液，所述纳米结构基本上具有小于约100纳米的平均直径并以足以在流体与活细胞接触时提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的调整的量稳定地配置在离子水性流体中。

[0047] 在具体的方面，动电学产生的流体是指在流体动力诱导的、局部化(例如就全部流体体积而言是非均一的)的动电学效应(例如电压/电流的脉冲)例如本文所述的装置部件-局部化效应的存在下产生的流体。在具体的方面，所述流体动力诱导的、局部化的动电学效应与本文公开并讨论的表面相关的双层和/或流动电流效应组合。

[0048] 在具体的方面，动电学改变的水性流体适合于调整其中溶解的报告溶质(例如海藻糖(trehelose))的^{13}C-NMR线宽。NMR线宽效应是在测量例如在具体工作实施例中如本文所述的测试流体中的溶质“翻滚”的间接方法中。

[0049] 在具体的方面，动电学改变的水性流体的特征为以下至少一种：在-0.14V、-0.47V、-1.02V和-1.36V的任何一个下的明显不同的方波伏安峰差异；在-0.9伏特的极谱峰；以及在-0.19和-0.3伏特不存在极谱峰，在-0.19和-0.3伏特的极谱峰是具体工作实施例中本文所公开的动电学产生的流体所独有的。

[0050] 在具体的方面，动电学改变的水性流体适合于改变细胞膜电导率(例如在本文公开的膜片钳研究中测量的全细胞电导的电压依赖性贡献)。

[0051] 在具体的方面，动电学改变的水性流体是氧合的，其中在该流体中的氧的存在量为大气压下至少15ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或至少60ppm的溶解氧。在具体的方面，动电学改变的水性流体具有小于15ppm、小于10ppm的大气压下的溶解氧或大致环境氧水平。

[0052] 在具体的方面，动电学改变的水性流体是氧合的，其中在该流体中的氧的存在量在大约8ppm与大约15ppm之间，并且在这种情况中有时在本文称作“Solas”。

[0053] 在具体的方面，动电学改变的水性流体包括溶剂化电子(例如，通过分子氧稳定)和动电学改变和/或荷电的氧物种的至少一种，并且其中在某些实施方案中所述溶剂化电子和/或动电学改变或带电的氧物种的存在量为至少0.01ppm、至少0.1ppm、至少0.5ppm、至少1ppm、至少3ppm、至少5ppm、至少7ppm、至少10ppm、至少15ppm或至少20ppm。

[0054] 在具体的方面，动电学改变的水性流体适合于改变细胞膜的结构或功能(例如改变膜相关蛋白的构象、配体结合活性或催化活性)至足以提供对细胞内信号转导的调整，其中在具体的方面，所述膜相关蛋白包括选自由以下组成的组的至少一种：受体、跨膜受体(例如G蛋白偶联受体(GPCR)、TSLP受体、β2肾上腺素能受体、缓激肽受体等)、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞粘附蛋白和整联蛋白。在某些方面，发挥效应的G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白的α亚基(例如$G\alpha_s$、$G\alpha_i$、$G\alpha_q$和$G\alpha_{12}$)相互作用。

[0055] 在具体的方面，动电学改变的水性流体适合于调整细胞内信号转导，包括钙依赖性细胞信息传递途径或系统的调整(例如磷脂酶C活性的调整或腺苷酸环化酶(AC)活性的调整)。

[0056] 在具体的方面，动电学改变的水性流体的特征为本文所述的各种生物活性(例如细胞因子、受体、酶和其他蛋白质和细胞内信号传导途径的调控)。

[0057] 在具体的方面，如本文中所示，动电学改变的水性流体表现出与沙丁胺醇，和与布地奈德的协同作用。

[0058] 在具体的方面，如本文工作实施例所示，动电学改变的水性流体降低支气管上皮细胞(BEC)中的DEP诱导的TSLP受体的表达。

[0059] 在具体的方面，如本文工作实施例所示，动电学改变的水性流体抑制在支气管上皮细胞(BEC)中DEP诱导的细胞表面结合的MMP9水平。

[0060] 在具体的方面，如本文中所示，动电学改变的水性流体的生物效应被白喉毒素抑制，表明β阻断、GPCR阻断和钙离子阻断影响动电学改变的水性流体的活性(例如，对调节性T细胞的功能的影响)。

[0061] 在具体的方面，动电学改变的水性流体的物理和生物效应(例如改变细胞膜的结构或功能至足以提供对细胞内信号转导的调整的能力)在一个封闭的容器(例如，封闭的气密容器)中持续至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少六个月或更长的时间。

[0062] 因此，其他方面提供所述动电学产生的溶液和制备动电学改变的氧合的水性流体或溶液的方法，所述方法包括：在相对运动的两个间隔的表面间提供流体材料流，并且在所述两个间隔的表面间界定混合体积，其中流动的流体材料在混合体积内和穿过混合体积的单次通过的滞留时间为大于0.06秒或大于0.1秒；和在适于将至少20ppm、至少25ppm、至少30、至少40、至少50或至少60ppm的氧(O_2)溶解在材料中并动电学改变所述流体或溶液的条件下将氧引入混合体积内的流动的流体材料。在某些方面，在小于100毫秒、小于200毫秒、小于300毫秒或小于400毫秒内将氧注入材料中。在具体实施方案中，表面积与体积比为至少12、至少20、至少30、至少40或至少50。

[0063] 其他方面提供制备动电学改变的氧合的水性流体或溶液的方法，所述方法包括：在两个间隔的表面间提供流体材料流，所述两个间隔的表面在其间界定了混合体积；在适于在小于100毫秒、小于200毫秒、小于300毫秒或小于400毫秒内将至少20ppm、至少25ppm、至少30、至少40、至少50或至少60ppm的氧扩散到材料中的条件下将氧引入在混合体积中的流动的材料中。在某些方面，在混合体积内的所述流动的材料的滞留时间为大于0.06秒或大于0.1秒。在具体实施方案中，表面积与体积比为至少12、至少20、至少30、至少40或至少50。

[0064] 在具体的方面中，所施用的本发明的动电学改变的流体包括足以调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的量的电荷稳定的含氧纳米结构。在某些实施方案中，动电学改变的流体是超氧合的(例如RNS-20、RNS-40和RNS-60，在标准盐水中分别包含20ppm、40ppm和60ppm的溶解氧)。在具体的实施方案中，动电学改变的流体是非超氧合的(例如RNS-10或Solas，包含10ppm(例如，在标准盐水中为大约环境水平的溶解氧))。在某些方面中，在以动电学方式产生所述流体时建立本发明的动电学改变的流体的盐度、无菌性、pH等，并且通过合适的途径施用所述无菌流体。备选地，在施用所述流体之前，对所述流体的盐度、无菌性、pH等中的至少一种进行适当地调节(例如使用无菌盐水或合适的稀释液)，从而使其与给药途径是生理学相容的。优选的是，用于调节所述流体的盐度、无菌性、pH等中的至少一种的稀释液和/或盐水溶液和/或缓冲液组合物也是动电学流体，或者否则也是相容的。

[0065] 在具体的方面中，本发明的动电学改变的流体包括盐水(例如一种或多种溶解盐；例如基于碱金属的盐(Li、Na、K、Rb、Cs等)，基于碱土金属的盐(例如Mg、Ca)等，基于过渡金属的盐(例如Cr、Fe、Co、Ni、Cu、Zn等)，以及任何合适的阴离子/反离子成分)。具体的方面包括基于混合盐的动电学流体(例如Na、K、Ca、Mg等，以不同的组合和浓度)。在具体的方面中，本发明的动电学改变的流体包括标准盐水(例如，大约0.9％NaCl，或者大约0.15M NaCl)。在具体的方面中，本发明的动电学改变的流体包括浓度为至少0.0002M、至少0.0003M、至少0.001M、至少0.005M、至少0.01M、至少0.015M、至少0.1M、至少0.15M或者至少0.2M的盐水。在具体的方面中，本发明的动电学改变的流体的电导率为至少10μS/cm、至少40μS/cm、至少80μS/cm、至少100μS/cm、至少150μS/cm、至少200μS/cm、至少300μS/cm、或至少500μS/cm、至

少1mS/cm、至少5mS/cm、10mS/cm、至少40mS/cm、至少80mS/cm、至少100mS/cm、至少150mS/cm、至少200mS/cm、至少300mS/cm或者至少500mS/cm。在具体的方面中，可以使用任何盐来制备本发明的动电学改变的流体，只要它们可以形成本文所公开的具有生物学活性的盐稳定的纳米结构(例如，盐稳定的含氧纳米结构)即可。

[0066] 根据具体的方面，本发明的包含电荷稳定的含气体纳米结构的流体组合物的生物学效应可以通过改变例如上文所述的流体的离子成分和/或通过改变所述流体的气体成分来调整(例如增加、降低、调节等)。在优选的方面中，使用氧来制备本发明的动电学流体。在另外的方面中，使用氧与选自氮、氧、氩、二氧化碳、氖、氦、氪、氢和氙中的至少一种其他气体的混合物。

[0067] 示例性优选实施方案：

[0068] 具体方面提供了用于治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的方法，包括向需要所述方法的哺乳动物施用治疗有效量的动电学改变的水性流体，所述水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水性溶液，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于大约100纳米的平均直径，并且以足以治疗TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症的量稳定地配置在所述离子水性流体中。在某些方面中，所述电荷稳定的含氧纳米结构以在所述流体与活细胞相接触时足以提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的调整的量稳定地配置在所述离子水性流体中。

[0069] 在某些方法方面中，所述电荷稳定的含氧纳米结构是所述流体中主要的电荷稳定的含气体纳米结构物种。在具体的实施方案中，所述流体中作为所述电荷稳定的含氧纳米结构存在的溶解氧分子的百分比是选自由以下各项组成的组的百分比：大于0.01％、大于0.1％、大于1％、大于5％；大于10％；大于15％；大于20％；大于25％；大于30％；大于35％；大于40％；大于45％；大于50％；大于55％；大于60％；大于65％；大于70％；大于75％；大于80％；大于85％；大于90％；和大于95％。在具体的方面中，全部的溶解氧基本上以所述电荷稳定的含氧纳米结构存在。在某些实施方案中，所述电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于选自由以下各项组成的组的尺寸的平均直径：90nm；80nm；70nm；60nm；50nm；40nm；30nm；20nm；10nm；和小于5nm。

[0070] 在具体的方法方面中，所述离子水性溶液包括盐水溶液。在某些方面中，动电学改变的水性流体是超氧合的。

[0071] 在具体的方法方面中，动电学改变的水性流体包括溶剂化电子的形式。

[0072] 在某些方面中，动电学改变的水性流体的改变包括所述流体暴露于流体动力诱导的局部动电学效应。在某些实施方案中，暴露于所述局部动电学效应包括暴露于电压脉冲和电流脉冲中的至少一种。在具体的方面中，所述流体暴露于流体动力诱导的局部动电学效应包括所述流体暴露于用以产生所述流体的装置的诱导动电学效应的结构部件。

[0073] 在具体的方面中，TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症包括免疫系统的疾病或紊乱，包括但不限于变应性炎症。在具体方面，变应性炎症包括变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、IgE介导的紊乱、鼻结膜炎和食物变态反应中的至少一种。在某些实施方案中，TSLP介导的或TSLPR介导的疾病或病症包括炎性关节炎，例如包括类风湿性关节炎和银屑病中的至少一种。

[0074] 在某些方面中，所述的方法进一步包括联合疗法，其中至少一种另外的治疗剂被

施用于患者。在具体的实施方案中，所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：短效β_2-激动剂、长效β2-激动剂、抗胆碱能药、皮质类固醇、全身性皮质类固醇、肥大细胞稳定剂、白三烯调节剂、甲基黄嘌呤及其组合。在某些方面，所述至少一种另外的治疗剂选自由下列各项组成的组：由β_2-激动剂组成的支气管扩张剂，所述β_2-激动剂包括沙丁胺醇、左旋沙丁胺醇、吡布特罗、阿福特罗、福莫特罗、沙美特罗；和抗胆碱能药，诸如异丙托铵和噻托铵；皮质类固醇，包括倍氯米松、布地奈德、氟尼缩松、氟替卡松、莫米松、曲安西龙、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼松；白三烯调节剂，包括孟鲁司特、扎鲁司特和齐留通；肥大细胞稳定剂，包括色甘酸和奈多罗米；甲基黄嘌呤，包括茶碱；组合药物，包括异丙托铵和沙丁胺醇、氟替卡松和沙美特罗、布地奈德和福莫特罗；抗组胺剂，包括羟嗪、苯海拉明、氯雷他定、西替利嗪、和氢化可的松；免疫系统调节药物，包括他克莫司和吡美莫司；环孢霉素；硫唑嘌呤；吗替麦考酚酯；以及它们的组合。在具体方面，所述至少一种另外的治疗剂为TSLP和/或TSLPR拮抗剂，并且在特定实施方案中，所述TSLP和/或TSLPR拮抗剂选自由下列各项组成的组：对TSLP与TSLP受体特异的中和抗体、可溶性TSLP受体分子和TSLP受体融合蛋白，包括TSLPR-免疫球蛋白Fc分子或编码超过一个受体链的组分的多肽。

[0075] 在具体方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括改变细胞膜结构或功能中的至少一种，所述改变细胞膜结构或功能包括改变膜相关蛋白或构成成分的构象、配体结合活性和催化活性中的至少一种。在某些方面，所述膜相关蛋白包括选自由以下各项组成的组的至少一种：受体、跨膜受体、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞黏附蛋白、整联蛋白等。在某些实施方案中，所述跨膜受体包括G蛋白偶联受体(GPCR)。在具体方面，所述G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白α亚基相互作用，例如，其中所述G蛋白α亚基包括选自由以下各项组成的组的至少一种：$G\alpha_s$、$G\alpha_i$、$G\alpha_q$和$G\alpha_{12}$，并且在某些实施方案中，所述至少一种G蛋白α亚基是$G\alpha_q$。

[0076] 在具体方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整全细胞电导，例如其中调整全细胞电导包括调整所述全细胞电导的线性和非线性电压依赖性贡献中的至少一种。

[0077] 在某些方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整钙依赖性细胞信息传递途径或系统。在某些方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整磷脂酶C活性性。在某些方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整腺苷酸环化酶(AC)活性。在某些方法方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种包括调整与选自由以下各项组成的组的至少一种病症或症状有关的细胞内信号转导：免疫系统的疾病或紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、IgE介导的紊乱、鼻结膜炎、食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎和银屑病。

[0078] 具体方法方面包括将所述动电学流体施用于细胞网络或层，并且还包括调整其中的细胞间连接。在某些实施方案中，所述细胞间连接包括选自由紧密连接、间隙连接、黏附区(zona adherin)和桥粒(desmasome)组成的组的至少一种。在具体的方面中，所述细胞网络或层包括选自由肺上皮细胞、支气管上皮细胞和肠上皮细胞组成的组的至少一种。

[0079] 在某些方法方面，动电学改变的水性流体是氧合的，并且其中所述流体中的氧在大气压下以至少8ppm、至少15ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或至少

60ppm氧的量存在。

[0080] 在某些方法方面，所述动电学改变的水性流体包括溶剂化电子、和动电学改性或荷电的氧物种中的至少一种，例如，其中所述溶剂化电子或者动电学改性或荷电的氧物种的形式以至少0.01ppm、至少0.1ppm、至少0.5ppm、至少1ppm、至少3ppm、至少5ppm、至少7ppm、至少10ppm、至少15ppm或至少20ppm的量存在。在某些方面，所述动电学改变的水性流体包括由分子氧稳定的溶剂化电子的形式。

[0081] 在某些方面，调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的能力在封闭的气密容器中持续至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少12个月或更长的时间。

[0082] 在某些方面，在所述动电学改变的流体的电荷稳定的含氧纳米结构中存在的氧的量为在大气压下至少8ppm、至少15ppm、至少20ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或者至少60ppm氧。

[0083] 在具体方面，治疗包括通过局部、吸入、鼻内和静脉内中的至少一种方式施用。

[0084] 示例性的相关分子相互作用：

[0085] 传统上，量子特性被认为是属于小于10^{-10}米的基本粒子，而我们日常生活的宏观世界则被称为是经典的，因为它遵循牛顿运动定律。

[0086] 近来，分子已被描述为形成尺寸随着稀释而增加的簇。测得这些簇的直径为若干微米，并且已经报道尺寸随着稀释呈非线性增加。推测测量为直径为100纳米的量子相干域在纯水中产生，并且相干域中的水分子的集合振动可最终成为锁定为电磁场波动的相，提供水中的稳定振荡，以激发长久的相干震荡的形式提供“记忆”形式，该长久的相干震荡对于改变水的集合结构的水中溶解物质具有特异性，这可依次地确定发生的特异性相干震荡。当这些震荡由磁场相耦合变为稳定时，稀释时水仍可传播“种子”相干震荡。当分子的簇尺寸增加时，其电磁信号相应扩大，增强由水传播的相干震荡。

[0087] 尽管溶解分子的簇尺寸和水的详细微观结构发生变化，但是相干震荡的特异性可能存在。一种考虑水的性质变化的模型基于对结晶的考虑。

[0088] 在申请人之前的专利申请：WO 2009/055729中显示了形成纳米级笼8700的简化的质子化水簇。质子化水簇通常呈现$H^+(H_20)_n$形式。一些质子化水簇是天然存在的，如在电离层中。不受任何具体理论的束缚，并且根据具体方面，其他类型的水簇或结构(簇、纳米笼等)是可行的，包括包含传递给本发明的输出材料的氧和稳定化电子的结构。氧原子可以被捕获到所得结构中。半结合的纳米笼的化学性质容许氧和/或稳定化电子在延长的时间段内保持溶解。诸如医药化合物的其他原子或分子可以被笼蔽以用于持续递送的目的。溶液材料与溶解化合物的特定化学性质取决于那些材料的相互作用。

[0089] 之前通过实验已经显示了该混合装置所处理的流体，所述流体表现出不同的结构特征，这与在簇结构的情况下对流体的分析是一致的。参见，例如，WO 2009/055729。

[0090] 电荷稳定的纳米结构(例如电荷稳定的含氧纳米结构)：

[0091] 如之前申请人的WO 2009/055729中所述，“双层效应”“滞留时间”“输注速率”和“泡尺寸测量”，动电学混合装置采用复杂的动力学湍流，在几毫秒内产生第一材料和第二材料的独特非线性流体动力学相互作用，提供与大量表面积有效接触(包括装置的表面积和小于100nm的特别小气泡的表面积)的复杂混合，从而提供本文所公开的新型动电学效

应。此外，使用包括绝缘的转子和定子部件的专门设计的混合装置证明了部件局部化的动电学效应(电压/电流)。

[0092] 如本领域已公认的，已知电荷再分配和/或溶剂化电子在水溶液中高度不稳定。根据具体的方面，申请人的动电学效应(例如电荷再分配，包括，具体方面中的溶剂化电子)在输出材料(例如，盐水溶液，离子溶液)中惊人地稳定。事实上，如本文所述，本发明的动电学流体(例如RNS-60或Solas)的性质和生物活性的稳定性可在气密性容器中保持数月，这说明溶解的气体(例如氧)的参与有助于产生和/或保持和/或介导本发明的溶液的性质和活性。显著地，电荷再分配和/或溶剂化电子可以稳定地配置在本发明的动电学离子水性流体中，其量足以在流体与活细胞(例如，哺乳动物细胞)接触时提供对细胞膜电位或细胞膜电导率中的至少一种的调整(例如，参见WO 2009/055729的细胞膜片钳工作实施例23和如本文所公开的)。

[0093] 如本文“分子相互作用”部分所描述的，为了解释本发明的动电学流体(例如，动电学盐水溶液)的稳定性和生物相容性，申请人已提出水分子和溶解于水中的物质(例如氧)分子之间的相互作用改变水的集合结构并提供纳米笼簇，包括包含传递给本发明的输出材料的氧和/或稳定化电子的纳米结构。不受机制的约束，在具体的方面纳米结构的配置如下：含有(至少用于形成和/或稳定性和/或生物活性)溶解的气体(例如氧)；在与细胞膜或其相关构成成分接触时，这样的配置使动电学流体(例如RNS-60或Solas盐水流体)能够调整(例如传递或接受)电荷和/或电荷效应；和在具体的方面，以生物学相关形式提供用于稳定的(例如，携带、容纳、捕获)溶剂化电子。

