



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101909869 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 08

(21) 申请号 200880122810. 7

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/055620 EN 2009. 04. 30

(22) 申请日 2008. 10. 23

(30) 优先权数据

PCT/US2007/082581 2007. 10. 25 US

(71) 申请人 利发利希奥公司

地址 美国华盛顿州

PCT/US2007/082580 2007. 10. 25 US

(72) 发明人 理查德·L·华森 安东尼·B·伍德

PCT/US2007/082578 2007. 10. 25 US

格雷戈里·J·阿咸宾

60/982, 719 2007. 10. 25 US

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

60/982, 720 2007. 10. 25 US

公司 11021

61/048, 347 2008. 04. 28 US

代理人 陈长会

61/048, 340 2008. 04. 28 US

(51) Int. Cl.

61/048, 404 2008. 04. 28 US

B32B 5/02 (2006. 01)

61/048, 332 2008. 04. 28 US

B32B 27/04 (2006. 01)

61/048, 416 2008. 04. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/081029 2008. 10. 23

权利要求书 3 页 说明书 61 页 附图 82 页

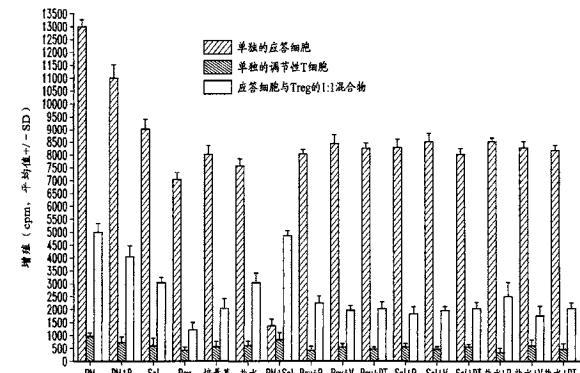
(54) 发明名称

抑菌或杀菌的组合物和方法

(57) 摘要

具体方面提供通过施用包含本文所公开的至少一种电动产生的流体（包括富含气体的电动产生的流体）的治疗组合物在有相应需要的受治疗者中治疗或预防细菌感染或涉及细菌感染的至少一种症状以及类似感染或症状的组合物和方法，所述电动改变的含水流体适合于改变细胞膜的结构或功能至足以提供对胞内信号转导的调节，其中从而提供治疗细菌感染或涉及细菌感染的至少一种症状。在具体实施方式中，所述流体为富含气体的流体或治疗组合物和方法，并且包括任选地与其他治疗剂组合的富含氧的水。其他实施方式包括富含气体的治疗组合物的具体施用途径或制剂。

CN



1. 一种用于在有相应需要的受治疗者中治疗细菌感染或细菌感染的至少一种症状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的电动改变的含水流体,所述电动改变的含水流体适合于改变细胞膜的结构或功能至足以提供对所述受治疗者的细胞中的细胞内信号转导的调节,其中提供了治疗细菌感染或其至少一种症状。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述电动改变的含水流体的改变包括将所述流体暴露于流体动力诱导的、局部化的电动效应。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中暴露于所述局部化的电动效应包括暴露于电压脉冲和电流脉冲的至少一种。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其中将所述流体暴露于流体动力诱导的、局部化的电动效应包括将所述流体暴露于用来产生所述流体的装置的诱导电动效应的结构部件。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中细菌感染的至少一种症状选自由以下组成的组:发红、肿胀、疼痛、血管通透性、血管扩张和坏死。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细菌感染包括选自由以下组成的组的至少一种细菌菌株的感染:葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、链球菌 (*Streptococcus*)、奈瑟氏菌 (*Neisseria*)、杆菌 (*Bacillus*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)、埃希氏菌 (*Escherichia*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas*)。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述细菌菌株包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、多抗药性葡萄球菌或假单胞菌。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述富含气体的流体包括富含氧的水。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述富含气体的流体包括富含氧的盐水溶液。

10. 如权利要求 1 所述的方法,其中改变细胞膜的结构或功能包括改变膜相关蛋白的构象、配体结合活性或催化活性。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述膜相关蛋白包括选自由以下组成的组中的至少一种:受体、跨膜受体、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞黏着蛋白、整联蛋白等。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述跨膜受体包括 G 蛋白偶联受体 (GPCR)。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 与 G 蛋白 α 亚基相互作用。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述 G 蛋白 α 亚基包括选自由 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{12}$ 组成的组的至少一种。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述至少一种 G 蛋白 α 亚基是 $G\alpha_q$ 。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中改变细胞膜的结构或功能包括改变膜电导率和膜电位的至少一种。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中细胞内信号转导的调节包括钙依赖性细胞通信途径或系统的调节。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中细胞内信号转导的调节包括磷脂酶 C 活性的调节。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中细胞内信号转导的调节包括腺苷酸环化酶 (AC) 活性的调节。

20. 如权利要求 1 所述的方法,其中细胞内信号转导的调节包括与选自由以下组成的组的至少一种病症或症状相关的细胞内信号转导的调节:发红、肿胀、疼痛、血管通透性、血

管扩张和坏死。

21. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法包括施用给细胞网络或细胞层,并且还包括其中的细胞间连接的调节。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述细胞间连接包括选自由紧密连接、间隙连接、黏着带和桥粒组成的组中的至少一种。

23. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞网络或细胞层包括选自由肺上皮、支气管上皮和肠上皮组成的组中的至少一种。

24. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述电动改变的含水流体是充氧的,并且其中在所述流体中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 的氧。

25. 如权利要求 1 到 24 中任一项所述的方法,其中所述电动改变的含水流体包含溶剂化电子和电动改性或带电的氧类中的至少一种。

26. 如权利要求 25 所述方法,其中所述溶剂化电子或者电动改性或带电的氧类以至少 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。

27. 如权利要求 26 所述方法,其中所述电动改变的充氧的含水流体包含通过分子氧稳定的溶剂化电子。

28. 如权利要求 1 所述方法,其中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节的能力在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。

29. 如权利要求 1 至 28 中任一项所述的方法,所述方法还包括组合治疗,其中施用至少一种另外的治疗剂。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗剂选自由以下组成的抗生素组:系统性抗生素,阿莫西林;氨苄西林;巴氨西林;羧苄西林;氯唑西林;双氯西林;氟氯西林;甲氧西林;美洛西林;萘夫西林;苯唑西林;青霉素 G;青霉素 V;哌拉西林;匹氨西林;匹美西林;和替卡西林。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其中所述抗生素为选自由以下组成的组的至少一种:青霉素类的阿莫西林亚类,包括 Amoxil、Polymox、Trimox 和 Wymox;青霉素类的氨苄西林亚类,包括 Omnipen、Omnipen-N、Polycillin、Polycillin-N、Principen、Totacillin 和 Totacillin-N;青霉素类的巴氨西林亚类,包括 Spectrobid;青霉素类的羧苄西林亚类,包括 Geocillin 和 Geopen;青霉素类的氯唑西林亚类,包括 Cloxapen 和 Tegopen;青霉素类的双氯西林亚类,包括 Dynapen、Dycill 和 Pathocil;青霉素类的氟氯西林亚类;青霉素类的甲氧西林亚类,包括 Staphcillin;青霉素类的美洛西林亚类,包括 Mezlin;青霉素类的萘夫西林亚类,包括 Nafcil、Nallpen 和 Unipen;青霉素类的苯唑西林亚类,包括 Bactocill 和 Prostaphlin;青霉素类的青霉素 G 亚类,包括 Bicillin L-A、Crysticillin 300A.S.、Pentids、Permapen、Pfizerpen、Pfizerpen-AS 和 Wycillin;青霉素类的青霉素 V 亚类,包括 Beepen、Betapen、Ledercillin VK、Pen Vee K、V-Cillin K 和 Veetids;青霉素类的哌拉西林亚类,包括 Pipracil;青霉素类的匹氨西林亚类;青霉素类的匹美西林亚类;和青霉素类的替卡西林亚类;以及它们的组合。

32. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞为哺乳动物细胞。
33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述细胞为人细胞。

抑菌或杀菌的组合物和方法

发明领域

[0001] 本文所公开的某些实施方式涉及杀菌组合物和方法的领域。本文所公开的某些实施方式涉及通过调节细胞膜、膜电位、膜蛋白诸如膜受体，包括但不限于 G 蛋白偶联受体、和细胞间连接（例如紧密连接、间隙连接、黏着带 (zona adherin) 和桥粒 (desmasome)）中的至少一种来调控或调节细胞内信号转导的领域。具体方面涉及通过施用包含如本文所公开的至少一种电动产生的流体（包括富含气体的（例如富含氧的）电动产生的流体）的治疗组合物来调节（例如，治疗或预防）与细胞膜介导的信号转导（例如，由膜受体介导的）有关的至少一种疾病或病症或其症状，所述细胞膜介导的信号转导包括由 G 蛋白偶联受体介导的信号传导。在某些实施方式中，抗菌组合物提供了对特定的抗生素抗性细菌如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的增加的杀伤。具体方面涉及通过施用包含本文所公开的至少一种流体的治疗组合物在受治疗者中治疗或预防涉及细菌感染的疾病或病症的至少一种症状。

[0002] 发明背景

[0003] 金黄色葡萄球菌细菌或“葡萄球菌 (staph)”常见于人和动物的皮肤上或鼻子中。葡萄球菌一般为无害的，除非他们通过割伤或其他创伤进入身体。通常，葡萄球菌感染在健康人中是较小的皮肤问题，但是在老年人或免疫系统弱化的人中，葡萄球菌感染可能导致严重的疾病。

[0004] 在历史上，葡萄球菌感染是由诸如甲氧西林的广谱抗生素治疗的。然而，现在某些葡萄球菌菌株对甲氧西林和其他抗生素具有抗性并且可能导致致死性疾病。也称为多抗药性的葡萄球菌的甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌或“MRSA”的感染是造成许多严重的皮肤和软组织感染以及威胁生命的肺炎形式的原因。它还称为多抗性金黄色葡萄球菌或苯唑西林抗性的金黄色葡萄球菌 (ORSA)。

[0005] MRSA 已经进化出了用 β 内酰胺类抗生素（即，青霉素、甲氧西林、头孢菌素等）治疗后能存活下来的能力。MRSA 感染在医院或疗养院的环境中尤其麻烦。在这些机构，患者具有开放的伤口、侵入性装置和弱化的免疫系统，并且比一般公众具有更高的感染风险。不遵循适当的卫生程序的工人可能将 MRSA 细菌从一位患者转移给另一位。

[0006] 包括 MRSA 的葡萄球菌感染一般以类似于丘疹、疖、或蜘蛛咬伤的小的红肿开始。这些肿块或损害可以迅速转化为需要手术引流的深的、疼痛的脓肿。有时，细菌仍限制在皮肤上。有时，它们可以深入身体，引起在骨、关节、手术创伤、血流、心瓣膜、肺或其他器官中可能威胁生命的感染。

[0007] 万古霉素和替考拉宁是在过去用于治疗 MRSA 感染的糖肽类抗生素。替考拉宁是万古霉素的结构同族体 (cogener)，它具有类似的活性谱但是更长的半衰期 ($t^{1/2}$)。主要的缺点是由于万古霉素和替考拉宁的口服吸收很低，这些药剂必须静脉内施用来控制全身感染。

[0008] 几种更近期分离的 MRSA 菌株表现出甚至对万古霉素和替考拉宁的抗性。利奈唑胺、奎奴普丁 / 达福普汀、达托霉素和替加环素 (tigecycline) 被用于治疗对诸如万古霉素

的糖肽不反应的更严重的感染。MRSA 感染还可以用口服药剂来治疗,例如利奈唑胺、与夫西地酸组合的利福平、与氟喹诺酮组合的利福平、普那霉素、磺胺甲基异恶唑(甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)、多西环素或米诺环素、平板霉素(platensimycin)和克林霉素。

[0009] 硫酸妥布霉素是用于治疗多种类型的细菌感染,尤其是革兰氏阴性感染的氨基糖苷类抗生素。其他氨基糖苷类抗生素包括:阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、链霉素和安普霉素。氨基糖苷类抗生素与细菌 30S 和 50S 核糖体结合,阻止 70S 复合体的形成,这导致 mRNA 不能翻译并且发生细胞死亡。诸如妥布霉素的氨基糖苷不通过胃肠道,因此为了全身利用,其必须静脉内或肌内给予。患有 CF 的患者经常被施用吸入形式的妥布霉素以抑制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染。妥布霉素还与地塞米松组合作为眼用溶液。

[0010] 膜电位(也称为跨膜电位或跨膜电位差或跨膜电位梯度)是跨细胞质膜的电势差(以电压测量)。膜电位由嵌入膜中的离子转运蛋白的作用而产生,所述离子转运蛋白保持细胞内部的有活力的离子浓度。术语“膜电位”有时可与细胞电位互换使用但是可应用于任何脂质双分子层或膜。

[0011] 细胞的典型膜电位由钠离子与跨细胞的膜的细胞内不动的阴离子的分离而产生。这种分离产生于由泵或转运蛋白产生的钾离子的浓度梯度。尽管由于电荷分离而存在跨膜电势,但是跨膜的正离子和负离子的总体浓度不存在实际可测量的差别。因此,在任一侧都不存在可测量的过量电荷。

[0012] 细胞膜通常只对一小组离子种类可渗透,包括但不限于钾离子、氯离子、碳酸氢根离子和其他离子。

[0013] 发明概述

[0014] 具体方面提供了用于在有相应需要的受治疗者中治疗细菌感染或细菌感染的至少一种症状的方法,所述方法包括施用治疗有效量的电动改变的含水流体,所述电动改变的含水流体适合于改变细胞膜的结构或功能至足以提供对受治疗者的细胞中的细胞内信号转导的调节,其中提供了细菌感染或其至少一种症状的治疗。在具体方面,电动改变的含水流体的改变包括将该流体暴露于流体动力诱导的、局部化的电动效应(例如,包括暴露于电压脉冲和电流脉冲的至少一种)。在具体的实施方式中,将流体暴露于流体动力诱导的、局部化的电动效应包括将流体暴露于用来产生该流体的装置的诱导电动效应的结构部件。