[0094] 根据具体的方面以及由本发明所支持，在离子或盐水(例如标准盐水，NaCl)溶液中，本发明的纳米结构包括电荷稳定的纳米结构(例如平均直径小于100nm)，该纳米结构可以包含电荷稳定的水合外层中的至少一种溶解的气体分子(例如氧)。根据其他的方面，电荷稳定的水合外层可包括容纳有至少一种溶解的气体分子(例如，氧)的笼或空隙。根据进一步的方面，由于提供合适的电荷稳定的水合外层，电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构可另外地包含溶剂化电子(例如稳定的溶剂化电子)。

[0095] 不受机理和具体理论的限制，本发明的优先权日之后，已经提出了与环境气体(大气)平衡的水性液体中被离子稳定的电荷稳定的微泡(Bunkin等，Journal of Experimental and Theoretical Physics，104：486-498，2007；通过引用并入本文)。根据本发明的具体方面，申请人的新的动电学流体包括电荷稳定的含氧纳米结构的新的生物活性形式，并可进一步包括这种结构的新阵列(array)、簇或缔合。

[0096] 根据电荷稳定的微泡模型，水结构的短程分子序态被气体分子(例如，开始与非吸附离子复合的溶解的气体分子提供短程序态缺陷)的存在所破坏，提供离子液滴的凝聚，其中，所述缺陷被水分子的第一和第二配位层包围，所述水分子的第一和第二配位层可选地被配位层中占据六个和12个空缺位的吸附性离子(例如获取Na+离子屏蔽层以形成电双层)和非吸附性离子(例如占据第二配位层Cl-离子)填充。在不饱和离子溶液中(例如不饱和盐水溶液)，这种水合的“核”保持稳定直至第一和第二层分别被六个吸附性离子和五个吸附性离子填充，然后，经过库伦扩增产生含气体分子的内部空隙，其中吸附性离子(例如，Na^+离子)被吸附至形成的空隙的表面，同时非吸附性离子(或一些部分)被分散进入溶液(同上Bunkin等)。在这个模型中，纳米结构的空隙防止吸附至其表面的离子(例如，Na^+离子)之间

的库伦排斥所导致的塌陷。含空隙的纳米结构的稳定性被假设为由于具有类似电荷的溶解离子选择性吸附在空隙/气泡表面上和在溶解气体和气泡内的气体之间的扩散平衡所引起的，其中得到的电双层所施加的朝向外部的负性静电压力为表面张力提供稳定的代偿，并且气泡内部的气体压力与环境压力平衡。根据这个模型，这些微泡的形成需要离子组分，在特定方面，粒子之间碰撞介导的缔合可提供更大序态的簇(阵列)的形成(同前)。

[0097] 电荷稳定的微泡模型说明粒子可以是气体微泡，但是仅考虑离子溶液中形成同时与环境空气平衡的这些结构，其不能表征并且不能表示是否氧能够形成这些结构，以及同样不表示是否溶剂化电子可通过这些结构缔合和/或稳定。

[0098] 根据具体的方面，本发明的包括电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构的动电学流体是新颖的，并且根据微泡模型从根本上不同于假设的非动电学的大气电荷稳定的微泡结构。显著地，这个结论是无法回避的，至少部分来自下面的事实，即对照盐水溶液不具有本发明公开的生物学性质，而申请人的电荷稳定的纳米提供新的，生物活性形式的电荷稳定的含氧纳米结构。

[0099] 根据本发明的具体的方面，申请人的新的动电学装置和方法提供新的动电学改变的流体，所述流体包含非常大量的电荷稳定的纳米结构，该量超过了在与空气平衡的离子流体中可能自发或不自发存在的量，或在任何非动电学产生的流体中的量。在具体的方面，电荷稳定的纳米结构包含电荷稳定的含氧纳米结构。在另外的方面，电荷稳定的纳米结构是所有或基本上所有电荷稳定的含氧纳米结构或电荷稳定的含氧纳米结构是动电学流体中主要的电荷稳定的含气体纳米结构物种。

[0100] 根据又进一步的方面，电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构可包括或容纳溶剂化电子，从而提供新的稳定的溶剂化电子载体。在具体的方面，电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构提供新型电极(或倒置电极)，这与常规的具有单一有机配位阳离子的溶质电极相反，其具有多个绕空隙或含氧原子的空隙稳定排列的阳离子，其中，所排列的钠离子可与水合外层配位，而不是与有机分子配位。根据具体的方面，溶剂化电子可由水分子的水合外层来容纳，或优选地容纳在分布在所有阳离子上的纳米结构空隙中。在特定的方面，本发明的纳米结构提供溶液中的新型“超级电极”结构，其不仅通过提供溶剂化电子在多个阵列的钠阳离子上的分布/稳定，还提供溶剂化电子与空隙中捕获的(多个)氧分子的缔合或部分缔合——溶剂化电子分布在钠原子和至少一个氧原子的阵列上。根据具体的方面，因此，作为本发明公开的与本发明的动电学流体缔合的“溶剂化电子”在包括被水分子直接水合的传统模型中可能不被溶剂化。可选地，与干燥的电极盐类相同之处很少，本发明的动电学流体中的溶剂化电子可分布在多个电荷稳定的纳米结构上以提供“格点粘合剂(lattice glue)”以稳定水性溶液中的较高序态阵列。

[0101] 在具体的方面，本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构能够与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。在具体的方面，容纳了溶剂化电子的本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构能够与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。

[0102] 在具体的方面，本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构作为电荷和/或电荷效应供体(递送)和/或作为电荷和/电荷效应受体与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。在具体的方面，容纳了溶剂化电子的本发明的电荷

稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构作为电荷和/或电荷效应供体和/或作为电荷和/或电荷效应受体与细胞膜发生相互作用以介导生物活性。

[0103] 在具体的方面，本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构与所观察到的本发明的动电学流体的稳定性和生物性质一致且是所观察到的本发明的动电学流体的稳定性和生物性质的原因并进一步提供新的电极(或倒置电极(inverted electride))，所述电极提供水性离子溶液(例如盐水溶液，NaCl等)中稳定的溶剂化电子。

[0104] 在具体的方面，电荷稳定的含氧纳米结构基本上包括，采取下面的形式或可产生，电荷稳定的含氧纳米气泡。在具体的方面，电荷稳定的含氧簇提供形成电荷稳定的含氧纳米结构的相对较大的阵列和/或电荷稳定的含氧纳米气泡或其阵列。在具体的方面，电荷稳定的含氧纳米结构可提供在与疏水表面接触之后形成疏水纳米气泡。

[0105] 在具体的方面，电荷稳定的含氧纳米结构基本含有至少一个氧分子。在特定的方面，电荷稳定的含氧纳米结构基本含有至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少10至少15、至少20、至少50、至少100或更多个氧分子。在具体的方面，电荷稳定的含氧纳米结构含有或产生约20nm×1.5nm的纳米气泡(例如疏水纳米气泡)，含有约12个氧分子(例如基于氧分子的尺寸(约0.3nm×0.4nm)，假设为理想气体并应用n＝PV/RT，其中P＝1atm，R＝0.082□057□1.atm/mol.K；T＝295K；$V=pr^2h=4.7x10^{-22}L$，其中$r=10x10^{-9}m$，$h=1.5x10^{-9}m$，且$n=1.95x10^{-22}mol$)。

[0106] 在特定的方面，流体中存在的氧分子的百分比是选自由下列各项组成的组的百分比量：大于0.1％；大于1％；大于2％；大于5％；大于10％；大于15％；大于20％；大于25％；大于30％；大于35％；大于40％；大于45％；大于50％；大于55％；大于60％；大于65％；大于70％；大于75％；大于80％；大于85％；大于90％；且大于95％，所述氧分子处于离子水性流体中的具有电荷稳定的配置的所述纳米结构或其阵列中。优选地，此百分比大于约5％，大于约10％，大于约15％，或大于约20％。在另外的方面，在离子水性流体中具有电荷稳定的构造的电荷稳定的含氧纳米结构或其阵列的大体尺寸选自由下列各项组成的组：小于100nm；小于90nm；小于80nm；小于70nm；小于60nm；小于50nm；小于40nm；小于30nm；小于20nm；小于10nm；小于5nm；小于4nm；小于3nm；小于2nm；和小于1nm。优选地，这个尺寸小于约50nm，小于约40nm，小于约30nm，小于约20nm或小于约10nm。

[0107] 在特定的方面，本发明的动电学流体包含溶剂化电子。在进一步的方面，本发明的动电学流体包含电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构，和/或其阵列，其包括下列中的至少一种：一种或多种溶剂化电子；和独特的电荷分布(极性、对称、非对称电荷分布)。在具体的方面，电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构和/或其阵列具有顺磁性。

[0108] 相反，相对于本发明的动电学流体，对照压力罐氧合流体(非动电学流体)等不含有能够调整细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的这种动电学产生的电荷稳定的生物学活性纳米结构和/或生物学活性的电荷稳定的含氧纳米结构和/或其阵列。

[0109] 用于制备富含气体的流体的系统

[0110] 本发明公开的系统和方法容许以高浓度稳定地富集气体(例如，氧)而具有最小限度的被动损失。这种系统和方法可以有效地用于将很多种气体以较高的百分比富集到很多种流体中。仅举例来说，使用公开的系统和/或方法，在室温下通常具有约2-3ppm(百万分

率)的溶解氧的去离子水可以达成如下范围内的溶解氧水平:至少约5ppm、至少约10ppm、至少约15ppm、至少约20ppm、至少约25ppm、至少约30ppm、至少约35ppm、至少约40ppm、至少约45ppm、至少约50ppm、至少约55ppm、至少约60ppm、至少约65ppm、至少约70ppm、至少约75ppm、至少约80ppm、至少约85ppm、至少约90ppm、至少约95ppm、至少约100ppm、或更高或在它们之间的任何值。根据具体的示例性实施方案,可以产生具有约30-60ppm溶解氧水平的富含氧的水。

[0111] 表1说明了在用富含氧的盐水溶液(表1)处理的愈合伤口和在本发明的富含气体的富含氧的盐水溶液的样品中进行的各种分压测量。

[0112] 表1

[0113]

组织氧测量	
探针Z082BO	
在空气中: 171 mmHg	23°C
列	分压 (mmHg)
B1	32-36
B2	169-200
B3	20-180*
B4	40-60
*伤口深度最小, 大多数>150, 偶尔20 s	

[0114] TSLP和TSLP介导的病症

[0115] TSLP和TSLPR激动剂/拮抗剂:对正常由天然存在的物质刺激的细胞受体具有亲和性并且刺激该细胞受体的生理活性、从而引发生化反应的药剂。TSLP受体激动剂对TSLP受体具有亲和性并刺激通过TSLP与其受体的结合而诱导的活性。例如,TSLP/TSLP受体激动剂是结合TSLP受体并诱导细胞内信号传导的分子。相反,"拮抗剂"是抑制正常由天然存在的物质刺激的细胞受体的活性的药剂。因此,TSLP/TSLP受体拮抗剂结合TSLP或TSLP受体并抑制TSLP与TSLP受体的结合和/或抑制正常通过TSLP与其受体的结合而诱导的活性。例如,TSLP/TSLP受体拮抗剂可以结合TSLP或TSLP受体并例如,通过阻断TSLP与TSLP受体的结合而减少或阻止结合。可选地,TSLP/TSLP受体拮抗剂可以结合TSLP受体并减少或阻止正常通过TSLP与其受体的结合而诱导的下游信号传导。激动剂和拮抗剂可以包括多种类别的分子,包括多肽,例如配体样多肽、抗体及其片段或子序列。激动剂和拮抗剂还可以包括融合多肽、抗体、肽(例如长度小于约20个氨基酸的肽)和小分子。示例性拮抗剂包括:对TSLP和TSLP受体特异的中和抗体、可溶性TSLP受体分子和TSLP受体融合蛋白,例如TSLPR-免疫球蛋白Fc分子或编码多于一个受体链的组分的多肽,从而模拟生理受体异二聚体或更高级的寡聚体。如果受体包括超过一个多肽链,则可以利用单链融合。

[0116] 抗体:包括至少一个轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体,其特异性识别并结合表位(例如,抗原,例如TSLP或其片段,或TSLP受体或其片段)。这包括完整的免疫球蛋白和本领域公知的它们的变体和部分,例如Fab′片段、$F(ab)'_2$片段、单链Fv蛋白("scFv")和二硫键稳定化的Fv蛋白("dsFv")。scFv蛋白是其中免疫球蛋白轻链可变区和免疫球蛋白重链可变区通过接头结合的融合蛋白,而在dsFv中,链被突变而引入二硫键以稳定化链的缔合。该术语还包括遗传改造形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、异源缀合抗体(heteroconjugate antibodies)(例如双特异性抗体)。还参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.);Kuby,J.,Immunology,3rd Ed.,W.H.Freeman & Co.,New York,1997。通常,免疫球蛋白具有重链和轻链。每个重链和轻链含有恒定区和可变区(该区也称为"结构域")。组合时,重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有被三个高变区间隔的"构架"区,高变区还称为"互补决定区"或"CDR"。构架区和CDR的范围已经被确定(参见,Kabat等,Sequences of Proteins ofImmunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白的序列),美国卫生与公共服务部,1991,其在此通过引用并入)。Kabat数据库目前维持在线。不同轻链或重链的构架区序列在物种内相对保守。抗体的构架区是由组成的轻链和重链构成的组合构架区,用于在三维空间中定位和排列CDR。抗体包括单克隆抗体、人源化抗体等。

[0117] TSLP拮抗剂包括小分子拮抗剂、TSLP抗体、TSLP受体抗体和TSLP受体融合蛋白,例如TSLPR-免疫球蛋白Fc分子或编码多于一个受体链的组分的多肽,从而模拟生理受体异二聚体或更高级的寡聚体等。还显示TSLP直接结合I型细胞因子受体超家族成员(其还已知为促红细胞生成素受体超家族成员)TSLPR。已经克隆了TSLPR。TSLP的功能性高亲和性体已经被证明包括两个多肽,TSLPR和IL-7受体α链。因此,TSLP和IL-7两者共享IL-7Rα作为其受体组分。然而,这些受体明显不同,其区别在于TSLP受体还含有TSLPR,而IL-7受体还含有常见的细胞因子受体γ链,其是各种细胞因子受体的信号转导组分。TSLPR(和该受体链的Fc融合体)记载在例如公开的美国专利申请号2002/0160949中,其在此通过应用并入。

[0118] TSLP多肽的抗体是本领域公知的。此外,抗TSLPR抗体可通过商购获得(R&D Systems,Minneapolis,Minn.,cat.no.MAB981;DNAX Research,Inc.,Palo Alto,Calif.)。还通过用特定表位免疫而制备针对TSLP受体或TSLP的抗体,所述表位例如通过Welling plot of Vector NTI.RTM.Suite(Informax,Inc,Bethesda,Md.)确定的抗原性增加的区。TSLP受体序列和人TSLP受体中抗原性增加的区公开在美国专利公开号2003/0186875中。药物组合物(见上)一般包括治疗有效量的TSLP拮抗剂并且还可以包括另外的药剂。药物组合物的制备在上文公开。

[0119] 适应证

[0120] 据信TSLP和TSLPR在许多类型的变应性病症中起作用,所述变应性病症包括但不限于免疫系统的紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、变应性哮喘、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、IgE介导的紊乱和鼻结膜炎。TSLP参与DC介导的炎性Th2反应已经显示在几种出版物中,包括最近Ziegler和Liu的综述(Ziegler和Liu,Nat.Immunol.,7:709-714,2005,其通过引用整体并入)。

[0121] 变应性气道炎症.最近研究证明,TSLP是在体内引发小鼠变应性气道炎症所需的

(Zhou等,Nat.Immunol.,6:1047-1053,2005)。在该研究中,Zhou等证明了TSLP转基因诱导的变应性气道炎症(哮喘)的肺特异性表现,所述变应性气道炎症的特征为白细胞(包括Th2细胞)大量浸润、杯状细胞增生和上皮下纤维化和增加的血清IgE水平。此外,最近研究显示,变应原攻击导致哮喘小鼠气道中TSLP的快速聚集(Liyun Shi等,Clin.Immunol.,129:202-210,2008)。这些结果表明,TSLP在变应性气道炎症的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗变应性气道炎症和类似病症具有实质效用。

[0122] 变应性炎症.最近综述概括和描述了研究TSLP在变应性炎症例如变应性皮肤炎症中的作用的结果(Ziegler和Liu,2008)。具体说,研究显示,特应性皮炎患者中正常皮肤或非损伤皮肤没有可检测的TSLP蛋白,而取自急性和慢性特应性皮炎损害的皮肤具有高表达TSLP。在另一个研究中,构建缺少TSLPR的小鼠并检验对变应性皮肤炎症的效应(He等,PNAS,105:11875-11880,2008,其通过引用整体并入)。He等人发现,与野生型小鼠相比,缺少TSLPR的小鼠中由于变应原引起的皮肤炎症显著减少。而在另一项研究中,证明被遗传改造为在皮肤中过表达TSLP的小鼠发生了特应性皮炎,其特征为含有炎性浸润的湿疹性皮肤损害、循环Th2细胞显著增加和升高的血清IgE(Yoo等,J.Exp.Med.,202:541-549,2005)。该研究表明,TSLP可以直接激活小鼠中的DC。在Li等人进行的另一项研究中,研究组确认在皮肤中过表达TSLP的转基因小鼠发生了特应性皮炎,其加强了TSLP与发生特应性皮炎之间的关联。这些结果表明,TSLP在变应性炎症例如变应性皮肤炎症(例如特应性皮炎和湿疹)的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明动电学改变的流体对治疗变应性炎症例如变应性皮肤炎症(例如特应性皮炎和湿疹)和类似病症具有实质效用。

[0123] 银屑病.最近研究显示,TSLP在取自急性银屑病患者的皮肤活检中具有明显更高的表达(Guttman-Yassky等,J.Allergy and Clinical Immunology119:1210-1217,2007)。该结果表明,TSLP在银屑病的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明动电学改变的流体对治疗银屑病和类似病症具有实质效用。

[0124] 变应性哮喘.最近,研究显示变应原攻击导致哮喘小鼠气道中TSLP的快速聚集(Liyun Shi等,Clin.Immunol.,129:202-210,2008)。在同一个研究中,显示通过抑制TSLPR而调节DC功能减轻了小鼠中的严重度。这些结果表明,TSLP在在变应性哮喘的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗变应性哮喘和类似病症具有实质效用。

[0125] 阻塞性气道疾病.最近研究证明,COPD与TSLP的支气管粘膜表达增加相关(Ying等,J Immunol,181:2790-2798,2008)。COPD是一种阻塞性气道疾病。该结果表明,TSLP在阻塞性气道疾病例如COPD的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗阻塞性气道疾病例如COPD具有实质效用。

[0126] 食物变态反应.发现小肠的树突细胞刺激未致敏(naive)T细胞,使它们以OX40L依赖方式向TH2反应偏移。(Blazquez AB,Berin MC.Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L(胃肠树突细胞经由OX40L促进Th2偏移).J Immunol,

180:4441-4450,2008,其通过引用整体并入)。此外,最近的综述讨论了小肠中TSLP的存在及其在调节免疫自稳中的作用。(Iliev ID,Matteoli G,Rescigno M.The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function(肠上皮细胞在控制树突细胞功能中的阳和阴).J Exp Med;204:2253-2257,2007,其通过引用整体并入)。这些结果表明,TSLP在食物变态反应中起作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗食物变态反应和类似病症具有实质效用。