[0015] 在该方法的具体方面,所述细菌感染的至少一种症状选自由以下组成的组:发红、肿胀、疼痛、血管通透性、血管扩张和坏死。在某些实施方式中,细菌感染包括选自由以下组成的组的至少一种细菌菌株的感染:葡萄球菌(*Staphylococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)、奈瑟氏菌(*Neisseria*)、杆菌(*Bacillus*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、埃希氏菌(*Escherichia*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)。在具体方面,所述细菌菌株包括金黄色葡萄球菌、多抗药性葡萄球菌或假单胞菌。

[0016] 在某些方面,电动改变的含水流体包括富含氧的水。在具体实施方式中,电动改变的含水流体包括富含氧的盐水溶液。

[0017] 在该方法的具体方面,改变细胞膜的结构或功能包括改变膜相关蛋白的构象、配体结合活性和催化活性中的至少一种。在某些实施方式中,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、离子通道蛋白、细胞内附着蛋白、细胞黏着蛋白和整联蛋白。在某些方面，跨膜受体包括 G 蛋白偶联受体 (GPCR)。在具体实施方式中，G 蛋白偶联受体 (GPCR) 与 G 蛋白 α 亚基（例如，选自由以下组成的组的至少一种： $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{12}$ ）相互作用。在具体实施方式中，所述至少一种 G 蛋白 α 亚基是 $G\alpha_q$ 。

[0018] 在该方法的某些方面，改变细胞膜的结构或功能包括改变膜的电导率和膜电位的至少一种。

[0019] 在该方法的某些方面，细胞内信号转导的调节包括钙依赖性细胞通信途径或系统的调节（例如，包括磷脂酶 C 活性和腺苷酸环化酶 (AC) 活性的至少一种的调节）。在某些方面，细胞内信号转导的调节包括与选自由以下组成的组的至少一种病症或症状相关的细胞内信号转导的调节：发红、肿胀、疼痛、血管通透性、血管扩张和坏死。

[0020] 该方法的某些方面包括将电动改变的含水流体施用给细胞网络或细胞层，并且还包括其中细胞间连接的调节。在具体方面，细胞间连接包括选自由以下组成的组中的至少一种：紧密连接、间隙连接、黏着带和桥粒。在某些实施方式中，细胞网络或细胞层包括选自由肺上皮、支气管上皮和肠上皮组成的组中的至少一种。

[0021] 在具体方面，电动改变的含水流体是充氧的，并且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 的氧。

[0022] 在具体方面，电动改变的含水流体包含溶剂化电子和电动改性或带电的氧类的至少一种，并且在某些方面，所述溶剂化电子或电动改性或带电的氧类的存在量为至少 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。在某些方面，电动改变的充氧的含水流体包含通过分子氧稳定的溶剂化电子。

[0023] 根据具体方面，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节的能力在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。

[0024] 在其他方面，该方法包括组合治疗，其中施用至少一种另外的治疗剂。在具体实施方式中，所述至少一种另外的治疗剂选自由以下组成的抗生素组：系统性抗生素，阿莫西林；氨苄西林；巴氨西林；羧苄西林；氯唑西林；双氯西林；氟氯西林；甲氧西林；美洛西林；萘夫西林；苯唑西林；青霉素 G；青霉素 V；哌拉西林；匹氨西林；匹美西林；和替卡西林。在某些实施方式中，抗生素为选自由以下组成的组的至少一种：青霉素类的阿莫西林亚类，包括 Amoxil、Polymox、Trimox 和 Wymox；青霉素类的氨苄西林亚类，包括 Omnipen、Omnipen-N、Polycillin、Polycillin-N、Principen、Totacillin 和 Totacillin-N；青霉素类的巴氨西林亚类，包括 Spectrobid，青霉素类的羧苄西林亚类，包括 Geocillin 和 Geopen；青霉素类的氯唑西林亚类，包括 Cloxapen 和 Tegopen；青霉素类的双氯西林亚类，包括 Dynapen、Dycill 和 Pathocil；青霉素类的氟氯西林亚类；青霉素类的甲氧西林亚类，包括 Staphcillin；青霉素类的美洛西林亚类，包括 Mezlin；青霉素类的萘夫西林亚类，包括 Nafcill、Nallpen 和 Unipen；青霉素类的苯唑西林亚类，包括 Bactocill 和 Prostaphlin；青霉素类的青霉素 G 亚类，包括 Bicillin L-A、Crysticillin 300A.S.、Pentids、Permapen、Pfizerpen、Pfizerpen-AS 和 Wycillin；青霉素类的青霉素 V 亚类，包括 Beepen、Betapen、Ledercillin VK、Pen Vee K、V-Cillin K 和 Veetids；青霉素类的哌拉西林亚类，包括

Pipracil; 青霉素类的匹氨西林亚类; 青霉素类的匹美西林亚类; 和青霉素类的替卡西林亚类; 以及它们的组合。

[0025] 在该方法的具体方面, 细胞为哺乳动物细胞。在优选的方面, 细胞为人细胞。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 是现有技术混合装置的局部横截面、局部框图。

[0028] 图 2 是混合装置的示例性实施方式的框图。

[0029] 图 3 是将第一材料递送到图 2 的混合装置的示例性系统的图解。

[0030] 图 4 是图 2 的混合装置顶端部分的不完整局部横截面视图。

[0031] 图 5 是图 2 的混合装置第一侧面部分的不完整横截面视图。

[0032] 图 6 是图 2 的混合装置第二侧面部分的不完整横截面视图。

[0033] 图 7 是位于图 5 的第一侧面部分与图 6 的第二侧面部分之间的图 2 的混合装置的侧面部分的不完整横截面视图。

[0034] 图 8 是图 2 的混合装置的转子和定子的透视图。

[0035] 图 9 是图 2 的混合装置的第一室内部的透视图。

[0036] 图 10 是图 2 的混合装置的第一室内部的不完整横截面视图, 其包括泵 410 的替代实施方式。

[0037] 图 11 是图 2 的混合装置的第二室内部的透视图。

[0038] 图 12 是混合装置的替代实施方式的侧面部分的不完整横截面视图。

[0039] 图 13 是供混合装置的替代实施方式使用的壳体的中部替代实施方式的透视图。

[0040] 图 14 是供混合装置的替代实施方式使用的轴承壳体的替代实施方式的不完整横截面视图。

[0041] 图 15 是图 2 的混合装置的混合室的横截面视图, 其通过垂直于旋转轴的平面获得, 描绘了当转子的穿孔接近(但不对齐)定子的孔隙时由穴泡引起的旋转流模式。

[0042] 图 16 是图 2 的混合装置的混合室的横截面视图, 其通过垂直于旋转轴的平面获得, 描绘了当转子的穿孔对齐定子的孔隙时由穴泡引起的旋转流模式。

[0043] 图 17 是图 2 的混合装置的混合室的横截面视图, 其通过垂直于旋转轴的平面获得, 描绘了当之前对齐定子的孔隙的转子的穿孔不再与其对齐时由穴泡引起的旋转流模式。

[0044] 图 18 是转子的替代实施方式的侧视图。

[0045] 图 19 通过垂直于转子的旋转轴的平面而取得的放大的不完整横截面视图, 描绘了在转子中形成的穿孔和在定子中形成的穿孔的替代构型。

[0046] 图 20 通过经过并沿转子的旋转轴延伸的平面而取得的放大的不完整横截面视图, 描绘了在转子中形成的穿孔和在定子中形成的穿孔的构型。

[0047] 图 21 通过经过并沿转子的旋转轴延伸的平面而取得的放大的不完整横截面视图, 描绘了在转子中形成的穿孔和在定子中形成的穿孔的替代偏移构型。

[0048] 图 22 是可用来构建转子的穿孔和/或定子的孔隙的形状的图解。

[0049] 图 23 是可用来构建转子的穿孔和/或定子的孔隙的形状的图解。

[0050] 图 24 是可用来构建转子的穿孔和/或定子的孔隙的形状的图解。

[0051] 图 25 是可用来构建转子的穿孔和/或定子的孔隙的形状的图解。

- [0052] 图 26 是在表面附近形成的电双层（“EDL”）的图解。
- [0053] 图 27 是混合室的内部的模型的透视图。
- [0054] 图 28 是图 27 的模型的横截面视图。
- [0055] 图 29 是实验设置的图解。
- [0056] 图 30 图解了用图 2 的混合装置中的氧处理并储存于各自在 65 度华氏温度封盖的 500ml 薄壁塑料瓶和 1000ml 玻璃瓶中的水中的溶解氧水平。
- [0057] 图 31 图解了用图 2 的混合装置中的氧处理并储存于均在 39 度华氏温度制冷的 500ml 薄壁塑料瓶和 1000ml 玻璃瓶中的水中的溶解氧水平。
- [0058] 图 32 图解了用图 2 的混合装置中的氧处理的 500ml 饮料流体的溶解氧保留。
- [0059] 图 33 图解了用图 2 的混合装置中的氧处理的 500ml 布劳恩 (braun) 平衡盐溶液的溶解氧保留。
- [0060] 图 34 图解了另外一个实验，其中通过用图 2 的混合装置中的氮气处理水，图 2 的混合装置被用来排除水中氧。
- [0061] 图 35 图解了在标准的温度和压力下通过图 2 的混合装置排除水中氧。
- [0062] 图 36 是示例性纳米笼 (nanocage) 的图解。
- [0063] 图 37A 和 37B 图解了富含氧的流体的瑞利 (Rayleigh) 散射效应；
- [0064] 图 38 图解了在富含气体的流体和去离子对照流体的存在下促有丝分裂测定的细胞因子概况。
- [0065] 图 39 图解了在各种溶解氧饱和率的假单胞菌属细菌的生长速率的差异。
- [0066] 图 40A 和 40B 图解了使用富含氧的细胞培养基和非富含气体的培养基的创伤体外愈合。
- [0067] 图 41A 到 41F 示出真皮和表皮体内创伤愈合的组织学横截面。
- [0068] 图 42 图解了处理和对照的愈合创伤中 Hale 染色的表达，其用于检测酸性粘多糖例如透明质酸；
- [0069] 图 43 图解了用来检测处理和对照的愈合创伤中的血管发生的血管性血友病因子 (von Willebrand's Factor) 染色的表达；
- [0070] 图 44 图解了用来检测处理和对照的愈合创伤中的弹性蛋白的 Luna 染色的检测；
- [0071] 图 45 图解了对于处理和对照的愈合创伤的每个视野的肥大细胞的数目。
- [0072] 图 46 图解了在使用本发明的富含气体的培养基和对照培养基的角膜成纤维细胞测定中在单独时间点的死细胞的百分比。
- [0073] 图 47 图解了在聚合物袋中本发明的富含气体的流体的储存期限。
- [0074] 图 48 图解了在加压罐充氧的流体 (1)、本发明的富含气体的流体 (2) 或对照去离子的流体 (3) 的存在下使脾细胞与 MOG 接触的结果。
- [0075] 图 49-58 示出细胞因子的全血样品评估结果。
- [0076] 图 59-68 示出支气管肺泡灌洗流体 (BAL) 样品评估的对应的细胞因子结果。
- [0077] 图 69-75 示出缓激肽 B2 膜受体被固定到氨丙基硅烷 (aminopropylsilane) (APS) 生物传感器上的研究。在图 69 中指明了样品板设置，并且根据如图 71 中所指明的样品设置对缓激肽与固定化受体的结合进行了评定。缓激肽结合的结果示于图 72 中。根据在图 73 中所指明的设置进一步滴定与受体结合的缓激肽。如图 74 所表明的，缓激肽与 B2 受体

的结合是浓度依赖性的，并且在本公开的专利的富含气体的盐水流体中与生理盐水相比提高了结合亲和力。缓激肽与 B2 受体结合的稳定示于图 75 中。

[0078] 图 76–83 示出显示本文公开的具体实施方式影响调节性 T 细胞的能力的数据。该研究涉及辐射抗原呈递细胞和引入抗原和 T 细胞。

[0079] 图 84 示出本发明的电动产生的流体减少了鲑鱼降钙素和动物模型的血清摄入。结果与紧密连接的增强是一致的。

[0080] 图 85–89 示出在肺组织中的紧密连接相关蛋白的表达水平，所述肺组织是来自用于产生图 84 的数据的动物模型。

[0081] 图 90–94 示出从暴露于 RDC1676–01（通过具有添加的额外的氧的本专利装置处理的无菌盐水；本公开的富含气体的电动产生的流体（Rev））的人包皮角质形成细胞获得的数据，显示出 NOS1 和 NOS3、以及 Nostrin、NOS3 的上调。

[0082] 图 95 和 96 示出支持局部化电动效应（电压 / 电流）的数据，所述电动效应发生在包括绝缘的转子和定子部件的混合装置中以允许在电动流体产生的过程中检测电压 / 电流效应。

[0083] 图 97A–C 示出为进一步表征本发明的电动产生的流体的基本性质而进行的核磁共振（NMR）研究的结果。电动产生的流体增加了报道分子海藻糖溶质的 ¹³C-NMR 线宽。

[0084] 图 98 和 99 示出为进一步表征本发明的电动产生的流体的基本性质而进行的伏安研究（即方波伏安法（图 98）和溶出极谱法（图 99））的结果。在 -0.14V、-0.47V、-1.02V 和 -1.36V 观察到对电动产生的流体唯一的方波伏安峰差异（相比于对照）。对于电动产生的 Revera 和 Solas 流体在 -0.9 伏特看到明显的极谱峰（polarographic peak），并且非电动产生的空白和盐水对照流体的谱在 -0.19 和 -0.3 伏特示出特征峰，所述特征峰在电动产生的流体的谱中是不存在的。

[0085] 图 100–106 示出评定电动产生的流体的测试对上皮细胞膜极性和离子通道活性的影响的膜片钳技术的结果。结果表明本发明的电动产生的流体影响全细胞电导的电压依赖性贡献。