[0127] 炎性关节炎.最近研究发现,与从具有其他形式的关节炎的患者获得的滑液相比,来自类风湿性关节炎(RA)患者的滑液样本中的TSLP的水平升高。(Koyama等.Biochem and Biophyis Res Comm.,357:99-104,2007,其通过引用整体并入)。同一个研究发现,使用抗TSLP中和抗体改善了小鼠中由抗II型胶原抗体诱发的TNF-α依赖性实验性关节炎。这些结果表明,TSLP在炎性关节炎例如RA中起重要作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了TSLP。根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗炎性关节炎和类似病症例如RA具有实质效用。

[0128] 变应性鼻炎.在最近的研究中,Mou等人发现,在罹患变应性鼻炎(AR)的所有测试患者的鼻粘膜中TSLP以mRNA和蛋白质水平两者存在。(Mou等,Acta Oto-laryngologica,129:297-301,2009,其通过引用整体并入)。此外,TSLP水平与AR严重度密切相关。这些结果表明,TSLP在AR和/或鼻结膜炎的发病机制中起重要作用。在此,申请人显示,本发明的动电学改变的流体显著下调了相关模型系统中的TSLP。因此,根据某些实施方案,本发明的动电学改变的流体对于治疗AR、变应性鼻结膜炎和类似病症具有实质效用。

[0129] 治疗方法

[0130] 术语“治疗”是指包括逆转、缓解、抑制疾病、紊乱或病症或它们的一种或多种症状的进展或预防疾病、紊乱或病症或它们的一种或多种症状;并且“治疗”和“治疗上”是指如本文所定义的治疗的行为。

[0131] “治疗有效量”是在实施本文所提供的本发明的过程中所使用的任何化合物的任何量,所述量足以逆转、缓解、抑制疾病、紊乱或病症或它们的一种或多种症状的进展或预防疾病、紊乱或病症或它们的一种或多种症状。

[0132] 本文的某些实施方案涉及治疗组合物和通过预防或缓解与特定病症或疾病相关的炎症的至少一种症状来治疗受试者的方法。已经用类固醇;甲氨蝶呤;免疫抑制药物,包括环磷酰胺、环孢菌素,硫唑嘌呤和来氟米特;非类固醇类抗炎剂,如阿司匹林、对乙酰氨基酚;和COX-2抑制剂;金剂和抗疟疾治疗来治疗与炎症紊乱相关的一些病症或疾病。

[0133] 施用的途径和形式

[0134] 本文使用的“受试者”可指任何活生物,优选动物,更优选哺乳动物,甚至更优选人类。

[0135] 在具体的示例性实施方案中,本发明的富含气体的流体可作为单独的治疗组合物或与另一种治疗剂的组合发挥功能以便该治疗组合物防止或减轻至少一种炎症症状。本发明的治疗组合物包括能够被施用给需要它们的受试者的组合物。在某些实施方案中,治疗组合物制剂还可包括选自由以下组成的组的至少一种其他剂:载体、佐剂、乳化剂、悬浮剂、增甜剂、调味剂、香料和粘合剂。

[0136] 如在此所用的“药学上可接受的载体”和“载体”一般是指无毒的惰性固体、半固体或液体的填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂助剂。可用作药学上可接受的载体的材料的一些非限制性实例是糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉末状黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可油和栓剂蜡(suppository wax)；油类，例如花生油、棉籽油；红花油；芝麻油；橄榄油；玉米油和大豆油；二醇类；例如丙二醇；酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原的水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇和磷酸盐缓冲溶液，以及其他非毒性相容的润滑剂例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和加香剂，根据配制者的判断，防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。在具体的方面，此类载体和赋形剂可以是本发明的富含气体的流体或溶液。

[0137] 本文所述的药学上可接受的载体例如媒介物(vehicle)、佐剂、赋形剂或稀释剂对于本领域熟练技术人员是公知的。通常，药学上可接受的载体对治疗剂具有化学惰性并且在使用的条件下没有有害的副作用或毒性。药学上可接受的载体可包括聚合物和聚合物基质、纳米颗粒、微泡及类似物。

[0138] 除了本发明的治疗性富含气体的流体之外，治疗组合物还可包括惰性稀释剂例如另外的非富含气体的水或其他溶剂，增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类(具体而言，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯，和它们的混合物。如由本领域普通技术人员所理解的那样，具体治疗组合物的新颖且改进的制剂、新颖的富含气体的治疗流体和递送新颖的富含气体的治疗流体的新颖方法可通过用相同、相似或不同的组合物的富含气体的流体代替一种或多种惰性稀释剂而获得。例如，常规的水可以由富含气体的流体代替或补充，生产所述富含气体的流体是通过将氧混合到水或去离子水中以提供富含气体的流体。

[0139] 在某些实施方案中，本发明的富含气体的流体可与一种或多种治疗剂组合在一起和/或单独使用。在具体的实施方案中，并入富含气体的流体可包括用一种或多种富含气体的流体代替一种或多种本领域已知的溶液，例如去离子水、盐溶液及类似物，由此提供用于递送给受试者的改进的治疗组合物。

[0140] 某些实施方案提供了治疗组合物，所述治疗组合物包含本发明的富含气体的流体、药物组合物或其他治疗剂或其药学上可接受的盐或溶剂化物、以及至少一种药物载体或稀释剂。这些药物组合物可用在前述疾病或病症的预防和治疗中和如以上所提到的治疗法中。优选地，载体必须是药学上可接受的并且必须与组合物中的其他成分相容，即对组合物中的其他成分没有有害影响。载体可以是固体或液体并且优选地被配制为单位剂量制剂，例如可包含按重量计0.05％到95％活性成分的片剂。

[0141] 可能的施用途径包括口服、舌下、口含、肠胃外(例如皮下、肌内、动脉内、腹膜内、池内、膀胱内、鞘内或静脉内)、直肠、局部(包括经皮、阴道内、眼内(intraoccular)、耳内(intraotical)、鼻内)、吸入以及可植入装置或材料的注射或插入。

[0142] 施用途径

[0143] 对于具体受试者的最适合的施用手段将取决于被治疗的疾病或病症的性质和严

重度或者被使用的治疗法的性质，以及治疗组合物或另外的治疗剂的性质。在某些实施方案中，口服或局部施用是优选的。

[0144] 适合于口服施用的制剂可作为离散的单位提供，例如片剂、胶囊、扁囊剂、糖浆、酏剂、口香糖、“棒糖(lollipop)”制剂、微乳剂、溶液、悬浮液、锭剂或凝胶涂覆的安瓿剂，每种都包含预定量的活性化合物；作为粉末或颗粒；作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液；或者作为水包油或油包水型乳剂而提供。

[0145] 适合于穿粘膜方法例如通过舌下或口含施用的制剂包括包含活性化合物和典型的调味基质例如糖和阿拉伯胶或黄蓍胶的锭剂贴剂、片剂及类似物，和包含处于惰性基质(例如明胶和甘油或蔗糖阿拉伯胶)中的活性化合物的软锭剂。

[0146] 适合于肠胃外施用的制剂通常包括包含预定浓度的有效的富含气体的流体和可能的另一种治疗剂的无菌水溶液；所述溶液优选地与预定接受者的血液等渗。适合于肠胃外施用的另外的制剂包括包含生理学上适合的共溶剂和/或络合剂例如表面活性剂和环糊精的制剂。水包油型乳剂也可能适合于富含气体的流体的肠胃外施用的制剂。尽管此类溶液优选地由静脉内施用，但是它们也可以通过皮下注射或肌内注射而施用。

[0147] 适合于尿道、直肠或经阴道施用的制剂包括凝胶、乳膏、洗剂、水性或油性悬浮液、可分散的粉末或颗粒、乳剂、可溶性固体材料、灌洗剂及类似物。所述制剂优选地作为单位剂量栓剂而提供，所述栓剂包含在形成栓剂基质(例如可可油)的一种或多种固体载体中的活性成分。可替代地，可以配制具有本发明的富含气体的流体的结肠清洗液用于结肠或直肠施用。

[0148] 适合于局部、眼内、耳内或鼻内应用的制剂包括软膏、乳膏、糊剂、洗剂、尼膏剂、凝胶(例如水凝胶)、喷雾剂、可分散的粉末和颗粒、乳剂、使用流动推进剂的喷雾剂或气溶胶剂(例如脂质体喷雾剂、滴鼻剂、鼻喷雾剂及类似物)以及油类。对于此类制剂适合的载体包括石油膏、羊毛脂、聚乙二醇、醇和它们的组合。鼻腔递送或鼻内递送可包括计量剂量的任何这些制剂或其他制剂。同样，耳内或眼内可包括滴剂、软膏、冲洗液(irritation fluid)及类似物。

[0149] 本发明的制剂可通过任何适合的方法制备，通常通过将任选地具有活性化合物的富含气体的流体与液体或细碎的固体载体或二者以需要的比例进行均一地且紧密地混合，然后(如果必要的话)将生成的混合物塑造成希望的形状。

[0150] 例如，片剂可通过对包含活性成分的粉末或颗粒和一种或多种任选的成分例如粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂或表面活性分散剂的紧密混合物进行压制或者通过对粉末状活性成分与本发明的富含气体的流体的紧密混合物进行模制来制备。

[0151] 通过吸入施用的适合的制剂包括可凭借各种类型的定量加压气溶胶、喷雾器、雾化器或吸入器而产生的细粒粉剂或雾剂。具体而言，治疗剂的粉末或其他化合物可被溶解或悬浮在本发明的富含气体的流体中。

[0152] 对于经口腔的肺部施用，所述粉末或小滴的颗粒尺寸通常在0.5-10μM的范围中，优选1-5μM，以确保递送到支气管树中。对于鼻腔施用，在范围10-500μM中的颗粒尺寸是优选的以确保驻留在鼻腔中。

[0153] 定量吸入器是加压型气溶胶分配器，通常包含在液化推进剂中的治疗剂的悬浮液或溶液制剂。在某些实施方案中，如本文所公开的那样，本发明的富含气体的流体可以除标

准的液化推进剂以外一起使用或代替标准的液化推进剂使用。在使用过程中，这些装置通过适合于递送计量体积(通常从10μL到150μL)的阀排出制剂以产生包含治疗剂和富含气体的流体的细粒喷雾。适合的推进剂包括某些含氯氟烃化合物，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷和它们的混合物。

[0154] 所述制剂可另外包含一种或多种共溶剂，例如乙醇表面活性剂如油酸或失水山梨醇三油酸酯；抗氧化剂和适合的调味剂。雾化器是商购装置，所述装置凭借压缩的气体(通常是空气或氧)加速通过一个狭窄的文式孔(venturi orifice)或者凭借超声搅拌将活性成分的溶液或悬浮液转变为气溶胶雾。供雾化器中使用的适合的制剂由处在富含气体的流体中的另一种治疗剂组成并且占该制剂的高达40％w/w，优选地小于20％w/w。此外，可利用其他载体，例如蒸馏水、无菌水或稀释的水性醇溶液，优选地通过加入盐例如氯化钠使它们与体液等渗。任选的添加剂包括防腐剂(特别是如果制剂没有被无菌制备时)并且可包括羟基苯甲酸甲酯、抗氧化剂、调味剂、挥发性油、缓冲剂和表面活性剂。

[0155] 用于通过吸入法施用的适合的制剂包括可凭借吸入器递送或以鼻吸药(snuff)的方式被摄入鼻腔的细粉碎的粉末。在吸入器中，粉末被包含在通常由明胶或塑料制成的胶囊或药筒中，所述胶囊或药筒在原位被刺穿或者打开，并且在吸入时粉末由通过该装置抽入的空气递送或凭借手工操作的泵递送。在吸入器中采用的粉末只由活性成分组成或者由包括活性成分、适合的粉末稀释剂(例如乳糖)和任选的表面活性剂的粉末共混物组成。活性成分通常包括0.1到100w/w的制剂。

[0156] 除了以上具体提到的成分之外，本发明的制剂还包括本领域熟练技术人员已知的其他药剂，同时考虑到组织中的制剂类型。例如，适合于口服施用的制剂可包括调味剂，而适合于鼻内施用的制剂可包括香料。

[0157] 本发明的治疗组合物可通过可用于与药物一起使用的任何常规方法进行施用，作为单独的治疗剂或者治疗剂的组合。

[0158] 当然，所施用的剂量将依赖于已知的因素而改变，所述因素例如具体药剂的药效学特点及其施用方式和途径；接受者的年龄、健康和重量；症状的性质和程度；并行治疗的种类；治疗的频率；和希望的效果。活性成分的每日剂量可预期为每千克(kg)体重约0.001到1000毫克(mg)，其中优选的剂量为0.1到约30mg/kg。

[0159] 剂量形式(适合于施用的组合物)包含每单位约1mg到约500mg的活性成分。在这些药物组合物中，活性成分将通常以基于组合物的总重量的约0.5-95％的重量的量存在。

[0160] 软膏、糊剂、泡沫、包含体、乳膏和凝胶也可以包含赋形剂，例如淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、有机硅、膨润土、硅酸和滑石，或它们的混合物。粉末和喷雾剂也可以包含赋形剂，例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝和硅酸钙，或这些物质的混合物。可通过制造气溶胶药物常规使用的任何已知手段将纳米晶体抗微生物金属的溶液转换成为气溶胶或喷雾。一般来说，此类方法包括加压或提供一种工具，该工具通常用惰性载体气体对溶液的容器进行加压并使该加压的气体通过一个小孔。喷雾剂可另外地包含常规推进剂，例如氮气、二氧化碳和其他惰性气体。此外，可将微球或纳米颗粒与本发明的富含气体的治疗组合物或流体以施用该治疗化合物给受试者所需要的任何途径一起利用。

[0161] 注射用制剂可存在于单位剂量或多剂量密封的容器例如安瓿和管形瓶中，并且可被储存在仅需要在使用前立即添加无菌液体赋形剂或富含气体的流体的冷冻干燥的(冻干

的)的条件下。临时性注射溶液和悬浮液可从无菌的粉末、颗粒和片剂制备。注射性组合物用的有效的药物载体的需求是本领域普通技术人员公知的。参见例如,Pharmaceutics and Pharmacy Practice,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia,Pa.,Banker和Chalmers,编,238-250(1982)和ASHP Handbook on Injectable Drugs(注射药物的ASHP手册),Toissel,第四版,622-630(1986)。

[0162] 适合于局部施用的制剂包括包含本发明的富含气体的流体和任选的另外的治疗剂和调味剂(通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)的锭剂;包含富含气体的流体和处于惰性基质(例如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)中的任选的另外的治疗剂的软锭剂;和包含富含气体的流体和处于适合的液体载体中的任选的另外的治疗剂的漱口剂或口腔漱洗剂;以及乳膏、乳剂、凝胶剂及类似物。

[0163] 另外,适合于直肠施用的制剂可通过与各种基质例如乳化基质或水溶性基质相混合作为栓剂而提供。适合于阴道施用的制剂可作为阴道栓剂、卫生棉条、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾剂配方而提供,它们除了活性成分以外还包含本领域已知的适当的这些载体。

[0164] 适合的药物载体描述于该领域的一本标准参考文本Remington′sPharmaceutical Sciences(雷明顿药学),Mack出版公司中。

[0165] 施用给受试者(尤其是哺乳动物,特别是人)的剂量在本发明的背景中应该足以经合理的时段在动物中实现治疗反应。本领域的熟练技术人员将认识到剂量将取决于各种因素,包括动物的状态、动物的体重以及被治疗的病症。适合的剂量是在受试者中产生已知实现希望的反应的治疗组合物的浓度。

[0166] 剂量的大小还将由施用的途径、计时和频率以及可能伴随治疗组合物的施用和希望的生理学效应的任何不利的副作用的存在、性质和程度决定。

[0167] 将会理解的是可以进行组合化合物的施用:(1)以处于共制剂中的化合物的组合同时施用或(2)交替地施用,即连续地、相继地、平行地或同时地以独立的药物制剂递送化合物。在交替疗法中,例如,在施用第二种,任选地第三种活性成分时的延迟不应丧失活性成分的组合的协同疗效的益处。根据利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案,该组合理想地应使施用达到最有效的结果。在利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案中,该组合理想地应使施用达到每种活性成分的血浆峰值浓度。通过施用组合的共制剂的每天一次一丸的方案对于一些遭受炎性神经变性疾病的患者可能是可行的。根据特定实施方案,该组合的活性成分的有效血浆峰值浓度大约为0.001μM至100μM。最佳的血浆峰值浓度可通过为具体患者所开的制剂和给药方案来实现。还应当理解的是,本发明的流体和糖皮质激素类固醇(例如,布地奈德)或其任一种的生理学功能衍生物,不论同时或序贯地提供,均可单独施用,多次施用或其任意组合。一般而言,在交替疗法(2)期间,连续地施用有效剂量的每种化合物,而在共制剂疗法(1)中,一同施用有效剂量的两种或两种以上的化合物。

[0168] 本发明的组合可方便地提供为以单位剂型中的药物制剂。方便的单位剂型包括每个单位剂型1mg至1g范围内任何量的活性成分,例如但不限于:10mg至300mg。本发明流体与例如糖皮质激素类固醇(例如,布地奈德)组合的协同作用可在例如1:50至50:1(本发明流体:糖皮质激素类固醇(例如,布地奈德))的较大比率范围内实现。在一个实施方案中,该比

率可在约1:10至10:1的范围内。在另一实施方案中，在共同配制组合剂型(例如丸剂、片剂、囊片或胶囊)中，本发明流体与糖皮质激素类固醇(例如，布地奈德)的重量比为约1，即本发明流体与糖皮质激素类固醇(例如，布地奈德)的量大致相等。在其他示例性的共制剂中，存在或多或少的本发明流体与糖皮质激素类固醇(例如，布地奈德)。在一种实施方案中，每种化合物将以当单独使用时展示抗炎活性时的量在组合中使用。所述组合的化合物的其他比率和量包括在本发明的范围内。

[0169] 单一剂型可进一步包括本发明的流体和例如糖皮质激素类固醇(例如，布地奈德)，或它们任一种的生理学功能衍生物和药学可接受的载体。

[0170] 本领域技术人员将会理解到的是需要用于治疗的本发明的组合中活性成分的量根据各种因素而变化，各种因素包括待治疗的病症的性质和患者的年龄和状况，并且最后由主治医师或保健医生来判断。待考虑的因素包括施用途径、制剂的性质、动物的体重、年龄和一般状况以及待治疗的病症的性质和严重性。

[0171] 将单一剂型中活性成分中的任意两种组合用于与第三种活性成分同时或相继地施用也是可能的。三组分组合可同时或相继地施用。当相继地施用时，该组合可进行两次或三次施用。根据特定实施方案，本发明的流体和糖皮质激素类固醇(例如，布地奈德)的三组分组合可以任何顺序施用。

[0172] 根据具体的方面，本发明的动电学改变的流体具有用于治疗TSLP和/或TSLPR介导的病症的实质效用，所述病症包括但不限于本文所公开的示例性种类的适应证。根据另外的方面，本发明的动电学改变的流体具有用于治疗所述示例性种类的多种亚类的效用，其中所述种类的至少一个适应证不包含在所述亚类的每一个中。

[0173] 实施例1

[0174] (证明本发明的动电学流体与沙丁胺醇的协同作用)

[0175] 综述。在本领域公认的人支气管收缩的动物模型(人哮喘模型)中，本发明的动电学改变的流体与沙丁胺醇在体内提供了协同的延长作用(例如支气管收缩的抑制)，由此减少了患者对沙丁胺醇的使用。在本实施例中公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0176] 第一试验。在第一个实验中，结合乙酰甲胆碱诱导的支气管收缩评估十六只豚鼠支气管扩张剂对呼吸道功能的影响。在确定最佳给药后，以50μg/mL对每只动物进行给药以递送每只动物在250μL中的12.5μg的硫酸沙丁胺醇的靶剂量。该研究是重量和基线PenH值的随机区组设计。两个组(A和B)接受了250μL的在一种或两种稀释剂中的50μg/mL的硫酸沙丁胺醇的气管内灌注：组A是已通过本发明装置、没有添加氧的去离子水，而组B是本发明的富含气体水。使用Penn Century微型喷雾器用溶液对每组进行气管内给药。此外，使动物分批通过BUXCO体积描记设备以便在供给该体积描记器和该记录设备的喷雾器内同等地代表每个治疗组。在沙丁胺醇施用后2小时显示其基线PenH值的至少75％的动物不被包括在数据分析中。这个排除标准基于过去的研究，其中未能观察到支气管扩张剂的支气管保护可能与给药错误有关。作为结果，将对照组的一只动物从数据分析中去掉。一旦动物有大于50％的支气管收缩，则认为该动物未受到保护。结果表明组B动物的50％受保护不发生支气管收缩达10小时(在这个时间测试被终止)。