[0086] 图 107A–D 和 108A–D 示出数据，所述数据表明本发明的电动产生的流体（例如 RDC1676–00、RDC1676–01、RDC1676–02 和 RDC1676–03）当单独或作为硫酸沙丁胺醇的稀释剂在雄性豚鼠中施用时保护免受醋甲胆碱诱导的支气管收缩。

[0087] 图 109–114 示出为评定本发明的电动产生的流体在 Brown 挪威（Norway）大鼠卵白蛋白敏化模型中的气道抗炎特性而进行的布地奈德实验的结果。本发明的电动产生的流体降低了嗜酸性细胞计数，示出在降低嗜酸性细胞计数上与布地奈德的强协同效应，降低 Penh 值，提高潮气量，降低嗜酸性粒细胞趋化因子（Eotaxin）的血液水平，在用本发明的电动产生的流体（例如 Rev 60）单独或连同布地奈德一起处理所产生的攻击后 6 小时显著增强两种主要的关键抗炎细胞因子 IL10 和干扰素 γ 的血液水平，并且降低了 Rantes 的全身水平。数据显示出存在布地奈德 750ug/kg 与本发明的电动产生的流体（例如 Rev 60）的实质的协同效应。

[0088] 图 115 示出本发明的电动产生的流体（例如 Revera 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。

[0089] 图 116 示出本发明的电动产生的流体（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。

[0090] **发明详述**

[0091] 本文所公开的某些实施方式涉及提供杀菌的组合物和方法。某些其他实施方式提供通过使部位接触包含富含气体的流体的治疗组合物或向受治疗者施用包含富含气体的流体的治疗组合物来治疗细菌感染的至少一种症状。在某些具体的实施方式中，富含气体的流体包括富含氧的水。

[0092] **电动产生的流体：**

[0093] 如本文所用的“电动产生的流体”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电动产生的流体。如本文公开和呈现的资料所证明，电动流体表示相对于现有技术非电动流体，包括相对于现有技术充氧的非电动流体（例如压力罐充氧的流体及类似物）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，电动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：

[0094] 在具体的方面，电动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）的电动效应（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、局部化的电动效应与本文公开并讨论的表面相关的双层和 / 或流动电流效应联合。

[0095] 在具体的方面，电动改变的含水流体适合于调节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。

[0096] 在具体的方面，电动改变的含水流体的特征为以下至少一种：在 -0.14V、-0.47V、-1.02V 和 -1.36V 的任何一处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，这是具体工作实施例中本文所公开的电动产生的流体所独有的。

[0097] 在具体的方面，电动改变的含水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）。

[0098] 在具体的方面，电动改变的含水流体是充氧的，其中在该流体中的氧的存在量为大气压下至少 15, ppm、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，电动改变的含水流体在大气压下具有小于 15ppm、小于 10ppm 的溶解氧或大约环境氧水平。

[0099] 在具体的方面，电动改变的含水流体是充氧的，其中在该流体中的氧的存在量在大约 8ppm 与大约 15ppm 之间，并且在这种情况下有时在本文称作“Solas”。

[0100] 在具体的方面，电动改变的含水流体包含溶剂化电子（例如，通过分子氧稳定的）和电动改性和 / 或带电的氧类的至少一种，并且其中在某些实施方式中所述溶剂化电子和 / 或电动改性或带电的氧类的存在量为至少 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。

[0101] 在具体的方面，电动改变的含水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节,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、 β 2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、细胞黏着蛋白和整联蛋白。在某些方面,受影响的G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白 α 亚基(例如 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{12}$)相互作用。

[0102] 在具体的方面,电动改变的含水流体适合于调节细胞内信号转导,包括钙依赖性细胞通信途径或系统的调节(例如磷脂酶C活性的调节或腺苷酸环化酶(AC)活性的调节)。

[0103] 在具体的方面,电动改变的含水流体的特征为在本文工作实施例和其他地方中描述的各种生物活性(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)。

[0104] 在具体的方面,电动改变的含水流体显示出与沙丁胺醇和与布地奈德的协同效应,如在本文工作实施例中所示。

[0105] 在具体的方面,电动改变的含水流体减少在支气管上皮细胞(BEC)中DEP诱导的TSLP受体的表达,如本文工作实施例中所示。

[0106] 在具体的方面,电动改变的含水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,如本文工作实施例中所示。

[0107] 在具体的方面,电动改变的含水流体的生物效应被白喉毒素抑制,表明 β 阻断、GPCR阻断和钙通道阻断影响电动改变的含水流体的活性(例如关于调节性T细胞的功能),如在本文工作实施例中所示。

[0108] 在具体的方面,电动改变的含水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节的能力)在封闭的容器(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、至少六个月或更长时间。

[0109] 杀菌活性

[0110] 本文所述的某些实施方式涉及杀菌活性,例如,细菌细胞数目的减少、细菌细胞蛋白产生(如毒素产生)的减少和/或细菌细胞成活力的减少以及其他。

[0111] 在本文所述的某些实施方式中,所述的组合物或方法涉及改变或破坏细菌的离子通道活性。在某些实施方式中,所述的组合物或方法涉及改变或破坏细菌的膜电位。

[0112] 水孔和门控离子通道容许在细菌的细胞膜内发生变化。已知引起离子通道打开的几类刺激,包括跨膜电压改变(电压门控通道)、机械压力(机械门控通道)、或配体的结合(配体门控通道)。

[0113] 当膜两侧因一侧的正离子比负离子轻微过量且另一侧轻微不足而具有电荷差时,产生膜电位。这些电荷差可以由生电泵或由被动离子扩散产生。

[0114] 本发明的富含气体的流体和溶液

[0115] 一种流体被另一种流体扩散或富集可产生这两种流体的溶液或悬浮液。具体而言,用气体(例如氧)富集液体可能对包括治疗性处理的某些应用是有益的。如本文所用“流体”对于任何具体公开的实施方式,一般可指液体、气体、蒸汽、液体和/或气体的混合物或者它们的任何组合。此外,在某些实施方式中“液体”一般地可指纯的液体或者可指凝胶、溶胶、乳液、流体、胶体、分散体或混合物以及它们的任何组合;以上任何一种粘度可不同。

[0116] 在本文所公开的具体实施方式中,溶解的气体包括环境空气。在一个优选的实施方式中,溶解的气体包括氧。在另一个实施方式中,溶解的气体包括一氧化氮。

[0117] 存在几种领域认可的气体富集液体(例如氧富集水)的方法。例如,涡轮机充气系统可在叶轮的一组旋转叶片附近释放空气,这使空气或氧与水混合,或者水可被喷洒到空气中以提高其氧含量。另外,市场上的其他系统将空气或氧注入到水中并且使水 / 气体经历大规模涡旋。水中氧的天然存在水平通常是不超过 10ppm(百万分率),这被认为是 100% 的溶解氧的水平。在某些装置上的测试已示出在理想条件下,所述装置能够达到多于大约 20ppm 或水的天然氧水平的两倍。在某些实施方式中,氧水平可能甚至更高。

[0118] 本文提供的具体实施方式涉及如本文所定义的扩散器处理的治疗性流体,所述流体包括:流体主材料;扩散到该主材料中的输注材料;和任选地在该主材料中分散的至少一种治疗剂,其中该输注材料包括在该主流体中的氧微泡,其中大多数的微泡在尺寸上小于 0.2 微米或者优选地小于 0.1 微米。在某些实施方式中,在输注的流体主材料中的溶解氧水平可在大气压下保持大于约 30ppm 持续至少 13 小时。在其他具体的实施方式中,在输注的流体主材料中的溶解氧水平可在大气压下保持大于 40ppm 持续至少 3 小时。

[0119] 在另外的实施方式中,输注的流体主材料还包括盐水溶液。在其他的实施方式中,输注的流体主材料在大气压下于密封容器内保持至少约 20ppm 到约 40ppm 的溶解氧水平持续至少 100 天、优选至少 365 天的时间。在某些实施方式中,输注的流体主材料在大气压下可具有至少 50ppm 的溶解氧水平。

[0120] 在某些实施方式中,输注的流体主材料在氧已扩散到其中之后在选定的时间段对通过它发光的激光束表现出瑞利散射。

[0121] 表 A 说明了在用富含氧的盐水溶液处理的愈合创伤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。

[0122] 表 A

组织的氧测量	
探头 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
*创伤深度最小, 大多数>150, 偶尔 20 s	

[0124] 泡尺寸测量

[0125] 通过混合装置 100 进行实验来确定流体内扩散的气体的气泡的尺寸。虽然不进行直接测量泡的尺寸的实验,但是进行的实验确定流体内大多数气泡的泡尺寸是小于 0.1 微米。换言之,所述实验确定了尺寸阈值,大多数泡的尺寸落在该阈值之下。

[0126] 这个尺寸阈值或尺寸限值是通过使在混合装置 100 中处理流体和气体而形成的输出材料 102 穿过 0.22 的过滤器和 0.1 微米过滤器而确定的。在进行这些测试时,一定体积的第一材料 110,在这种情况下是流体和一定体积的第二材料 120,在这种情况下是气体通过混合装置 100 以产生一定体积的输出材料 102(即其中具有扩散的气体的流体)。将六十毫升的输出材料 102 导入到 60ml 注射器中。然后使用 Orion 862a 测量注射器内的流体的 DO 水平。Orion 862a 能够测量流体内的 DO 水平。将注射器内的流体经由 0.22 微米过滤器注射到 50ml 烧杯中。所述过滤器包括 MilliporeMillipore™ GP50 过滤器。然后测量 50ml 烧杯中的材料的 DO 水平。该实验进行三次以得到以下表 II 中说明的结果。

[0127]

在注射器中的 DO	在 0.22 微米过滤器之后的 DO
42. 1ppm	39. 7ppm
43. 4ppm	42. 0ppm
43. 5ppm	39. 5ppm

[0128] 表 II

[0129] 如可以看到的那样,在注射器内测量的 DO 水平和在 50ml 烧杯内测量的 DO 水平没有因输出材料 102 通过 0.22 微米过滤器而显著改变。这个实验说明输出材料 102 内的溶解气体的泡不大于 0.22 微米,否则在通过 0.22 微米过滤器的输出材料 102 中会存在 DO 水平的显著更大的降低。

[0130] 进行了第二个测试,其中用 0.1 微米过滤器替换 0.22 微米过滤器。在这个实验中,在混合装置 100 中用氧对盐水溶液进行处理并且在未过滤状态下收集输出材料 102 的样品。未过滤样品的 DO 水平是 44. 7ppm。使用 0.1 微米过滤器过滤输出材料 102 并收集另外两份样品。第一份样品的 DO 水平是 43. 4ppm。第二份样品的 DO 水平是 41. 4ppm。然后,移除过滤器并且从未过滤的输出材料 102 中获取最后一份样品。最后一份样品具有 45. 4ppm 的 DO 水平。这些结果与使用 Millipore 0.2 微米过滤器所看到的结果是一致的。这些结果得出结论:通过 0.1 微米过滤器的输出材料 102 的 DO 水平存在轻微降低,由此提供指示,即在处理的盐水溶液中的大多数泡在尺寸上不大于 0.1 微米。使用温克勒 (Winkler) 滴定法得到上述的 DO 水平测试结果。

[0131] 如本领域中所理解的那样,当物体被放到液体中时在其表面上出现双层(界面的)(DL)。这种物体例如可以是固体表面(例如转子和定子表面)、固体颗粒、气泡、液滴或多孔体的物体。在混合装置 100 中,泡表面代表在混合室内存在的可用于电动双层的效应的总表面积的相当一部分。因此,除了本文其他地方讨论的表面积和保留时间之外,与现有技术装置 10 相比在混合器 100 内所产生的相对小的泡尺寸至少在某种程度上也有助于本文公开的总体电动效应和输出流体的特性。具体而言,在优选的实施方式中,如通过混合器 100 所说明的那样,通过转子上的孔隙将所有气体引入(没有通过定子孔隙将气体引入。因为转子正以高速度(例如 3400rpm)旋转,从而在转子表面和转子表面附近产生大量剪切力,经由和毗邻正在旋转的转子表面孔隙而引入的泡的泡尺寸预期大大(例如小 2 到 3 倍)

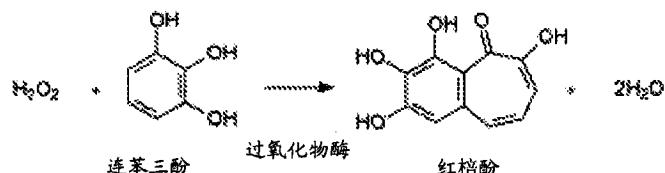
小于经由和接近静止的定子所引入的泡的泡尺寸。因此，现有技术装置 10 的平均泡尺寸可能实质上更大，因为至少一半的气体从静止的定子孔隙被引入到混合室中。因为球体表面的表面积随 r^2 而改变，所以混合装置 100 的电动表面积的任意这样的泡组分可能实质上大于现有技术扩散装置 10 的那些。

[0132] 包含通过本发明的方法赋予本发明组合物的水合的（溶剂化）电子的组合物

[0133] 在如本文所述的某些实施方式中（参见“双层”之下），富含气体的流体是通过公开的机电方法产生的，在所述机电方法中分子氧被扩散或者被混合到流体中并且可以运转以使赋予流体的电荷（例如水合的（溶剂化）电子）稳定。不受理论或机制束缚，本发明的某些实施方式涉及富含氧的流体（输出材料），所述富含氧的流体包含加入到该材料中的电荷（例如水合的（溶剂化）电子），因为在本发明混合器装置中第一材料与氧相混合以提供组合的输出材料。根据具体的方面，这些水合的（溶剂化）电子（作为替代本文称作“溶剂化电子”）在本发明溶液中是稳定的，如通过由这些水合的（溶剂化）电子介导的可测定的效应的持久性所证明的那样。某些实施方式可涉及水合的（溶剂化）电子和 / 或水 - 电子结构、簇等。（参见例如 Lee 和 Lee, Bull. Kor. Chem. Soc. (韩国化学协会期刊) 2003, 卷 24, 6 ;802-804 ;2003）