[0177] 第二试验。使用更大数目的动物进行另外一组实验来评估本发明的动电学产生的

流体(例如,RDC1676-00、RDC1676-01、RDC1676-02和RDC1676-03)当在雄性豚鼠中单独施用或作为硫酸沙丁胺醇的稀释剂时针对乙酰甲胆碱诱导的支气管收缩的保护作用。

[0178] 材料和方法。豚鼠(Cavia porcellus)是购自Charles River Canada公司(St.Constant,Quebec,Canada)的Hartley白化病种,Crl:(HA)BR。重量:在治疗的开始是大约325±50g;组的数目是32,其中每组7只雄性动物(加上来自同一批次动物的24只备用动物)。饮食;除了在指定的程序期间以外所有动物自由享用标准的检定合格的颗粒状商品化实验室饮食(PMI检定合格的豚鼠5026;PMI Nutrition International Inc.)。施用途径是通过PennCentury微型喷雾器的气管内灌注和通过全身吸入的乙酰甲胆碱的激发。选择气管内途径以对测试物品/对照溶液的肺部暴露最大化。已选择全身吸入激发用于乙酰甲胆碱的激发以便激起上气道超敏反应(即支气管收缩)。治疗的持续时间是一天。

[0179] 实验设计。在TA/对照施用后2小时,使所有动物经历乙酰甲胆碱的吸入暴露(500μg/ml)。所有动物接受250μl剂量体积。因此,将硫酸沙丁胺醇稀释(在对照物品和4个测试物品中)到0、25、50和100μg/ml的浓度。在给药前三十分钟,在这四种测试物品溶液(RDC1676-00、RDC1676-01、RDC1676-02;和RDC1676-03)的每一种的1 Ox储备液(500μg/ml)中配制4个不同浓度的硫酸沙丁胺醇的溶液(0、25、50和100μg/ml)。硫酸沙丁胺醇的这些浓度也被配制在非动电学产生的对照流体(对照1)中。通过对每种储备溶液进行适当稀释制备了给药溶液。所有储备液和给药溶液一旦制备即被保持在冰上。在制作测试/对照物品之后一小时内完成给药。在给药当天制备乙酰甲胆碱的溶液(500μg/ml)。

[0180] 每只动物使用Penn Century微型喷雾器接受测试物品或对照物品的气管内灌注。对动物整夜禁食并使用异氟烷麻醉,借助喉镜(或适合的替代物)使喉暴露并且将微型喷雾器的尖端插入到气管中。施用250μl/动物的剂量体积的测试物品或对照。使用补充来自Buxco bias流泵的空气的aeroneb超声喷雾器使乙酰甲胆碱气溶胶产生进入到混合室的空气入口中。这个混合室进而供给四个单独的全身无限制的体积描记器,每个运行借助于位于排气管线中的门阀而保持在微小的负压下。使用真空泵来以需要的流速抽空吸入室。

[0181] 在该研究的主要阶段开始之前,将12只备用动物分配成3组(n=4/组)以确定动物可能暴露于乙酰甲胆碱从而诱导严重的但非致命的急性支气管收缩的最大暴露时间。将四只动物暴露于乙酰甲胆碱(500μg/ml)中30秒,并且在气溶胶开始后测量呼吸参数达10分钟。适当地调整乙酰甲胆碱喷雾器浓度和/或气溶胶化的暴露时间以诱导严重的但非致命的急性/可逆的支气管收缩,如通过阴茎中的瞬时提高所表征的那样。

[0182] 在测试物品施用之前一次(-1天)并且在给药后2、6、10、14、18、22和26小时再次将动物放在所述室中,并且在针对乙酰甲胆碱的气溶胶激发开始后使用Buxco Electronics BioSystem XA系统测量通气参数(潮气量、呼吸速率、导出的分钟量)和增强暂停Penh持续10分钟的时间。一旦动物在室的基线之内,则记录这些值持续1分钟,之后乙酰甲胆碱、500μg/mL的喷雾器浓度被气溶胶化持续30秒,将动物暴露于气溶胶持续另外10分钟,在此期间连续地评定通气参数。Penh被用作支气管收缩的指标;Penh是从最大吸气流量、最大呼气流量和呼气时间获得的导出值。Penh=(最大呼气流量/最大吸气流量)*(呼气时间/呼出65%的呼气量的时间-1)。

[0183] 在给药前的乙酰甲胆碱激发过程中未显示严重的急性支气管收缩的动物被更换。在给药后2小时显示基线PenhPenes值的至少75%的任何动物不被包括在数据分析中。将呼

吸参数记录为20秒的方式。将认为是非生理学的数据从进一步分析中排除。对经15分钟时间段的Penh改变进行作图并且Penh值被表示为曲线下面积。数字数据进行组平均值和标准差的计算(当适用时)。

[0184] 结果。由此实验获得的结果显示,在不存在沙丁胺醇的情况下,当在26小时的时间内测量时,本发明的动电学产生的流体的施用对基线PenH值的平均百分比没有明显影响。然而出人意料地,在本发明的动电学产生的流体(在测试的所有氧水平的值;环境氧水平、20ppm、40ppm和60ppm)中配制的沙丁胺醇的施用(示出25μg沙丁胺醇/动物的各组的代表数据)与对照流体相比导致沙丁胺醇的抗支气管收缩效应的惊人的延长。即,乙酰甲胆碱结果显示沙丁胺醇延长支气管扩张达至少26小时。本申请人还示出在RDC1676与生理盐水对照之间在所有的氧水平存在一致的差异。结合所有的4种RDC1676流体,总的治疗与生理盐水的差异的p值是0.03。

[0185] 因此,根据具体的方面,本发明的动电学产生的溶液提供了与沙丁胺醇的协同延长效应,由此提供了患者沙丁胺醇用量的减少,实现更有效的有成本效益的药物使用、更小的副作用,并且增加了可以对患者进行治疗且响应于沙丁胺醇的治疗所经过的时段。

[0186] 实施例2

[0187] (测定本发明的动电学改变的流体对细胞因子表达的作用)

[0188] 综述。当与对照流体相比时,本发明的动电学改变的流体降低了促炎细胞因子(IL-1β,TNF-α,IL-6和GM-CSF)、趋化因子(IL-8,MIP-1α,RANTES和嗜酸细胞活化趋化因子(Eotaxin))、炎性酶(iNOS,COX-2和MMP-9)、变应原反应(MHC II类、CD23、B7-1和B7-2)以及Th2细胞因子(IL-4、IL-13和IL-5)的产生;并且与对照流体相比,会增多抗炎细胞因子(例如IL1R-α、TIMP)。在本实施例中公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0189] 在具体的方面,用处于Revalesio富氧流体或对照流体中的T3抗原或PHA刺激人的混合的淋巴细胞,并且评估了IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-17、嗜酸细胞活化趋化因子、IFN-γ、GM-CSF、MIP-1β、MCP-1、G-CSF、FGFb、VEGF、TNF-α、RANTES、瘦素(Leptin)、TNF-β、TFG-β和NGF的改变。如所示的那样,所测试的促炎细胞因子(IL-1β、TNF-α、IL-6和GM-CSF)、趋化因子(IL-8、MIP-1α、RANTES和嗜酸细胞活化趋化因子)、炎性酶(iNOS、COX-2和MMP-9)、变应原反应(MHC II类、CD23、B7-1和B7-2)和Th2细胞因子(IL-4、IL-13和IL-5)相比于对照流体在测试流体中减少。相比之下,所测试的抗炎细胞因子(例如IL1R-α、TIMP)相比于对照流体在测试流体中增加。

[0190] 另外,申请人使用用于评定变应性超敏反应的本领域认可的涉及卵白蛋白敏化作用的模型系统。研究的终点是该反应的特定细胞学和细胞组分以及蛋白和LDH的血清学测量。进行细胞因子分析,包括嗜酸细胞活化趋化因子、IL-1A、IL-1B、KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1A、RANTES、TNF-A和VCAM的分析。

[0191] 简言之,将雄性Brown Norway大鼠经腹膜内注射0.5mL的处于包含氢氧化铝($Al(OH)_3$)(200mg/mL)的溶液中的卵白蛋白(OVA)Grade V(A5503-1G,Sigma)(2.0mg/mL),在第1、2和3天各一次。该研究是处理(4组)的随机化2x2阶乘排列。在允许免疫反应发生的两周等待时段之后,要么将大鼠暴露要么用RDC1676-00(通过Revalesio专有装置处理的无菌盐水)和RDC1676-01(通过添加了额外氧的Revalesio专有装置处理的无菌盐水)处理一周。在每天一次的一周的处理结束时,将2个组一分为二并且每个组中50%的大鼠通过吸入接受

盐水或OVA激发。

[0192] 具体而言，在开始的系列化后十四天，通过吸入将12只大鼠暴露于RDC 1676-00连续7天每天30分钟。将通过该系统的空气流速设定在10升/分钟。将全体12只大鼠排列在饼式室(pie chamber)中，所述饼式室具有雾化材料以进入并均等地分布到Aeroneb的12个子室的单入口。

[0193] 在开始的敏化后十五天，通过超声波雾化将12只大鼠暴露于RDC1676-01连续7天每天30分钟。使用相同的喷雾器和室，也将气流设定为10升/分钟。首先将RDC 1676-00雾化并且在RDC 1676-01雾化之前使Aeroneb室彻底干燥。

[0194] 在最后的雾化处理后大约2小时，将RDC 1676-00组的6只大鼠再次用OVA(盐水中的1％)激发，所述OVA是使用Penn Century微型喷雾器(1A-1B型)通过气管内(intratreacheal)灌注来递送的。RDC 1676-00组的另外6只大鼠用盐水激发作为通过气管内(intratreacheal)灌注递送的对照组。第二天，RDC 1676-01组重复该程序。

[0195] 再次激发后二十四小时，通过超剂量的戊巴比妥钠使每组中的所有大鼠安乐死。从下腔静脉采集全血样品并置于两个不等的血液采集管中：Qiagen PAXgene™血液RNA管和Qiagen PAXgene™血液DNA管。处理肺器官以获得支气管肺泡灌洗(BAL)流体和肺组织用于RT-PCR以评定已知与这个模型中肺部炎症有关的细胞因子表达的标志物的改变。采用单侧灌洗技术以便保存在肺的右侧的4个肺叶的完整性。灌洗左边的“大”肺叶，而将右侧4个肺叶扎起来并立即放入TRI-zol™中，匀浆，并送到实验室做进一步处理。

[0196] BAL分析。收集肺灌洗液并且在4℃以600-800g离心10分钟以使细胞沉淀。将上清液转移到新管中并且在-80℃冷冻。将支气管灌洗流体(“BAL”)分成两个等份。将第一等份离心下来，并且将上清液在碎干冰上迅速冷冻，置于-80℃，并且运送到实验室用于进一步处理。存在的蛋白和LDH的量分别表明血液血清蛋白(该蛋白是当其在这个实验中被激发时渗漏通过膜的血清组分)的水平和细胞死亡。专有的测试侧示出比对照略少的蛋白。

[0197] 对第二等份支气管灌洗流体的总蛋白和LDH含量进行评估以及使其经历细胞学检查。处理组示出总细胞大于盐水对照组。此外，相比于对照组在处理组中存在嗜酸性粒细胞的增加。处理组相比于对照组也存在多形核细胞的略微不同。

[0198] 血液分析。通过转移1.2-2.0mL血液到管中并且使其凝结成块至少30分钟来分析全血。保存剩余的血液样品(大约3.5-5.0mL)用于使用TRI-zol™或PAXgene™的RNA提取。接下来，将凝结成块的血液样品于室温下在1200g离心10分钟。将血清(上清液)去除并置于两个新管中，并且将血清储存在-80℃。

[0199] 对于利用Tri-Reagent(TB-126，Molecular Research Center，Inc.)的RNA提取，将0.2mL的全血或血浆加到0.75mL的TRI Reagent BD中，每0.2mL的全血或血浆补充20μL的5N乙酸。将管摇动并储存在-80℃。利用PAXgene™，将管在室温下孵育大约两小时。然后将管放置在它们一边并且储存在-20℃冰箱中24小时，然后转移至-80℃长期储存。

[0200] Luminex分析。通过Luminex平台，利用微珠分析作为抗体相关结合反应的基质，其以光度单位读数并且可与量化标准进行比较。每个血液样品作为两份样品同时运行。测量的单位是光度单位并且将这些组分成OVA激发的对照、OVA激发的处理和用专有流体的盐水激发的处理。

[0201] 对于Agilant基因阵列数据的产生，将肺组织分离并浸在TRI Reagent(TR118，

Molecular Research Center,Inc.)中。简言之,将大约1mL的TRIReagent加入到每个管内50-100mg组织中。使用玻璃Teflon™或Polytron™均质器使样品在TRI Reagent中匀浆。将样品储存在-80℃。

[0202] 从血液样品获得的结果。将每个血液样品分为2份样品,并且2份样品同时运行。测量的单位是光度单位,这些组从左到右是:OVA激发的对照;OVA激发的Revalesio处理;接着是盐水激发的盐水处理;和盐水激发的Revalesio处理。为了使查看容易,两个RDC1676-01组用灰色阴影的背景凸显,而对照盐水处理组具有无阴影的背景。

[0203] 一般来说,在左边两组的比较中,尽管RDC1676-01组数据的扩展稍大,RDC1676-01组中的具体细胞因子水平整体上小于对照处理组中的样品;通常两组之间约30%的数值差异。一般来说,在最右侧两组的比较中,RDC1676-01组与RDC1676-00组相比具有略高的数值。

[0204] 本申请人认为,在使用本发明的动电学改变的流体处理后而产生的RANTES(IL-8超家族)的水平低于由仅暴露于盐水组所产生的RANTES的水平。本申请人证明,与由仅暴露于盐水组产生的MCP-1相比,本发明的动电学改变的流体使得MCP-1以较低的水平产生。本申请人认为,在使用本发明的动电学改变的流体处理后而产生的TNFα的水平低于由仅暴露于盐水组所产生的TNFα的水平。

[0205] 此外,本申请人证明在使用本发明的动电学改变的流体处理后而产生的MIP-1α的水平低于由仅暴露于盐水组所产生的MIP-1α的水平。本申请人证明,与由仅暴露于盐水组产生的IL-1α相比,本发明的动电学改变的流体使得IL-1α以较低的水平产生。本申请人观察到,在使用本发明的动电学改变的流体处理后而产生的Vcam的水平低于由仅暴露于盐水组所产生的Vcam的水平。本申请人观察到,在使用本发明的动电学改变的流体处理后而产生的IL-1β的水平低于由仅暴露于盐水组所产生的IL-1β的水平。申请人证明,与由仅暴露于盐水组产生的嗜酸细胞活化趋化因子和MCP-3相比,本发明的动电学改变的流体使得嗜酸细胞活化趋化因子和MCP-3以较低的水平产生。

[0206] 总之,针对已知的敏化作用的炎症反应的这种标准测定至少在血液样品中产生显著的临床影响和血清学影响。另外,尽管大量的对照动物在这个过程中具有生理上的应激并且几乎死亡,RDC1676-01处理组均未示出此类临床应激效应。然后这反映在细胞因子的循环水平中,其中在OVA激发组的RDC1676-01处理组与RDC1676-01处理组之间大约30%的差异。相比之下,在RDC1676-01处理组与非OVA激发组的RDC1676-01处理组之间的细胞因子、细胞和血清学概况上存在小的且相当不显著的改变,这可能只代表流体本身的最小基线改变。

[0207] 实施例3

[0208] (测定本发明的动电学改变的流体调整T细胞增殖的作用)

[0209] 综述。本发明的动电学改变的流体改善了调节性T细胞的功能,如通过相对降低的增殖显示。在本实施例中公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0210] 通过辐射抗原呈递细胞并引入抗原和T细胞研究了本文公开的具体实施方案调节T细胞的能力。通常,这些受刺激的T细胞增殖。然而,在引入调节性T细胞时,通常的T细胞增殖被抑制。

[0211] 方法。简言之,在分选中使用的FITC缀合的抗CD25(ACT-1)抗体购自

DakoCytomation(Chicago,IL)。所使用的其他抗体如下:CD3(可溶条件的HIT3a)、GITR(PE缀合的)、CD4(Cy-5和FITC缀合的)、CD25(APC缀合的)、CD28(CD28.2克隆)、CD127-APC、粒酶A(PE缀合的)、FoxP3(BioLegend)、小鼠IgG1(同种型对照)和XCL1抗体。所有抗体根据制造商的说明书来使用。

[0212] CD4+T细胞是用CD4+Rosette试剂盒(Stemcell Technologies)从外周全血中分离的。将CD4+T细胞与抗CD127-APC、抗CD25-PE和抗CD4-FITC抗体一起孵育。通过流式细胞术使用FACS Aria将细胞分选为CD4+CD25hiCD127lo/nTreg和CD4+CD25-应答T细胞。

[0213] 在圆底96孔微量滴定板中进行抑制测定。如所示加入3.75x103CD4+CD25neg应答T细胞、3.75x103自体T reg、3.75x104同种异体的受辐射的去除CD3的PBMC。所有孔补充以抗CD3(克隆HIT3a在5.0μg/ml)。在补充以10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中于37℃下将T细胞培养7天。在孵育结束之前十六小时,向每个孔加入1.0mCi的^{3}H-胸腺嘧啶核苷。使用Tomtec细胞收集器对板进行收集,并且使用Perkin Elmer闪烁计数器确定^{3}H-胸腺嘧啶核苷的掺入。抗原呈递细胞(APC)由外周血单核细胞(PBMC)组成,使用StemSep人CD3+T细胞去除(StemCell Technologies)去除T细胞,紧接着40Gy的辐射。

[0214] 用抗CD3和抗CD28条件刺激调节性T细胞,然后用Live/Dead Red活力染料(Invitrogen)和表面标志物CD4、CD25和CD127染色。将细胞固定在Lyze/Fix PhosFlow™缓冲液中并且在变性的PermbufferIII®中透化。然后将细胞用针对每种具体选定分子的抗体染色。

[0215] 使用GraphPad Prism软件进行统计分析。通过使用双尾、不成对的斯氏t检验对两个组作比较。通过使用单因子方差分析(1-way ANOVA)对三组作比较。认为小于0.05的P值是显著的(双尾)。如果r值大于0.7或小于-0.7(双尾),通过斯皮尔曼系数确定两组之间的相关性在统计学上是显著的。

[0216] 结果。通过用柴油机排气颗粒物(PM,来自EPA)刺激细胞研究调节性T细胞的增殖。申请人确定用PM(无Rev,无Solis)刺激的细胞导致分泌的IL-10的减少,而在本公开的流体的存在下暴露于PM的细胞("PM+Rev")导致与盐水和培养基对照(无PM)相比IL-10的产生持平或仅略微减少。此外,将白喉毒素(DT390,一种截短的白喉毒素分子;饱和商品化浓度的1:50稀释)滴定到本发明的流体样品中,并且阻断Rev介导的IL-10增加的效应。注意,用Rev单独处理导致与盐水和培养基对照相比更高的IL-10水平。用GITR、粒酶A、XCL1、pStat5和Foxp3分别获得了相似的结果。

[0217] 申请人还获得了AA PBMC数据,该数据获自评估类胰蛋白酶的外周血单核细胞(PBMC)的变应性哮喘(AA)的概况。该AA PBMC数据与以上T调节性细胞数据是一致的,因为用颗粒物(PM)刺激的细胞示出高水平的类胰蛋白酶,而用PM处理的细胞在本公开的流体的存在下("PM+Rev")导致类似于盐水和培养基对照的显著降低的类胰蛋白酶水平。与来自T调节性细胞的数据一致,暴露于DT390阻断了Rev介导的对类胰蛋白酶水平的影响,导致如对于单独的PM(-Rev;无Rev,无Solis)所看到的细胞中升高的类胰蛋白酶水平。用Rev单独处理导致与盐水和培养基对照相比更低的类胰蛋白酶水平。

[0218] 总之,申请人观察到相对于对照流体(无Rev,无Solis)中的PM,在PM和Rev的存在下增殖减少,表明本发明的动电学产生的流体Rev改善了调节性T细胞的功能,如通过该测定中相对减少的增殖所示。此外,证据表明β阻断、GPCR阻断和钙通道阻断影响Rev对Treg功

能的活性。

[0219] 实施例4

[0220] (测定本发明的动电学改变的流体与布地奈德之间的协同作用)

[0221] 综述。在本领域公认的用于变应性哮喘的动物模型中,本发明的动电学改变的流体提供了与布地奈德协同的体内抗炎作用。本实施例公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0222] 申请人初步进行了实验以评估本发明的动电学产生的流体(例如RDC-1676-03)在Brown Norway大鼠卵白蛋白敏化模型中的气道抗炎特性。Brown Norway大鼠是用于确定测试材料对气道功能的影响的领域认可的模型,并且这个品系已被广泛地用作例如变应性哮喘的模型。在这个模型中由卵白蛋白敏化所诱导的气道病理学和生物化学的改变与在人类中观察到的改变相似(Elwood等人,J Allergy Clin Immuno 88:951-60,1991;Sirois & Bissonnette,Clin Exp Immunol 126:9-15,2001)。选择吸入途径以使对测试材料或对照溶液的肺部暴露最大化。在卵白蛋白激发之前将卵白蛋白敏化的动物用布地奈德单独处理或者与测试材料RDC 1676-03组合处理7天。在激发后6小时和24小时,测量了总的血细胞计数和几种蛋白质及抗炎细胞因子的水平以及各种呼吸参数来估计施用该测试材料对各种炎症参数的任何有益的影响。

[0223] 材料和方法:

[0224] Bn/Crl品系的Brown Norway大鼠是从Charles River Kingston获得,在实验的开始称重大约275±50g。所有的动物研究在PCS-MTL国际动物照管和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)的批准下进行。在该研究期间,动物的使用和照管根据美国国家研究委员会以及加拿大动物照管委员会的准则进行。

[0225] 敏化。在实验的第1天,通过施用1ml腹膜内注射的新鲜制备的每1ml 0.9%氯化钠2mg的卵白蛋白/100mg氢氧化铝的溶液对动物(每个处理组中14只动物)进行敏化,接着在第3天重复注射。

[0226] 处理。在开始的敏化后十五天,使动物经历于对照(生理盐水)或测试溶液(动电学产生的流体RDC1676-00、RDC1676-02和RDC-1676-03)之下的喷雾暴露,单独施用或者与布地奈德组合施用,连续7天每天一次持续15分钟。在大约20L的全身室中对动物进行给药,并且从Buxco偏流泵供给空气,使用aeroneb超声喷雾器使测试大气产生进入该室的空气入口。将气流速度设定在10升/分。

[0227] 卵白蛋白激发。在第21天,在用测试溶液处理后2小时,所有动物用1%卵白蛋白雾化溶液激发15分钟(在全身室中以2L/min的气流)。

[0228] 样品采集。在卵白蛋白激发后6小时和24小时的时间点,采集血液样品用于总血细胞计数和分类血细胞计数以及用于测量各种蛋白质和抗炎细胞因子的的水平。此外,在卵白蛋白激发后立即和在卵白蛋白激发后6小时及24小时,使用Buxco Electronics BioSystem XA系统测量增强的暂停Penh和潮气量持续10分钟的时段。

[0229] 结果:

[0230] 嗜酸性粒细胞计数:如预期的那样,用布地奈德("NS+布地奈德750μg/Kg",画有浓密交叉阴影线的条图)进行的处理与用生理盐水"NS"单独的对照进行的处理相比在激发的动物中降低了总嗜酸性粒细胞计数。另外,而用本发明的流体"RDC1676-03"单独处理不显

著降低嗜酸性粒细胞计数，尽管如此，它展示出在降低嗜酸性粒细胞计数中与布地奈德的明显协同作用(“RDC1676-03+布地奈德750μg/Kg”)。类似地，嗜酸性粒细胞％也反映了相似的趋势。而单独的RDC1676-03或布地奈德750μg/kg对激发的动物中的嗜酸性粒细胞％计数并不具有显著效应，这二者结合显著地降低了嗜酸性粒细胞％。

[0231] 因此，申请人确定，根据具体方面，本发明的动电学产生的流体(例如RDC1676-03)在本领域认可的人变应性哮喘的大鼠模型中与布地奈德联合具有显著降低嗜酸性粒细胞计数(“嗜酸性粒细胞％”和总计数)的显著协同效用。

[0232] 呼吸参数：

[0233] 申请人还证明，在卵白蛋白激发后立即、6小时和24小时所测量的测试流体对Penh和潮气量的观察到的作用。Penh是从最大吸气流量、最大呼气流量和呼气时间获得的派生值，并且penh值的下降反映了肺功能有利的结果。

[0234] Penh＝(最大呼气流量/最大吸气流量)*(呼气时间/呼出65％的呼气量的时间-1)。

[0235] 用布地奈德(以500μg/kg和750μg/kg二者)单独处理或与任何测试流体联合处理不能在激发后立即显著影响Penh值。然而，在激发后6小时，用RDC1676-03单独处理或与布地奈德500μg/kg或750μg/kg联合处理的动物显示Penh值的显著下降。尽管这种下降程度到激发后24小时减小，在这个时间点仍观察到布地奈德与RDC流体的协同作用的趋势。

[0236] 潮气量是在平静呼吸过程中吸气期间从终末呼气位置被吸入到肺中的空气的容积，所述空气在呼气期间被动地离开肺。用布地奈德单独处理的动物示出在激发后即刻潮气量没有改变。然而，甚至在这个早期时间点单独的RDC1676-03对潮气量也没有显著的刺激性作用。并且再次，与布地奈德(500μg/kg和750μg/kg)联合的RDC1676-03对这个时间点的潮气量测量具有更加显著的影响。在激发后六小时，单独的RDC1676-03足以引起潮气量的显著增加并且单独或组合地将布地奈德加入到处理方案中对潮气量没有添加的效应。然而，在这些早期时间点所观察到的任何效应到24小时的时间点消失了。

[0237] 综观来说，这些数据显示RDC1676-03单独或与布地奈德联合提供了对气道炎症的显著缓解，如通过在激发后6小时潮气量的增加和Penh值的减少所证明的。

[0238] 细胞因子分析：

[0239] 为了分析在以上讨论的生理学参数上看到的效应的机制，在生理学测量之后立即测量了在激发后6小时和24小时所采集的血液样品中的许多蛋白质以及抗炎细胞因子。

[0240] 申请人观察到单独的Rev 60(或RDC1676-03)在激发后6小时和24小时都显著降低了嗜酸细胞活化趋化因子的血液水平。布地奈德750μg/kg在这两个时间点也降低血液嗜酸细胞活化趋化因子的水平，而布地奈德250μg/kg在后面的时间点仅有值得注意的作用。然而，单独的测试溶液Rev60示出比在两个时间点的两个布地奈德的浓度显著更有力(在降低血液嗜酸细胞活化趋化因子的水平中)的作用。嗜酸细胞活化趋化因子是已知在变态反应中积累和吸引嗜酸性粒细胞到哮喘肺和其他组织(例如在克罗恩病中的肠)中的小的C-C趋化因子。嗜酸细胞活化趋化因子与G蛋白偶联受体CCR3结合。CCR3被许多细胞类型例如Th2淋巴细胞、嗜性细胞和肥大细胞表达，但是这种受体被Th2淋巴细胞表达特别令人感兴趣，因为这些细胞调控嗜酸性细胞的募集。几项研究已经显示在哮喘性肺中嗜酸细胞活化趋化因子和CCR3的产生增加以及在这些分子与气道高反应性之间建立联系(综述于Eotaxin

and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung(嗜酸细胞活化趋化因子与吸引嗜酸性细胞到哮喘性肺),Dolores MConroy和Timothy J Williams Respiratory Research 2001,2:150-156中)。

[0241] 综观来说,这些结果强烈地表明用RDC1676-03单独或与布地奈德组合进行的处理可显著地降低在卵白蛋白激发后24小时血液中的嗜酸性粒细胞的总计数和%。这与早在激发后6小时所观察到的血液中嗜酸细胞活化趋化因子水平的显著下降相关。

[0242] 作为Rev 60单独或与布地奈德组合处理的结果,两种主要关键抗炎细胞因子IL10和干扰素γ的血液水平也在激发后6小时显著增强。申请人分别观察到对干扰素γ和IL10的此类效应。单独的Rev 60或与布地奈德250μg/kg联合的Rev 60在直至激发后6小时显著提高激发动物的IL10的血液水平。类似地,Rev 60单独或与布地奈德250μg/kg或750μg/kg联合在激发后6小时显著提高IFNγ的血液水平。这些抗炎细胞因子的增加可能至少部分地很好地解释在激发后6小时在生理学呼吸参数上所看到的有益效应。在激发后24小时不再观察到对这些细胞因子的作用(数据未示出)。

[0243] Rante或CCL5是由循环T细胞表达的细胞因子并且对于T细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性细胞是趋化性的,并且具有募集白细胞到炎症部位中的活性作用。Rante也激活嗜酸性粒细胞来释放例如嗜酸性阳离子蛋白。它改变嗜酸性粒细胞的密度并且使它们变得低密度,这被认为代表广泛细胞活化的状态。它也是对于嗜酸性粒细胞特异的氧化代谢的有力激活剂。

[0244] 申请人观察到在用Rev 60单独或与布地奈德250μg/kg或750μg/kg联合处理的动物中激发后6小时而不是24小时显著降低了Rante的全身水平。再一次,布地奈德750μg/kg与Rev 60存在清楚的协同作用。对于许多其他的促炎症细胞因子例如KC或IL8、MCP3、IL1b、GCSF、TGFb以及NGF来说,在用Rev60单独或与布地奈德联合处理的动物中在激发后6小时或24小时观察,观察到类似的向下趋势。

[0245] 实施例5

[0246] (测定本发明的动电学改变的流体对细胞间的紧密连接的作用)

[0247] 综述本发明的动电学改变的流体显示出能够调整细胞间的紧密连接。本实施例中公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0248] 根据具体的方面,本发明的扩散器处理的治疗性流体具有调节细胞间紧密连接的实质效用,包括与多肽(包括示例性多肽鲑鱼降钙素(sCT))的肺部和全身递送以及生物利用度相关的那些效用。

[0249] 实施例综述。鲑鱼降钙素(sCT)是具有3,432道尔顿分子量的32个氨基酸的肽。降钙素的肺部递送已经在模型系统(例如,啮齿类模型系统、大鼠模型系统等等)中被广泛研究以调查增强肺部药物递送的方法(例如,气管内药物递送)。根据具体的示例性方面,本发明的扩散器处理的治疗性流体具有调节(例如增强)细胞间紧密连接的实质效用,例如与大鼠模型系统中sCT的肺部和全身递送及生物利用度相关的那些效用。

[0250] 方法:

[0251] 气管内药物递送。根据具体的实施方案,将sCT配制在本发明的治疗性流体中并且使用气管内药物递送装置向给大鼠施用。在某些方面,使用为啮齿类气管内药物递送设计的Penn Century微型喷雾器装置,允许良好的肺部递送,但是如本领域所理解的,其中相对

低的肺泡沉积导致肽的全身生物利用度不良。根据具体的方面，使用这种领域认可的模型系统来证实本发明的扩散器处理的治疗性流体具有调节(例如增强)细胞间紧密连接的实质效用，包括与多肽的肺部和全身递送及生物利用度相关的那些效用。

[0252] 动物分组和给药。在某些方面，将大鼠分配给3组之一(每组n＝6)：a)无菌盐水；b)无O_2富集的基础液(“基础液”)；或c)本发明的扩散器处理的治疗性流体(“本发明的富集的基础液”)。本发明的富集的基础液是例如通过在0.9％的盐水中注入氧而形成的。优选地，该基础液包含约0.9％的盐水以使上皮细胞的低渗破坏的可能性减到最小。在某些实施方案中，将sCT分别重溶在基础液和本发明的富集的基础液中，并且将各自的溶液在60分钟之内通过气管内灌注递送到各自的动物组(每只动物递送200μL中的10μg sCT)。

[0253] 测定。在具体的方面，采集血液样品(例如200μl)并且在给药之前以及在给药后5、10、20、30、60、120和240分钟放到EDTA涂布的管中。收集血浆并储存在＝-70℃直到使用ELISA测定sCT。

[0254] 对于Agilant基因阵列数据的产生，将肺组织分离并浸没在TRIReagent(TR118，Molecular Research Center，Inc.)中。简言之，将大约1mL的TRI Reagent加入到每个管内的50-100mg组织中。使用玻璃Teflon™或Polytron™均质器使样品在TRI Reagent中匀浆。将样品储存在-80℃。

[0255] 结果：

[0256] 紧密连接的增强。申请人观察到RDC1676-01(通过本专有装置处理的具有添加的额外的氧的无菌盐水；本公开的富含气体的动电学产生的流体(Rev))减少了sCT的全身递送和生物利用度。根据具体的方面，减少的全身递送由sCT的吸附减少所引起，最可能由肺部紧密连接的增强所引起。RDC1676-00表示根据本公开的方法处理但没有氧合的无菌盐水。

[0257] 另外，根据具体的方面，紧密连接相关蛋白在肺组织中被上调。申请人分别示出了连接黏附分子JAM 2和JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4和GJA5(连接黏附素)、OCLN(闭合蛋白)、封闭蛋白(claudin)(例如CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1(紧密连接蛋白1)的上调。

[0258] 实施例6

[0259] (测定本发明的动电学改变的流体对全细胞电导的影响)

[0260] 综述。如通过在支气管上皮细胞(BEC)上进行的膜片钳术分析所证明的那样，本发明的动电学改变的流体降低了全细胞电导。在灌注了本发明的动电学改变的流体(RNS-60)的支气管上皮细胞(BEC)上进行的膜片钳分析揭示暴露于RNS-60导致全细胞电导的降低。另外，用急剧提高全细胞电导的cAMP刺激“鸡尾酒(cocktail)”进行的刺激也提高了全细胞电导的药物敏感部分，其比在基础条件下观察到的高十倍。在本实施例中公开的结果还公开在本申请人的WO 2009/055729中。

[0261] 进行膜片钳研究以进一步证实本发明的动电学产生的流体通过调节以下至少一种来调节细胞内信号转导的效用：膜结构、膜电位或膜电导率、膜的蛋白或受体、离子通道和钙依赖性细胞信息传递系统。

[0262] 综述。申请人显示缓激肽与B2受体的结合是浓度依赖性的，并且与生理盐水相比在本公开的动电学产生的流体(例如Rev；富含气体的动电学产生的流体)中增加了结合亲和力。另外，申请人显示，在用颗粒物(PM)刺激的T调节性细胞的情况下，相对于对照流体

(无Rev,无Solis)中的PM,在PM和Rev的存在下T调节性细胞的增殖减少,表明本发明的动电学产生的流体Rev改善了调节性T细胞的功能;例如,如通过该测定中相对减少的增殖所示。此外,暴露于本发明的流体导致与盐水和培养基对照(无PM)相比IL-10的产生持平或只略微减少。同样,在用颗粒物(PM)刺激的外周血单核细胞(PBMC)的变应性哮喘(AA)的特征的背景下,数据示出暴露于本公开的流体("PM+Rev")导致类似于盐水和培养基对照的类胰蛋白酶水平的显著降低。另外,白喉毒素(DT390)的效应表明β阻断、GPCR阻断和钙通道阻断影响动电学产生的流体对Treg和PBMC功能的活性。此外,申请人证明,根据其他方面,当暴露于本发明的流体时,紧密连接相关的蛋白在肺组织中被上调。申请人分别显示了连接黏附分子JAM2和JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4和GJA5(连接黏附素)、OCLN(闭合蛋白)、封闭蛋白(例如CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1(紧密连接蛋白1)的上调。进行膜片钳研究来进一步调查和证实所述效用。

[0263] 材料和方法:

[0264] 在膜片钳研究中使用支气管上皮细胞系Calu-3。使Calu-3支气管上皮细胞(ATCC# HTB-55)生长在补充以10%FBS到玻璃盖片上的Ham's F12与DMEM培养基的1:1混合物中直到实验时间。简言之,使用全细胞电压钳装置来测量对暴露于本发明的动电学产生的流体(例如RNS-60;包含60ppm的溶解氧的动电学处理的生理盐水;有时称作"药物")的Calu-3细胞的作用。

[0265] 利用膜片钳技术来评定测试材料(RNS-60)对上皮细胞膜的极性和离子通道活性的作用。具体而言,在由以下组成的浴溶液中对支气管上皮细胞系Calu-3进行全细胞电压钳:135mM NaCl、5mM KCl、1.2mMCaCl2、0.8mM MgCl2和10mM HEPES(用N-甲基D葡萄糖胺将pH调整到7.4)。对基础电流进行测量,在这之后使RNS-60灌注到细胞上。

[0266] 更具体而言,用两阶段的Narishige PB-7垂直的拉出器(puller)将膜片吸管从硼硅玻璃(Garner Glass Co,Claremont,CA)中拉出,然后用Narishige MF-9显微拉制仪(Narishige International USA,East Meadow,NY)将其火抛光(fire-polish)到6-12莫姆之间的阻抗。使所述吸管充满细胞内溶液,所述细胞内溶液包含(以mM计):135KCl、10NaCl、5EGTA、10Hepes,pH用NMDG(N-甲基-D-葡萄糖胺)调整到7.4。

[0267] 将培养的Calu-3细胞放在包含以下细胞外溶液(以mM计)的室中:135NaCl、5KCl、1.2CaCl2、0.5MgCl2和10Hepes(游离酸),pH用NMDG调整到7.4。

[0268] 使用Olympus IX71显微镜(Olympus Inc.,Tokyo,Japan)的40X DIC物镜观察细胞。在建立细胞黏附的千兆欧封口(gigaseal)后,施加轻柔的抽吸以破入并获得全细胞构型。在破入时立即对细胞给予-120、-60、-40和0mV的电压钳位并且用±100mV之间的电压阶跃(500ms/阶跃)进行刺激。在采集对照条件下的全细胞电流后,用测试流体通过浴槽灌注相同的细胞,所述测试流体包含与以上对照流体相同的细胞外溶质和pH,并且用相同的方案记录不同的保持电位下的全细胞电流。

[0269] 用在10kHz低通过滤的Axon Patch 200B放大器获取电生理数据并且用1400A Digidata(Axon Instruments,Union City,CA)进行数字化。使用pCLAMP 10.0软件(Axon Instruments)来获取并分析该数据。通过到这一步将大约400毫秒的实际电流值对保持电位(V)作图获得电流(I)与电压(V)的关系(全细胞电导)。I/V关系的斜率是全细胞电导。

[0270] 药物和化学品。无论何时指出,用包含8-Br-cAMP(500mM)、IBMX(异丁基-1-甲基黄

嘌呤，200mM)和福尔马林(10mM)的cAMP刺激性鸡尾酒(混合物)刺激细胞。从水溶液中的25mM储备液中使用cAMP的类似物8-Br-cAMP(Sigma Chem.Co.)。从包含10mM福尔马林和200mM IBMX储备溶液的DMSO溶液中使用福尔马林(Sigma)和IBMX(Sigma)。

[0271] 膜片钳的结果：

[0272] 申请人测定了基础(无cAMP)条件下的全细胞电流，采用从零mV保持电位步进到+/-100mV的方案。对n＝12个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是灌注测试溶液同时的全细胞描记)。获得综合“δ”描记，其是通过从对照条件下的值减去测试平均值而获得的。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在两种条件下都是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导的适中但显著的改变。对全细胞电导的贡献即由药物(本发明的动电学产生的流体)抑制的分量也是线性的，并且反转电位是在零mV附近。在超极化条件下存在全细胞电导的降低。