[0134] 辣根过氧化物酶 (HRP) 的作用。辣根过氧化物酶 (HRP) 是从辣根 (山葵 (*Amoracia rusticana*)) 分离并且属于过氧化物酶的亚铁原卟啉基 (血红素基)。HRP 容易地与过氧化氢或其他的氢供体结合以氧化连苯三酚底物。另外，如本领域所认可的那样，HRP 在缺乏过氧化氢的条件下促进吲哚 -3- 乙酸的自氧化性降解（参见例如，Heme Peroxidases (血红素过氧化物酶)，H. Brian Dunford, Wiley-VCH, 1999, 第 6 章，第 112-123 页，描述自氧化涉及高效的支链机制；将其整体通过引用并入本文）。HRP 反应能够以酶活性单位测量，其中比活性用连苯三酚单位表示。在 20°C 于 pH 6.0 下一个连苯三酚单位将在 20 秒内从连苯三酚形成 1.0mg 的红棓酚。这种红棓酚 (20 秒) 单位等同于 25°C 下每分钟大约 18 μ M 单位。

[0135]



[0136] 已知辣根过氧化物酶的酶通过促进与流体中的分子氧进行反应来催化连苯三酚的自氧化。（Khajehpour 等人, PROTEINS :Struct, Funct, Genet. (蛋白质 : 结构、功能和遗传学) 53 :656-666 (2003)）。还已知氧通过辣根过氧化物酶的酶的疏水孔区域（在 Phe68 与 Phe142 之间）结合该酶的血红素袋 (heme pocket)，该疏水孔区域的构象可能决定氧对内部的可及性。根据具体的方面并且不受机制束缚，因为在蛋白上的表面电荷在蛋白质领域已知影响蛋白质结构，所以在本发明的富含气体的流体中存在的溶剂化电子可能起作用来改变辣根过氧化物酶的构象以便更大的氧可及性可以产生。当与现有技术充氧的流体（压力罐，小泡的）进行比较时，氧对辣根过氧化物酶的酶的修复性血红素袋的更大可及性可进而允许提高的 HRP 反应性。

[0137] 无论如何，根据具体的方面，使用本发明方法和装置的输出材料的生产包括涉及如下的过程：提供电荷梯度的界面双层；材料相对于表面的运动，借助摩擦电效应牵引电

荷（例如电子）离开该表面，其中材料的流动产生溶剂化电子流。此外，根据其他方面并且不受机制限制，二价氧的轨道结构在流体材料（水）内的氢键合安排中产生电荷的不平衡（例如，影响水的氢键合的两个不成对的电子），其中电子在这些不平衡中是溶剂化的且稳定的。

[0138] 如以下所述进行对于本发明的富含氧的流体的几项化学测试以确定过氧化氢的存在，这些测试中没有一个是阳性的（0.1ppm 的过氧化氢灵敏度）。因此，本申请的本发明的富含氧的流体不包含或者包含小于 0.1ppm 的过氧化氢。

[0139] 根据具体的方面，尽管不存在过氧化氢，由双层效应和当前要求保护的装置的构型赋予的本发明的氧富集与溶剂化电子的组合可以起作用来改变辣根过氧化物酶的构象和 / 或血红素基的可及性。

[0140] 谷胱甘肽过氧化物酶的研究

[0141] 通过使用标准测定法 (Sigma) 测试与谷胱甘肽过氧化物酶的反应性来测试本发明的富含氧的输出流体材料的过氧化氢的存在。简言之，在去离子水和适当的缓冲液中组成谷胱甘肽过氧化物酶的酶混合物。通过加入该酶混合物并颠倒来测试水样品。在 $A_{340\text{nm}}$ 和室温下（25 摄氏度）进行连续的分光率测定。所测试的样品是：1. 去离子水（阴性对照），2. 低浓度本发明富含氧的流体，3. 高浓度本发明富含氧的流体，4. 过氧化氢（阳性对照）。过氧化氢阳性对照示出强反应性，而所测试的其他流体都不与谷胱甘肽反应。

[0142] 产生富含气体的流体或溶液的装置

[0143] 相关技术说明

[0144] 图 1 提供现有技术装置 10 的部分框图、部分横截面视图，该装置 10 用于将一种或两种气体或液体材料（“输注材料”）分散或乳化为另一种气体或液体材料（“主材料”），它是从美国专利第 6,386,751 号复制的，通过引用将该专利整体并入本文。装置 10 包括被构造为容纳定子 30 和转子 12 的壳体。定子 30 环绕转子 12。转子 12 和定子 30 之间界定了管状通道 32。一般为圆柱形的转子 12 具有约 7.500 英寸的直径和约 6.000 英寸的长度，提供了约 0.8 的长度直径比。

[0145] 转子 12 包括一般在两个末端闭合的中空圆柱体。在转子 12 的第一末端和第二末端的每一个与壳体 34 的一部分之间存在间隙。由发动机 18 驱动的转轴 14 连接在转子 12 的第二末端。转子 12 的第一末端连接在入口 16 上。第一输注材料穿过入口 16 进入转子 12 的内部。第一输注材料通过在转子 12 内形成的多个开口 22 从转子 12 的内部流出并进入通道 32。

[0146] 定子 30 还具有在其周围形成的开口 22。入口 36 将第二输注材料传递到定子 30 与壳体 34 之间的区域 35。第二输注材料通过开口 22 流出区域 35 并进入通道 32。

[0147] 使用外部泵（未显示）将主材料抽吸到单入口 37 中。主材料穿过单入口 37 并进入通道 32，在此处遇到通过开口 22 进入通道 32 的第一输注材料和第二输注材料。可以在输注材料的来源处对输注材料加压以防止主材料穿过开口 22。

[0148] 入口 37 被构造并放置成使它定位在仅沿着环状入口通道 32 的相对较小部分（小于约 5%），并且基本上与转子 12 的旋转轴平行以将向着通道 32 的一部分的轴流赋予主材料。

[0149] 不幸地，在进入管状通道 32 之前，主材料必须以非轴流的曲折方向（例如，包括基

本上与轴流垂直的方向)运送,并且落入转子 12 的第一末端和壳体 34 之间形成的间隙内和间隙之间(即,沿着在转子 12 的末端与壳体 34 之间临近入口 16 的转子的第一末端的一部分落入)。非轴向的和垂直的流动以及转子 12 的第一末端和壳体 34 之间的间隙内的主材料的存在会产生不期望和不必要的摩擦力。此外,主材料的一部分有可能陷入转子的第一末端和壳体之间旋转的涡流中。此外,在装置 10 中,主材料必须通过至少两个直角以进入管状通道 32 的环形入口的环的任一方位。

[0150] 在壳体 34 内形成单出口 40。混合的主材料和一种或多种输注材料经由出口 40 从通道 32 出来。出口 40 也定位在仅沿着管状通道 32 的环状出口的有限部分(小于约 5%),出口 40 基本上与转子 12 的旋转轴平行以赋予或容许混合材料的轴流离开管状通道 32 的环状出口的有限部分进入出口 40。使用外部泵 42 经由出口 40 抽吸出来的流体。