[0273] 另外，申请人测定了基础条件下的全细胞电流，采用从-40mV保持电位步进到±100mV的方案。对n＝12个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是灌注测试溶液同时的全细胞描记)。通过从对照条件下的值减去测试平均值获得综合“δ”描记。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在两种条件下都是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导的适中但显著的改变。对全细胞电导的贡献即由药物(本发明的动电学产生的流体)抑制的分量也是线性的，并且反转电位是在零mV附近。各个值与零mV方案获得的值比较相似。

[0274] 申请人测定了基础条件下的全细胞电流，采用从-60mV保持电位步进到±100mV的方案。对n＝12个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是灌注测试溶液同时的全细胞描记)。通过从对照条件下的值减去测试平均值获得综合“δ”描记。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在两种条件下均是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导的较小但显著的改变。对全细胞电导的贡献即由药物抑制的分量也是线性的，并且反转电位是在零mV附近。各个值与零mV方案获得的值比较相似。

[0275] 申请人还测定了基础条件下的全细胞电流，采用从-120mV保持电位步进到±100mV的方案。对n＝12个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是灌注测试溶液同时的全细胞描记)。通过从对照条件下的值减去测试平均值获得综合“δ”描记。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在两种条件下都是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导的较小但显著的改变。对全细胞电导的贡献即由药物抑制的分量也是线性的，并且反转电位是在零mV附近。各个值与零mV方案获得的值比较相似。

[0276] 另外，申请人测定了cAMP刺激条件下的全细胞电流，其采用从各个保持电位步进到±100mV的方案而获得。代表性描记是n＝5个细胞的平均值。对n＝12个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是cAMP刺激后的全细胞描记，紧接着用含药物的溶液灌注)。通过从对照条件下(单独的cAMP)的值减去药物+cAMP的测试平均值获得综合“δ”描记(对应于零mV，和-40mV时的电压方案)。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在所有条件下都是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导改变。

[0277] 申请人证明了在cAMP刺激条件下的全细胞电流，其采用从各个保持电位步进到±100mV的方案获得。对n＝5个细胞的平均值制作代表性描记(对照，紧接着是cAMP刺激后的全细胞描记，紧接着用含药物的溶液灌注)。通过从对照条件下(单独的cAMP)的值减去药物

+cAMP的测试平均值获得综合“δ”描记(-60mV,和-120mV时的电压方案)。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在所有条件下都是高度线性的并且反映了由于测试条件所引起的电导改变。

[0278] 申请人还证明了保持电位对cAMP激活的电流的作用。在不同电压方案(0、-40、-60、-120mV保持电位)下观察到药物(本发明的动电学产生的流体;RNS-60;包含60ppm溶解氧的动电学处理的生理盐水)对全细胞电导的作用。在基础条件下,药物敏感的全细胞电流在所有保持电位都是相同的(电压不敏感的贡献)。然而在cAMP激活的情况中,药物敏感的电流要高得多,并且对施加的电压方案敏感。电流与电压的关系是高度非线性的。这也在减去的电流中观察到了,其中对于每一个方案(n=5)进一步减去全细胞电导在零mV的贡献。

[0279] 实施例概述。因此,根据具体的方面,数据表明在基础条件下存在适中但一致的药物(本发明的动电学产生的流体;RNS-60;包含60ppm溶解氧的动电学处理的生理盐水)作用。为了增强药物对全细胞电导的作用,通过在刺激后使药物灌注cAMP刺激的“鸡尾酒”(这急剧提高全细胞电导)也进行了实验。令人感兴趣的是,这个方案也提高了全细胞电导的药物敏感部分,其比在基础条件下所观察到的高十倍。另外,在cAMP刺激的存在下,药物对于各种电压方案示出不同的作用,表明所述动电学产生的流体影响全细胞电导的电压依赖性贡献。电导的线性分量也存在降低,进一步表明至少药物有助于抑制另一途径(例如,离子通道、电压门控的阳离子通道等等)。

[0280] 在具体的方面并且不受机制束缚,申请人的数据与本发明的动电学产生的流体(例如RNS-60;包含60ppm溶解氧的动电学处理的生理盐水)是一致的,所述动电学产生流体在被封闭或从质膜回收的通道上产生改变。

[0281] 综观申请人的其他数据,本发明的具体方面提供了用于调整细胞内信号转导的组合物和方法,包括的膜结构、膜电位或膜电导率、膜蛋白或膜受体、离子通道和钙依赖性细胞信号传导系统中的至少一种的调整,包括使用本发明的动电学产生的溶液来提供膜结构(例如膜和/或膜的蛋白、受体或其他组分)中的电化学和/或构象的改变,所述膜结构包括但不限于GPCR和/或g蛋白,和TSLP。根据另外的方面,这些效应调节基因表达,并且可维持对例如个体信息传递成分的半衰期等的依赖性。

[0282] 实施例7

[0283] (测定本发明的动电学改变的流体对全细胞电导的作用)

[0284] 综述。对灌注了本发明动电学产生的流体(RNS-60和Solas)的Calu-3细胞进行的膜片钳分析表明(i)暴露于RNS-60和Solas使得全细胞电导增加,(ii)孵育15分钟时证明,细胞暴露于RNS-60使非线性电导率增加,和(iii)细胞暴露于RNS-60使RNS-60盐水对钙离子可通透通道产生作用。申请人进行了膜片钳研究,以进一步证实本文中所描述的本发明动电学产生的盐水流体(RNS-60和Solas)的效用(包括调节全细胞电流的效用)。进行了两组实验。

[0285] 第一组实验数据的总结表明,Solas盐水中获得的全细胞电导(电流-电压关系)在两个孵育时间(15分钟,2小时)和所有的电压方案中都是高度线性的。但是,Solas中孵育较长时间(2小时)使全细胞电导增加是明显的。如δ电流(Rev减去Sol)所示,细胞暴露于RNS-60使非线性电导率增加,这仅在孵育15分钟时是明显的。而孵育2小时时,RNS-60对此非线性电流的作用消失,反而是高度线性的。如之前所观察到的,非线性全细胞电导的贡献是电

压敏感性的，尽管其存在于所有的电压方案中。

[0286] 第二组实验的数据总结表明，RNS-60盐水对非线性电流有作用，其在外部溶液钙离子浓度较高时很明显。非线性全细胞电导的贡献存在于所有的电压方案中，尽管其是电压敏感性的，并且其显示RNS-60盐水对钙离子可通透通道产生作用。

[0287] 第一组实验(电导率增加和非线性电压调节的电导率的活化)

[0288] 第一组实验的方法：

[0289] 常规的膜片钳方法见上。在下列第一组实验中，利用Calu-3细胞在基础条件下并利用从0mV保持电位、-120mV或者-60mV阶跃的方案进行膜片钳研究，以进一步证实本发明动电学产生的盐水流体(RNS-60和Solas)调节全细胞电流的效用。

[0290] 在各种情况下，从孵育15分钟或2小时的细胞中获得电流-电压关系中，并从该关系中得到全细胞电导。在本研究中，对于Solas或RNS-60盐水，在特定时间获得数据组。所获得的数据以5-9个细胞中全细胞电流的平均值±SEM表示。

[0291] 结果：

[0292] 图3A-C显示一系列膜片钳实验的结果，所述实验在两个时间点(15分钟(左组)和2小时(右组))和不同的电压方案中(A，从0mV阶跃；B，从-60mV阶跃；C，从-120mV阶跃)评价动电学产生的流体(例如RNS-60和Solas)对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。该结果表明，RNS-60(实心圆)比Solas(空心圆)对全细胞电导具有较大作用。在实验中，在3种电压方案中以及15分钟和2小时2个孵育时间点均观察到了相似的结果。

[0293] 图4A-C显示在3种电压方案中(“δ”电流)(A，从0mV阶跃；B，从-60mV阶跃；C，从-120mV阶跃)和2个时间点(15分钟(空心圆)和2小时(实心圆))，RNS-60电流数据减去Solas电流数据所得到的结果图。这些数据表明，RNS-60在15分钟的时间点时具有非线性电压依赖性分量，而在2小时时间点则没有。

[0294] 在之前的实验中，“正常”盐水的数据作为参照显示出非常一致的且时间非依赖性的电导率。通过将数据组与Solas或RNS-60盐水配对，得到本结果，并且该结果表明使Calu-3细胞暴露于RNS-60盐水在基础条件下(无cAMP，或者任何其他刺激)产生了时间依赖性效应，其与孵育时间较短(15分钟)时电压调节的电导率的活化相一致。该现象在2小时的孵育时间点并不明显。如本文另外所描述，当电导率在用cAMP“cocktail”刺激下增加时，线性分量更加明显。但是对于RNS-60和Solas，孵育2小时均表现出更高的线性电导率，并且在这种情况下，与单独的Solas相比，RNS-60盐水的电导率加倍。该证据表明，至少全细胞电导的两个贡献受到RNS-60盐水的影响，即非线性电压调节之电导率的活化以及线性电导率，所述影响在孵育时间较长时更加明显。

[0295] 第二组实验(对钙离子通道的作用)

[0296] 第二组实验的方法：

[0297] 常规的膜片钳方法见上。在下列第二组实验中，利用Calu-3细胞在基础条件下并利用从0mV或-120mV保持电位阶跃的方案进行附加的膜片钳研究，以进一步证实本发明动电学产生的盐水流体(RNS-60和Solas)调节全细胞电流的效用。

[0298] 在各种情况下，从在每种盐水中孵育15分钟的细胞中获得电流-电压的关系中，并从该关系中得到全细胞电导。为了确定钙离子通道对全细胞电导是否有贡献以及在RNS-60盐水中孵育是否影响这部分全细胞电导，孵育期后细胞在正常盐水中钳接(patched)(使外

部溶液中NaCl浓度较高，而内部溶液含有高浓度KCl)。随后用以CsCL替换了NaCl的溶液替代外部盐水，以确定替换了主要的外部离子后电导率是否发生变化。在这些条件下，随后使相同的细胞暴露于浓度逐渐增加的钙离子中，以使钙离子进入的步骤更加明显。

[0299] 结果：

[0300] 图5A-D显示一系列膜片钳实验的结果，所述实验利用不同的外部盐水和在不同的电压方案中(图板A和C显示从0mV的阶跃，而图板B和D显示从-120mV的阶跃)评价动电学产生的流体(例如Solas(图板A和B)和RNS-60(图板B和D))对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。在这些实验中使用15分钟的单个时间点。对于Solas(图板A和B)，结果表明：1)与对照(菱形符号)相比，利用CsCl(方形符号)而非NaCl作为外部溶液使全细胞电导以线性方式增加；和2)20mM $CaCl_2$(圆形符号)和40mM $CaCl_2$(三角形符号)均使全细胞电导以非线性方式增加。对于RNS-60(图板B和D)，结果表明：1)与对照(菱形符号)相比，利用CsCl(方形符号)而非NaCl作为外部溶液对全细胞电导几乎没有作用；和2)40mM $CaCl_2$(三角形符号)使全细胞电导以非线性方式增加。

[0301] 图6A-D显示对于Solas(图板A和B)和RNS-60(图板B和D)，在2种电压方案中(图板A和C，从0mV阶跃；以及图板B和D，从-120mV阶跃)从20mM $CaCl_2$(菱形符号)和40mM $CaCl_2$(方形符号)电流数据中减去CsCl电流数据(显示于图5中)所得到的结果图。结果表明，Solas和RNS-60均能够活化钙诱导的非线性全细胞电导。RNS-60的作用更显著(显示出剂量反应性)，并且RNS-60的作用仅在钙浓度较高时增加。此外，电压方案使得钙浓度较高时非线性钙依赖性电导率也增加了。

[0302] 对于Calu-3细胞中获得的全细胞电导数据，第二组实验的数据进一步表明了RNS-60盐水和Solas盐水的作用。数据显示，在任一盐水中孵育15分钟对全细胞电导产生不同作用，所述作用在RNS-60中以及当外部钙离子增加时最为明显，并且进一步表明RNS-60使全细胞电导的钙依赖性非线性分量增加。

[0303] 累计证据表明了Revalesio盐水对离子通道的活化作用，其对基础细胞电导率产生不同的贡献。

[0304] 纵观考虑申请人的其他数据(例如申请人其他工作实施例的数据)，本发明的具体方面提供了调节细胞内信号转导(包括调节膜结构、膜电位或膜电导率、膜蛋白或受体、离子通道、脂质组分，或者细胞可交换的细胞内组分(例如信号传导途径，如钙依赖性细胞信号传导系统)中的至少一种)的组合物和方法，包括利用本发明动电学产生的溶液使膜结构(例如膜和/或膜蛋白、受体或其他膜组分)发生电化学和/或构象变化，所述膜结构包括但不限于GPCR和/或g蛋白。根据附加的方面，这些作用调节基因表达，并且可以例如维持对个体信息传递成分等的半衰期的依赖性。

[0305] 实施例8

[0306] (研究本发明的动电学改变的流体对全细胞电导的作用，以及生成剂量响应曲线)

[0307] 综述。在本试验中，本申请人评估了动电学改变的流体(例如RNS-60)对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0308] 方法。常规的膜片钳方法见上。在以下试验中，进行膜片钳研究，以便进一步证实本发明的动电学产生的盐水流体(RNS-60)调整全细胞电流中的效用。具体而言，该试验评估了本发明的动电学产生的盐水流体的稀释液的作用。该溶液是通过将本发明的动电学产

生的盐水流体在正常的盐水中稀释成浓度为:100%(Rev),75%(3:4),50%(1:1),25%(4:3)和0%(Sal)而制得的。

[0309] 结果。图7A和B示出了一系列膜片钳试验的结果,所述试验评估了稀释的动电学产生的流体(例如RNS-60)对上皮细胞膜的极性和离子通道活性的作用。图板A证明了对于各种稀释样品的全细胞电导的电压相对于电流的变化,如图中所示(Rev,3:4,1:1,4:3;以及Sal)。图板B证明了稀释液与正常盐水相比较,稀释液量相对于电流改变的变化。结果表明RNS-60的作用机制为线性剂量响应方式。

[0310] 实施例9

[0311] (使用本发明的动电学产生的流体以及非动电学的对照压力罐流体对原代支气管上皮细胞(BEC)进行处理,使得气道炎症途径的两种关键蛋白质(MMP9和TSLP)的表达和/或活性降低)

[0312] 综述。申请人现在已经显示(使用Bio-Layer Interferometry生物传感器、Octet Rapid Extended Detection(RED)(forteBio™)),与生理盐水相比,在本公开的动电学产生的流体(例如Rev;富含气体的动电学产生的流体)的存在下,缓激肽与B2受体的结合是浓度依赖性的,并且亲和力增加。。另外,在用柴油机排气颗粒物(PM,标准的商品化来源)刺激的T调节性细胞的情况下,申请人的数据显示相对于对照流体(无Rev,无Solis)中的PM,在PM和Rev的存在下T调节性细胞的增殖减少,表明本发明的动电学产生的流体Rev改善了调节性T细胞的功能;例如,如通过该测定中相对减少的增殖所示。此外,暴露于本发明的流体导致与盐水和培养基对照(无PM)相比IL-10的产生持平或只略微减少。同样,在用颗粒物(PM)刺激的外周血单核细胞(PBMC)的变应性哮喘(AA)的概况的情况下,数据示出暴露于本公开的流体("PM+Rev")导致类似于盐水和培养基对照的类胰蛋白酶水平的显著降低。另外,白喉毒素(DT390,一种截短的白喉毒素分子;标准商品化浓度的1:50稀释液)导致β阻断、GPCR阻断和钙通道阻断影响动电学产生的流体对Treg和PBMC功能的活性。此外,申请人已经显示,当暴露于本发明的流体时,紧密连接相关的蛋白(例如,JAM 2和JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4和GJA5(连接黏附素)、OCLN(闭合蛋白)、封闭蛋白(例如CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1(紧密连接蛋白1)在肺组织中上调。此外,如膜片钳研究中所示,本发明的动电学产生的流体(例如RNS-60)影响在支气管上皮细胞(BEC;例如Calu-3)中全细胞电导的调节(例如在超极化条件下),并且根据其他方面,全细胞电导的调节反映了离子通道的调节。

[0313] 在这个实施例中,通过进行另外的实验来测量气道炎症途径的两种主要蛋白的产生的效应,申请人已扩展了这些发现。具体而言,在主支气管上皮细胞(BEC)中测定了MMP9和TSLP。

[0314] 材料和方法:

[0315] 将商购获得的人的原代支气管上皮细胞(BEC)(来自Promocell,Germany的HBEpC-c)用于这些研究。将大约50,000个细胞铺板于12孔板的每个孔中直至它们达到约80%的汇合。然后用生理盐水、对照流体Solas、非动电学对照压力罐流体或1:10稀释(在1ml的气道上皮生长培养基中的100ul)的测试流体Revera 60连同柴油机排气颗粒物(DEP或PM)一起处理细胞6小时,然后将细胞送去进行FACS分析。MMP9和TSLP受体的抗体均是从BD Biosciences获得并且按照制造商的说明书使用。

[0316] 结果:

[0317] 在图1和2中，DEP代表暴露于单独的柴油机排气颗粒物(PM，标准的商品化来源)的细胞，“NS”代表暴露于单独的生理盐水的细胞，“DEP+NS”代表用颗粒物在生理盐水的存在下处理的细胞，“Revera 60”是指仅暴露于测试材料的细胞，“DEP+Revera 60”是指在测试材料Revera60的存在下用颗粒物处理的细胞。此外，“Solas”和“DEP+Solas”分别代表暴露于单独的对照流体Solas或与颗粒物组合的细胞。“PP60”表示暴露于非动电学对照压力罐流体的细胞；以及“DEP+PP60”是指在非动电学对照压力罐流体(即，具有60ppm的溶解氧)的存在下使用颗粒物处理的细胞。

[0318] 图1示出测试材料Revera 60降低支气管上皮细胞(BEC)中的DEP诱导的TSLP受体表达大约90％。Solas导致DEP诱导的TSLP受体表达降低55％，而生理盐水不能产生相似水平的DEP诱导的TSLP受体表达的降低(大约20％的降低)。此外，非动电学对照压力罐流体PP60导致DEP诱导的TSLP受体的表达减少大约50％。

[0319] 鉴于最近的发现，本发明的Revera 60、Solas以及PP60溶液降低TSLP受体的表达的作用是一项重要发现，所述最近的发现显示TSLP在变应性哮喘的病理学和局部抗体介导的对TSLP受体功能缓解的变应性疾病的阻断中起关键作用(Liu，YJ，Thymic stromal lymphopoietin:Master switch for allergic inflammation(胸腺基质淋巴细胞生成素：变应性炎症的主开关)，J Exp Med 203:269-273，2006；Al-Shami等人，A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model(TSLP在哮喘模型的炎症发展中的作用)，J Exp Med 202:829-839，2005；和Shi等人，Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells(通过调控气道树突细胞TSLP受体缓解的变应性疾病的局部阻断)，Clin Immunol.2008，Aug 29.(印刷前的电子版))。

[0320] 同样，图2示出Revera 60、Solas、非动电学对照压力罐流体(PP60)和生理盐水对DEP介导的MMP 9的增加的影响。具体而言，Revera 60抑制支气管上皮细胞中DEP诱导的细胞表面结合的MMP9水平大约80％，并且Solas具有大约70％的抑制效应，而生理盐水(NS)具有约20％的降低的边际效应。此外，非动电学对照压力罐流体PP60导致DEP诱导的细胞表面附着的MMP9的水平减少大约30％。MMP-9是涉及哮喘中的气道炎症和支气管重塑的主要蛋白酶之一。最近，已显示MMP-9的水平在患有稳定型哮喘的患者中显著提高并且与健康的对照受试者相比在急性哮喘患者中甚至更高。MMP-9在气道炎症细胞的浸润和气道高反应性的诱导中起至关重要的作用，表明MMP-9可能在诱导和维持哮喘中具有重要作用(Vignola等人，Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis(痰金属蛋白酶-9/金属蛋白酶-1的组织抑制剂的比率与哮喘和慢性支气管炎中的气流阻塞相关)，Am J Respir Crit Care Med158:1945-1950，1998；Hoshino等人，Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma(吸入的皮质类固醇通过调节哮喘中基质金属蛋白酶-9和金属蛋白酶-1的组织抑制剂的表达的平衡来减少上皮下的胶原沉积)，J Allergy Clin Immunol 104:356-363，1999；Simpson等人，Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma(在嗜酸性和嗜中性哮喘中不同的蛋白水解酶活

性),Am J Respir Crit Care Med 172:559-565,2005;Lee等人,A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor(甲苯二异氰酸酯诱导的哮喘的鼠类模型可以用基质金属蛋白酶抑制剂处理),J Allergy Clin Immunol108:1021-1026,2001;and Lee等人,Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma(基质金属蛋白酶抑制剂通过降低ICAM-1和VCAM-1在甲苯二异氰酸酯诱导的哮喘的鼠类模型中的表达来调控炎症细胞的迁移),J Allergy Clin Immunol2003;111:1278-1284)。

[0321] 因此,根据其他方面,本发明的动电学产生的流体具有用于调整(例如降低)TSLP受体表达和/或用于抑制MMP-9的表达和/或活性的实质治疗效用,包括例如炎症和哮喘的治疗。

[0322] 根据另一个方面,本发明的非动电学对照压力罐流体(即,具有60ppm溶解氧)具有用于调整(例如减少)TSLP受体表达和/或抑制MMP-9的表达和/或活性的治疗用途,包括,例如用于治疗炎症和哮喘。不受任何机制所约束,本申请人的总体数据表明,非动电学对照压力罐流体在此系统中的作用由不同于本申请人的动电学产生的流体的机制介导。这不仅是因为所述作用相对较小,而且因为非动电学对照压力罐流体在使用本申请人的动电学产生的流体而显示出活性的其他测试中没有显示出活性。但是,本申请人发现本文公开的非动电学对照压力罐流体在此系统中的活性代表了这种压力罐流体在哮喘以及本文所公开的相关病症中的新的用途。

[0323] 因此,根据具体的方面,本发明的方法包括施用本申请人的动电学产生的流体,所述方法提供了调整作用(对TSLP表达和/或活性的下调)并适用于治疗选自TSLP介导的疾病中的至少一种疾病或病症,所述TSLP介导的疾病由免疫系统紊乱、变应性炎症、变应性气道炎症、DC介导的炎性Th2反应、特应性皮炎、特应性湿疹、哮喘、阻塞性气道疾病、慢性阻塞性肺病、和食物变态反应、炎性关节炎、类风湿性关节炎和银屑病组成。

[0324] 本文所公开的结果与本领域公认的、TSLP作为上皮细胞-DC界面处的变应性炎症的总开关的作用相一致(Yong-Jun等,J.Exp.Med.,203:269-273,2006);并且还与缺少TSLPR的小鼠的表型相一致(例如不会响应于吸入的抗原而发生哮喘;Zhou等,见上和Al-Shami等,J.Exp.Med.,202:829-839,2005);并且与使用抗TSLPR对OVA-DC进行预处理而得到的结果相一致(例如使得嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润、以及IL-4和IL-5的水平显著降低)。

[0325] 本发明公开的主题进一步阐明了TSLPR在DC引发的(primed)变应性疾病中具有一定作用,并且提供了新的组合物以及包括施用本申请人的动电学产生的流体的方法。

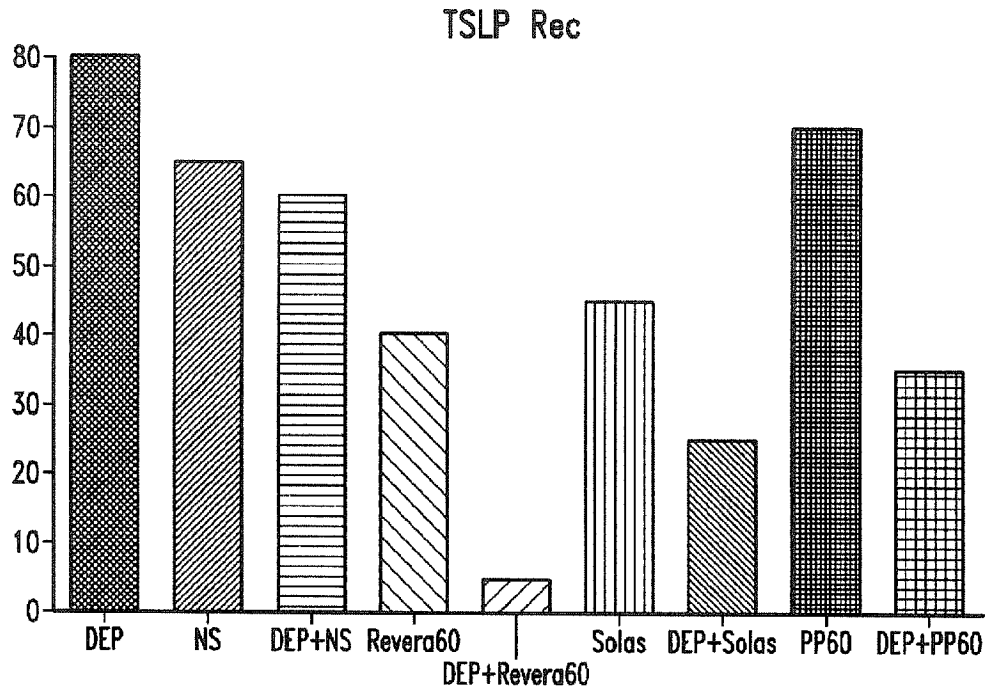
TSLP Rec
80
70
60
50
40
30
20
10
0
DEP
NS
DEP+NS
Revera60
DEP+Revera60
Solas
DEP+Solas
PP60
DEP+PP60

图1

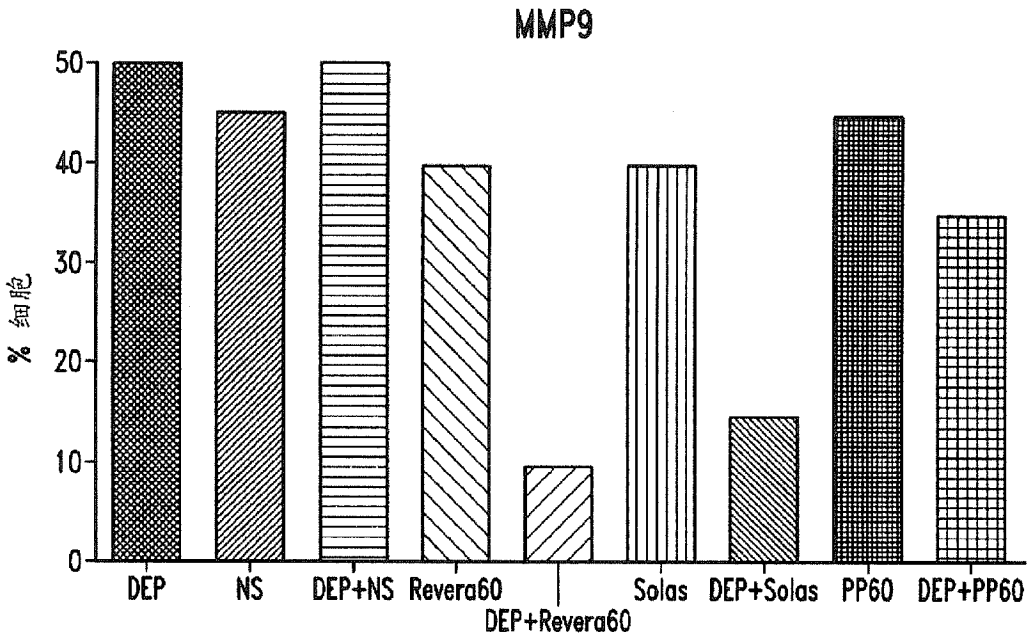
MMP9
% 细胞
50
40
30
20
10
0
DEP
NS
DEP+NS
Revera60
DEP+Revera60
Solas
DEP+Solas
PP60
DEP+PP60

图2

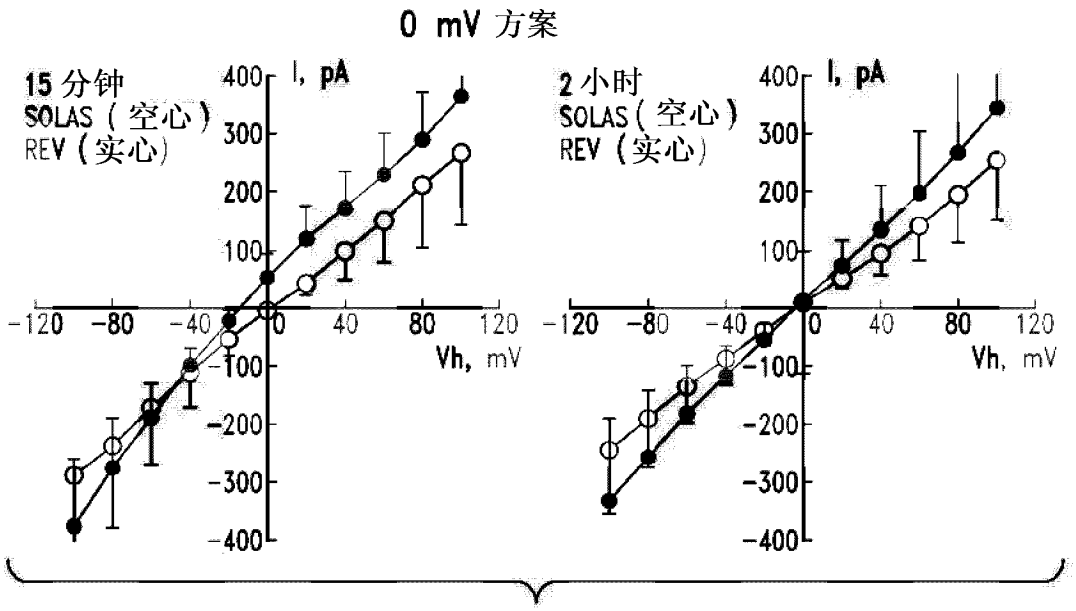
0 mV 方案
15 分钟
SOLAS（空心）
REV（实心）
I, pA
Vh, mV
2 小时
SOLAS（空心）
REV（实心）
I, pA
Vh, mV

图3A

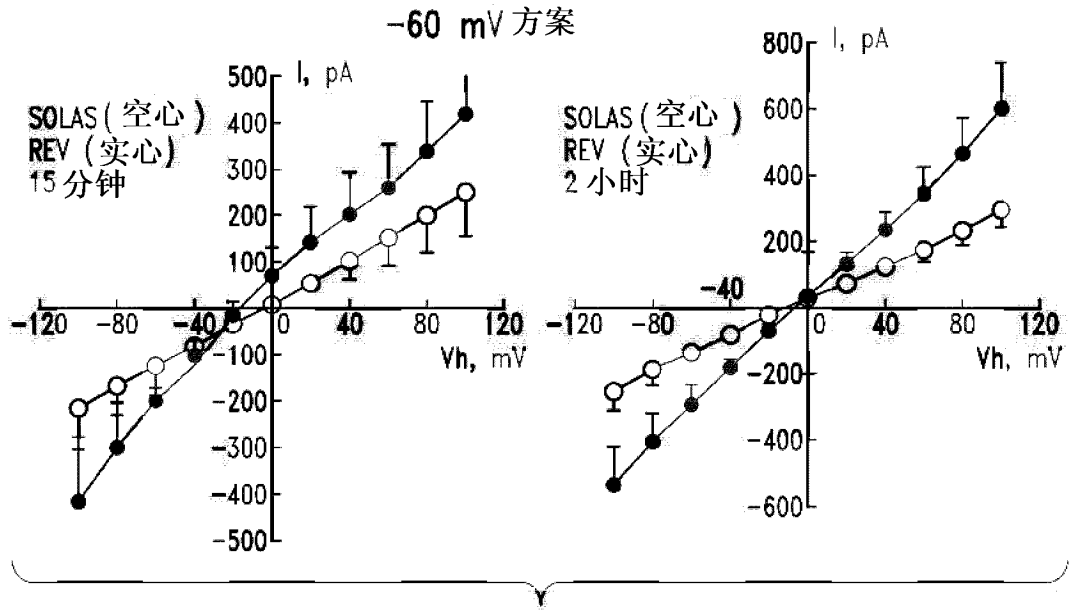
-60 mV 方案
SOLAS（空心）
REV（实心）
15 分钟
I, pA
Vh, mV
SOLAS（空心）
REV（实心）
2 小时
I, pA
Vh, mV

图3B

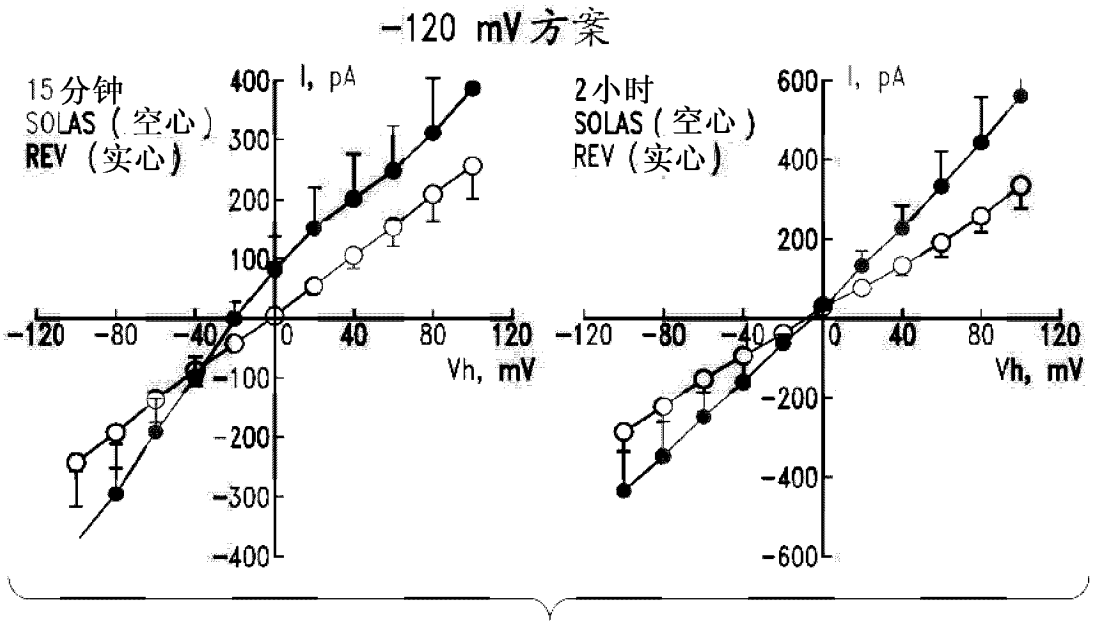
-120 mV方案
15分钟
SOLAS（空心）
REV（实心）
I, pA
400
300
200
100
-100
-200
-300
-400
-120
-80
-40
0
40
80
120
Vh, mV
2小时
SOLAS（空心）
REV（实心）
I, pA
600
400
200
-200
-400
-600
-120
-80
-40
0
40
80
120
Vh, mV

图3C

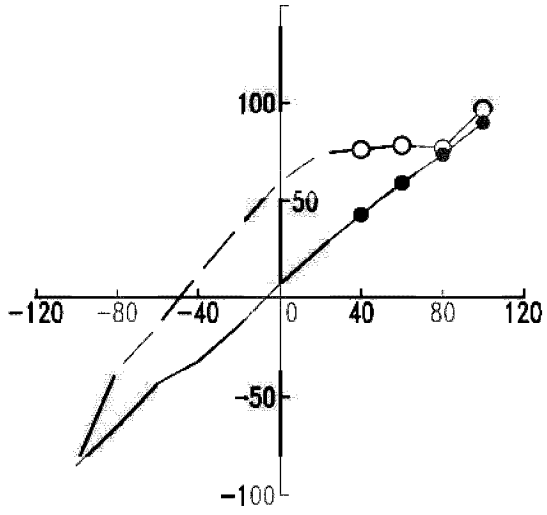
100
50
-50
-100
-120
-80
-40
0
40
80
120

图 4A

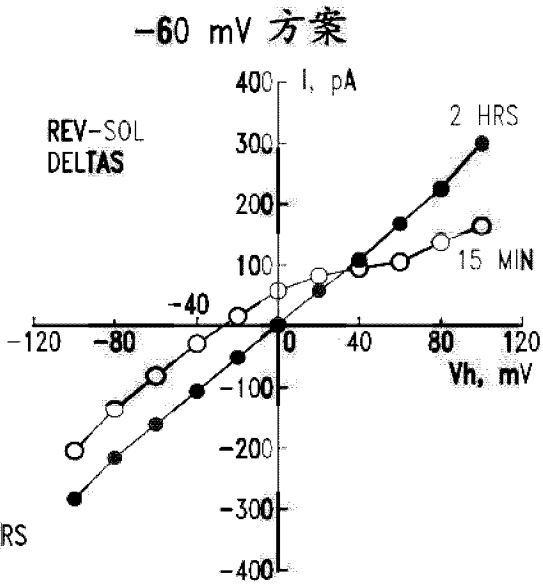
-60 mV 方案
I, pA
REV-SOL
DELTAS
2 HRS
15 MIN
400
300
200
100
-40
-100
-200
-300
-400
-120
-80
0
40
80
120
Vh, mV

图 4B

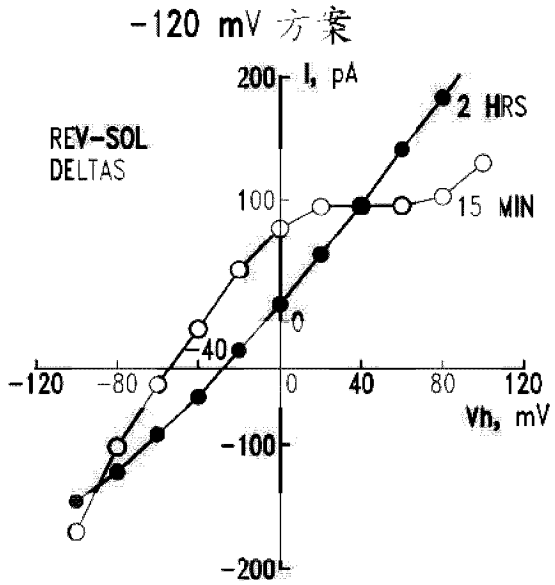
-120 mV 方案
I, pA
REV-SOL
DELTAS
2 HRS
15 MIN
200
100
0
-40
-100
-200
-120
-80
0
40
80
120
Vh, mV

图 4C

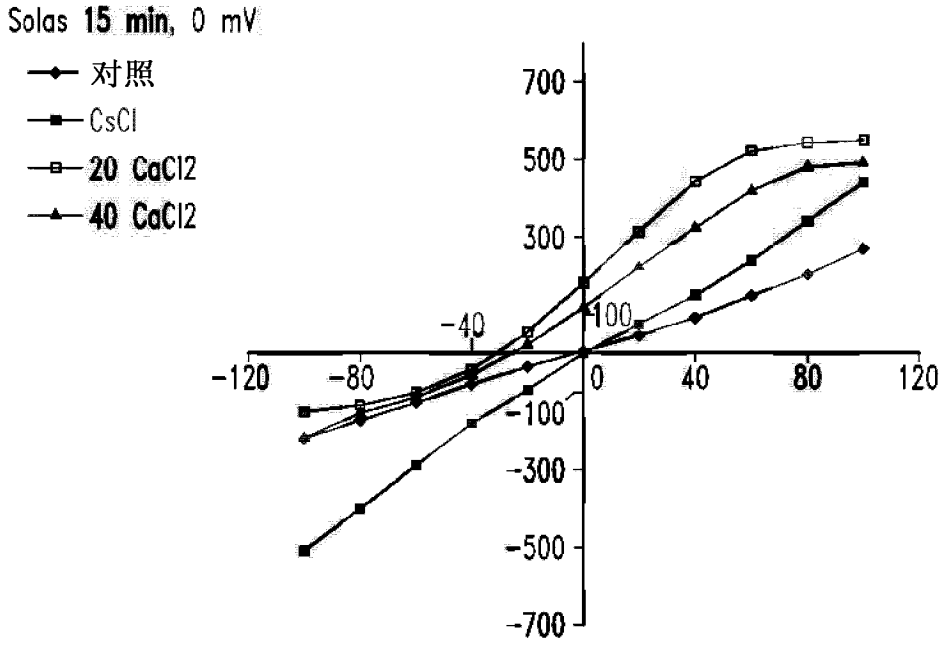
Solas 15 min, 0 mV
对照
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-40
-120
-80
0
40
80
120
-100
-300
-500
-700

图5A

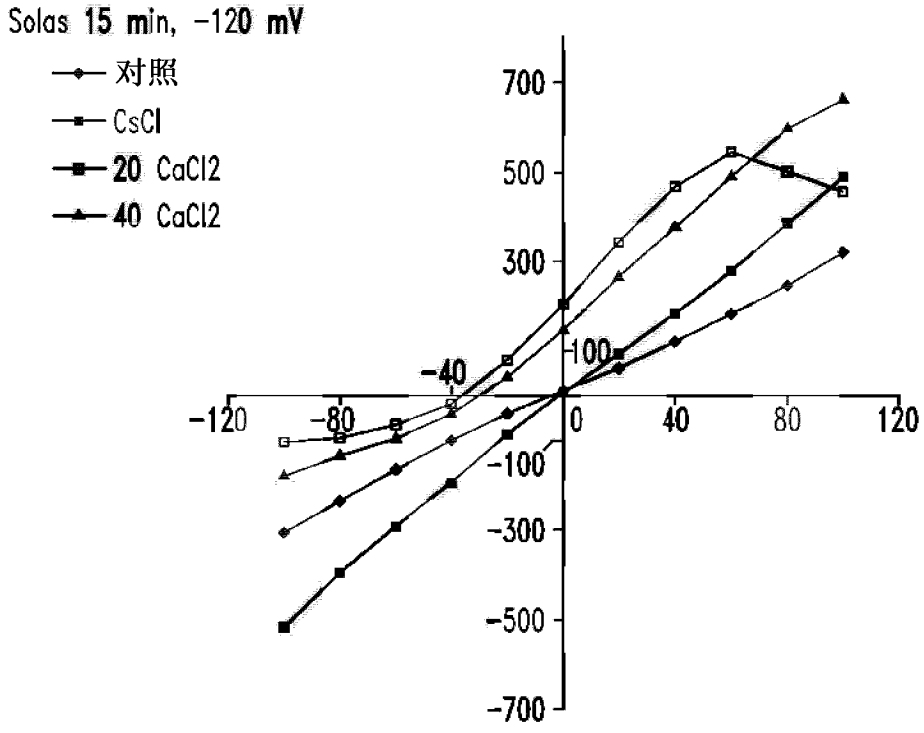
Solas 15 min, -120 mV
对照
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-40
-120
-80
0
40
80
120
-100
-300
-500
-700

图5B

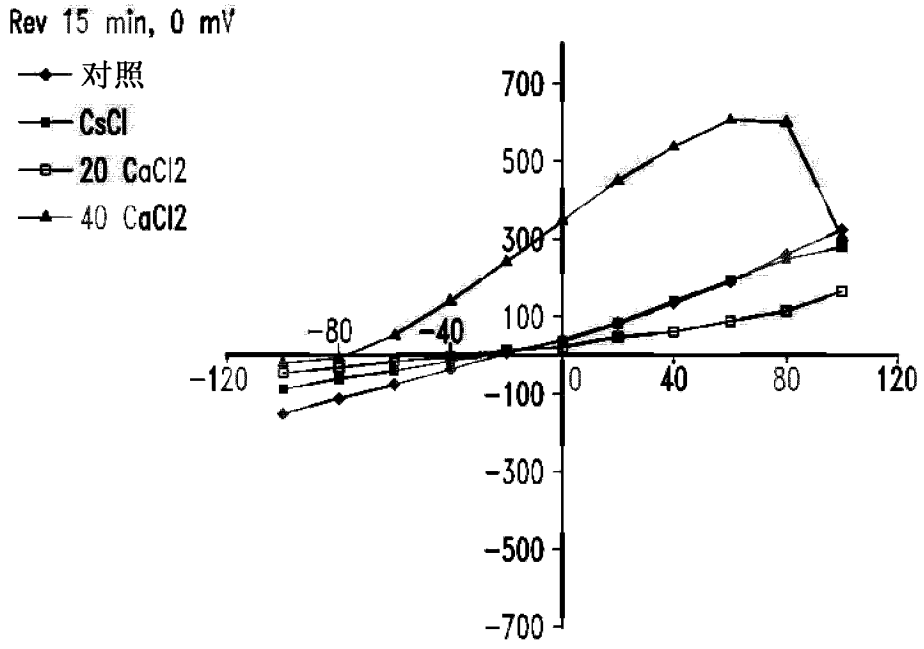
Rev 15 min, 0 mV
对照
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-80
-40
-120
0
40
80
120

图5C

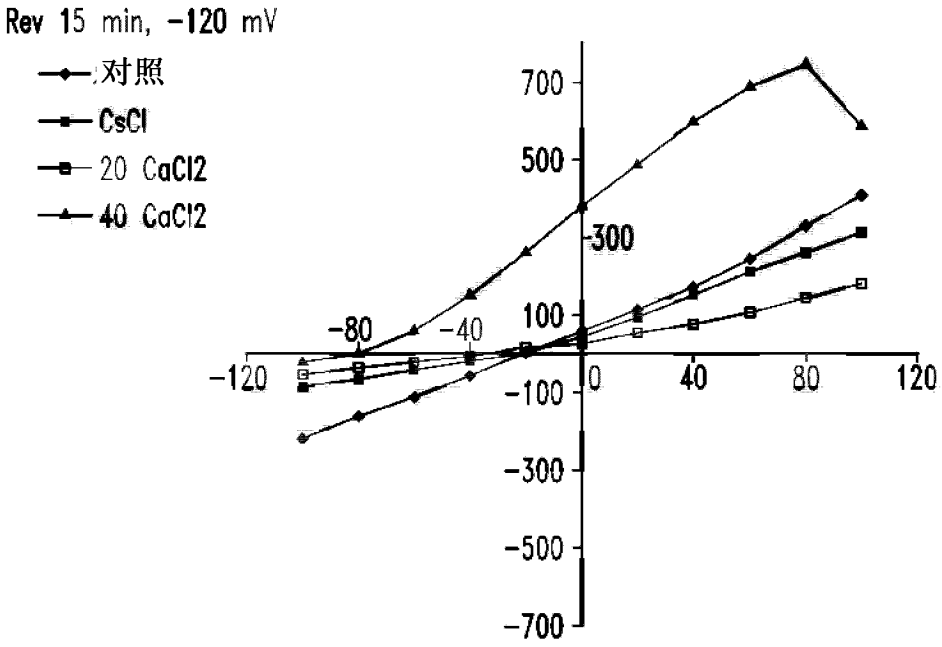
Rev 15 min, -120 mV
对照
CsCl
20 CaCl2
40 CaCl2
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-80
-40
-120
0
40
80
120

图5D

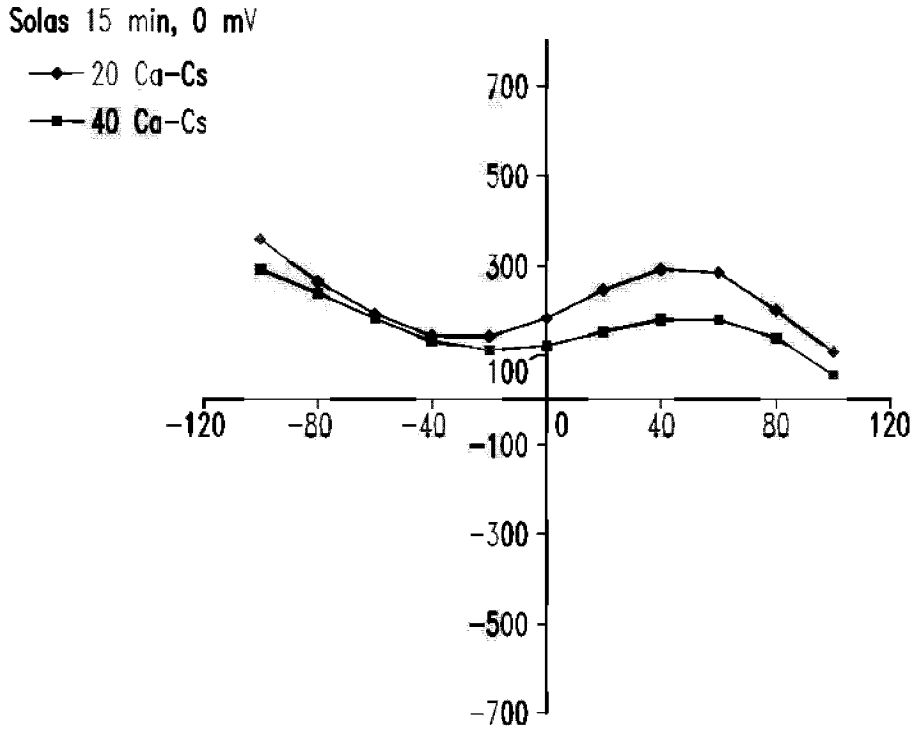
Solas 15 min, 0 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

图6A

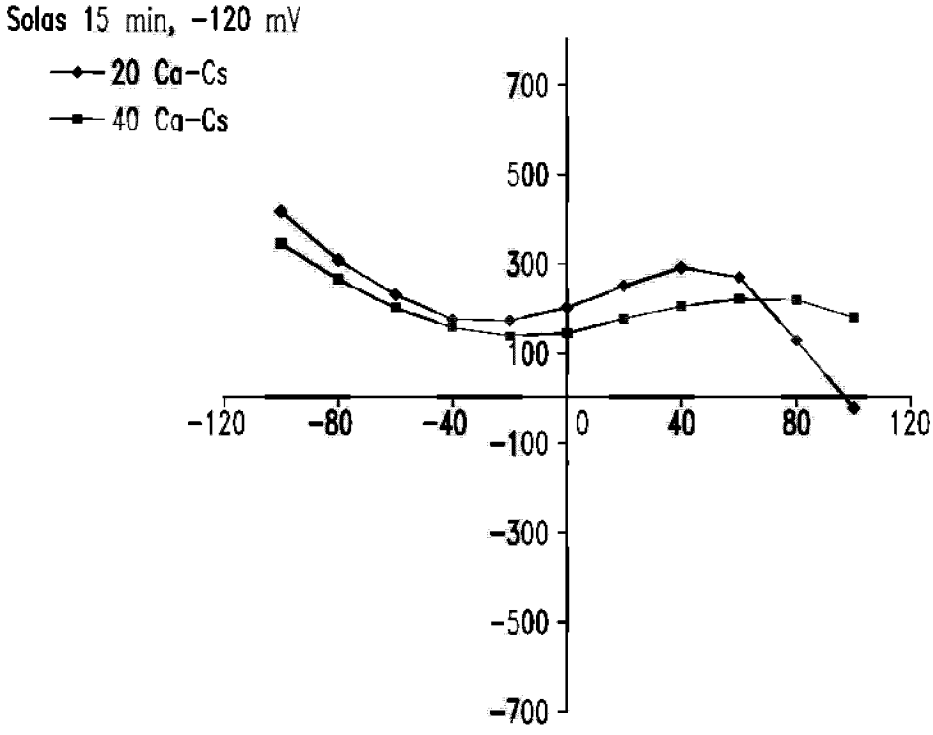
Solas 15 min, -120 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

图6B

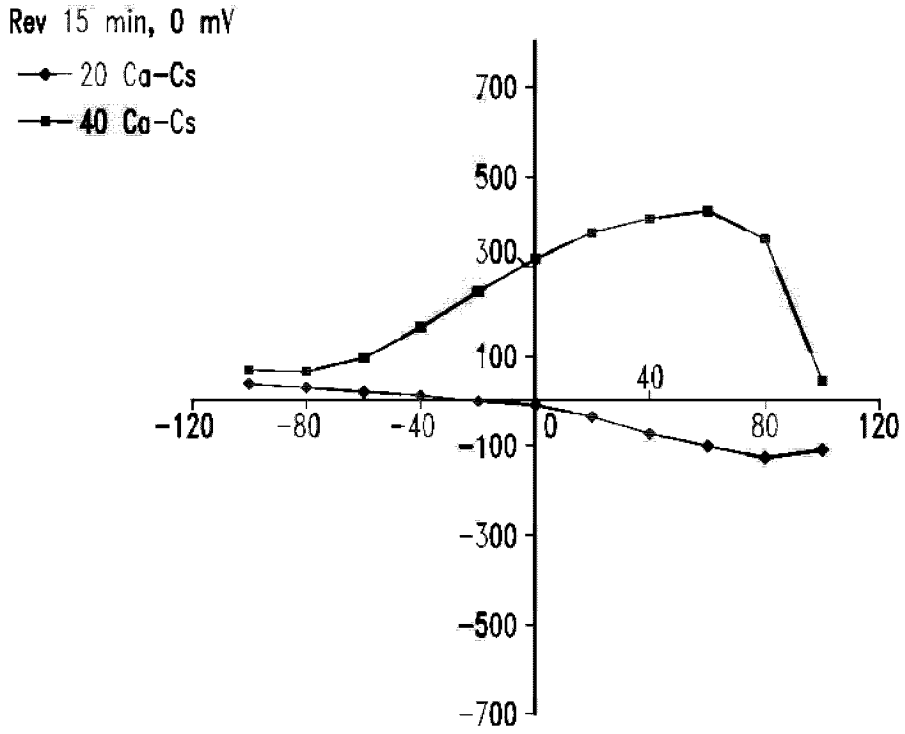
Rev 15 min, 0 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

图6C

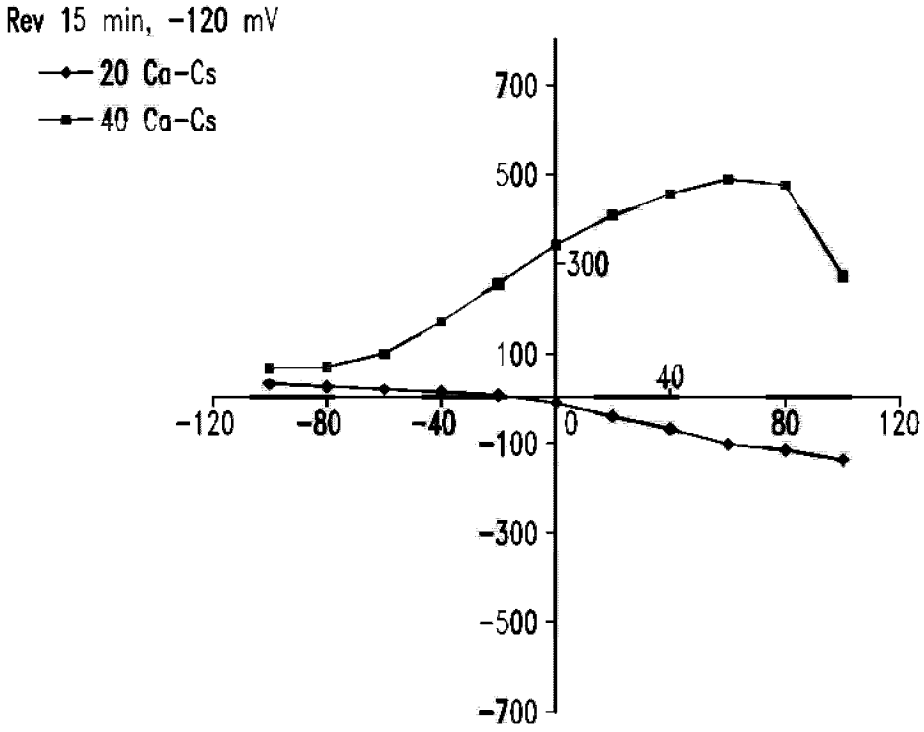
Rev 15 min, -120 mV
20 Ca-Cs
40 Ca-Cs
700
500
300
100
-100
-300
-500
-700
-120
-80
-40
0
40
80
120

图6D

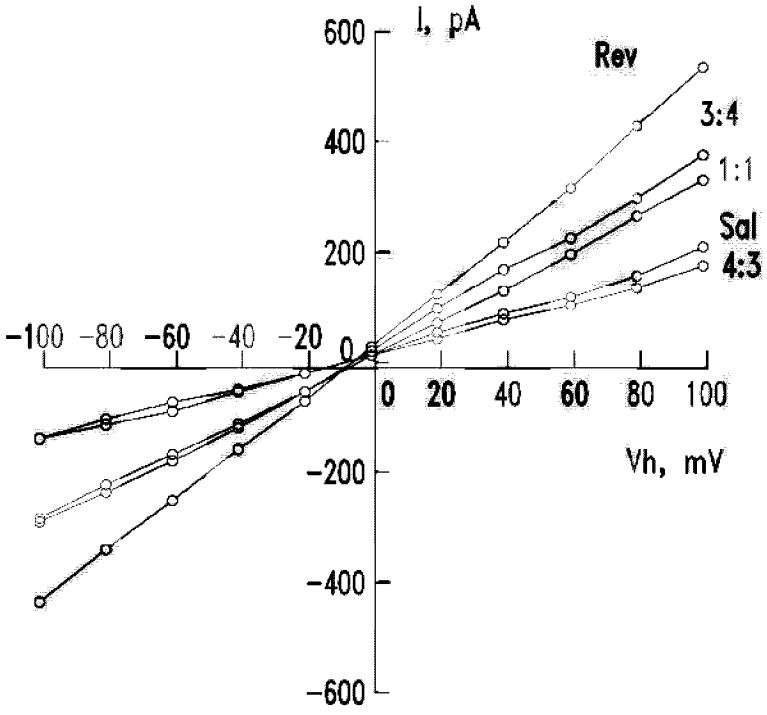
I, pA
600
400
200
-200
-400
-600
-100 -80 -60 -40 -20 0
0 20 40 60 80 100
Vh, mV
Rev
3:4
1:1
Sal
4:3

图7A

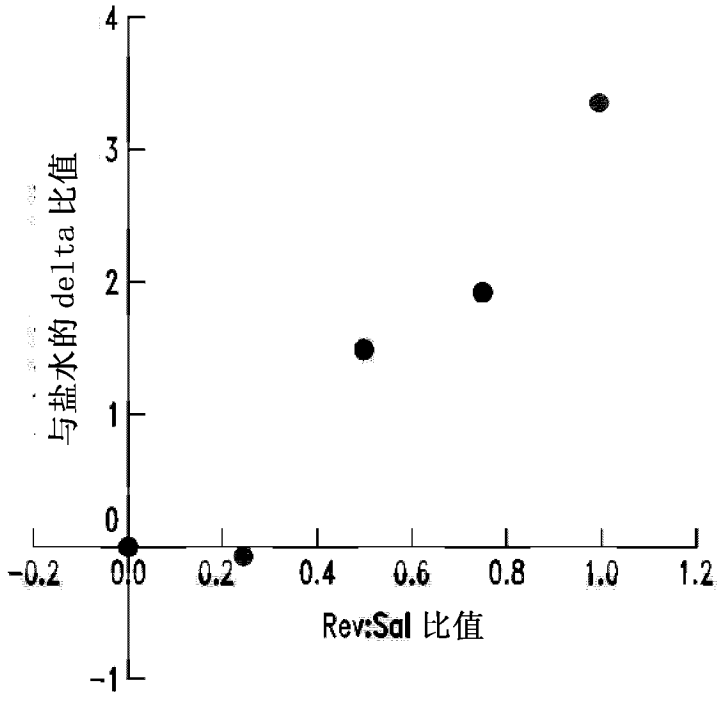
4
3
2
1
0
-1
-0.2 0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2
与盐水的 delta 比值
Rev:Sal 比值

图7B