[0151] 不幸地,在出管状通道 32 之前,出来的材料的大部分必须以非轴流的曲折方向(例如,包括基本上与轴流垂直的方向)运送,并且落入转子 12 的第二末端和壳体 34 之间形成的间隙内和间隙之间(即,沿着在转子 12 的末端与壳体 34 之间临近轴 14 的转子的第二末端的一部分落入)。如上面所提到的,非轴向的和垂直的流动以及在转子 12 的末端(在此情况下为第二末端)和壳体 34 之间的另一间隙内的主材料的存在会产生额外的不期望和不必要的摩擦力。此外,主材料的一部分有可能陷入转子的第二末端和壳体之间旋转的涡流中。此外,在装置 10 中,出来的混合材料的大部分在其自管状通道 32 的环形出口出来进入出口 40 时必须通过至少两个直角。

[0152] 如对本领域内的普通技术人员来说明显的,入口 37 仅仅将轴流赋予主材料。只有转子 21 将绕流赋予主材料。此外,出口 40 对出来的材料仅赋予或提供轴流。此外,绕流速度矢量仅在材料进入管状通道 32 的环状入口 37 之后赋予给材料,随后在材料进入出口 40 时,绕流矢量必须被降低或消除。因此,存在对材料以轴向穿过通道 32 时渐进的材料绕向加速和材料由通道 32 出来后绕向减速的需要。这些方面与材料由入口 37 至出口 40 经过的曲折通路组合在通路上产生了大量的摩擦力和流动阻力,这伴随着入口 37 与出口 40 之间的大的压差(在 60 加仑/分钟流速时为 26psi),并且这些因素和其他因素相组合降低了系统的整体效力。

[0153] 电动富含氧的含水流体和溶液

[0154] 图 2 提供了图解混合装置 100 的一些组件和材料流入该装置、在该装置内流动和流出该装置的框图。混合装置 100 混合两种或多种的输入材料形成输出材料 102,输出材料 102 可被从该混合装置接纳到储存容器 104 中。混合装置 100 以新颖的方式搅动所述两种或多种输入材料产生具有新颖特征的输出材料 102。输出材料 102 可能不止包括至少一种输入材料在至少一种其他输入材料(例如,乳液)中的悬浮液,还包括输入材料的新组合(例如,静电组合)、由输入材料之间的化学反应产生的化学化合物、具有新颖的静电特征的组合、以及它们的组合。

[0155] 输入材料可以包含由第一材料的来源 112 提供的第一材料 110、由第二材料的来源 122 提供的第二材料 120、和任选地由第三材料的来源 132 提供的第三材料 130。第一材料 110 可以包括液体,如水、盐水溶液、化学悬浮液、极性液体、非极性液体、胶状悬浮液、细胞生长培养基以及类似液体。在一些实施方式中,第一材料 110 可以包含循环回混合装置 100 的输出材料 102。第二材料 120 可以由如下的气体组成或包含如下的气体:例如氧气、

氮气、二氧化碳、一氧化碳、臭氧、硫气、一氧化二氮、一氧化氮、氩气、氦气、溴气、及它们的组合以及类似气体。在优选的实施方式中,所述气体为氧气或包含氧气。任选的第三材料 130 可以包括液体或气体。在一些实施方式中,第三材料 130 可以为循环回混合装置 100 的输出材料 102 或包含循环回混合装置 100 的输出材料 102(例如,循环回一个或多个泵 210、220 或 230;和 / 或循环回室 310 和 / 或 330 中)。

[0156] 任选地,第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 可以分别通过外部泵 210、外部泵 220 和外部泵 230 抽吸到混合装置 100 中。可选择地,第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 的一种或多种可以在压力下分别储存在来源 112、来源 122 和来源 132 中,并且可以通过该压力被驱入混合装置 100。本发明不受用于分别从来源 112、来源 122 和来源 132 将第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 转移到混合装置 100 的方法限制。

[0157] 混合装置 100 包括在混合室 330 两侧的第一室 310 和第二室 320。三个室 310、320 和 330 相互连接并且形成连贯的体积。

[0158] 第一材料 110 被转移到第一室 310 中并从第一室 310 流入混合室 330 中。在第一室 310 中的第一材料 110 可以通过内部泵 410 被抽吸到第一室 310 中。第二材料 120 被转移到混合室 330 中。任选地,第三材料 130 可以被转移到混合室 330 中。混合室 330 中的材料在其中混合形成输出材料 102。然后,输出材料 102 流入第二室 320 中,输出材料 102 从第二室 320 流出混合装置 100。在混合室 330 中的输出材料 102 可以通过内部泵 420 被抽吸到第二室 320 中。任选地,在第二室 320 中的输出材料 102 可以通过外部泵 430(例如,单独或与内部泵 410 和 / 或 420 组合)被从第二室 320 抽吸到储存容器 104 中。

[0159] 在具体方面,通用的驱动轴 500 为内部泵 410 和内部泵 420 两者提供动力。驱动轴 500 穿过混合室 330 并在其中提供用于将第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 混合在一起的旋转力。驱动轴 500 由连接于其上的发动机 510 提供动力。

[0160] 图 3 提供将第一材料 110 提供给混合装置 100 并将输出材料 102 从混合装置 100 移出的系统 512。在系统 512 中,合并了输出材料 102 的储存容器 104 和第一材料 110 的来源 112。外部泵 210 通过如软管、筒管及类似物的流体导管 514 连接在合并的储存容器 104 和来源 112 上。外部泵 210 将混合的第一材料 110 和输出材料 102 从合并的储存容器 104 和来源 112 抽吸穿过流体导管 514 并进入连接外部泵 210 和混合装置 100 的流体导管 516 中。输出材料 102 穿过流体导管 518 从混合装置 100 出来。流体导管 518 连接在合并的储存容器 104 和来源 112 上并将从混合装置 100 中出来的输出材料 102 运到合并的储存容器 104 和来源 112 中。流体导管 518 包括阀 519,该阀 519 产生混合装置 100 内的操作压或反压。

[0161] 参考图 2、图 4-9 和图 11,提供混合装置 100 的实施方式的各组件的更详细说明。混合装置 100 是可以按比例变化的。因此,关于各组件所提供的尺寸可用于构建该装置的实施方式或可用于成比例地构建选定尺寸的混合装置。

[0162] 转向图 4,混合装置 100 包括容纳第一室 310、混合室 330 和第二室 320 的每一个的壳体 520。如上面所提到的,混合装置 100 包括在装置运行期间旋转的驱动轴 500。因此,混合装置 100 可以摆动或其他方式移动。任选地,混合装置 100 可以连接在底座 106 上,底座 106 可以固定在诸如地板的表面上以保持混合装置 100 处于基本上固定的位置。

[0163] 壳体 520 可以由两个或更多个壳体部分装配。举例来说，壳体 520 可以包括两侧为第一机械密封壳体 524 和第二机械密封壳体 526 的中心部分 522。轴承壳体 530 可以在中心部分 522 的对面连接在第一机械密封壳体 524 上。轴承壳体 532 可以在中心部分 522 的对面连接在第二机械密封壳体 526 上。任选地，壳体部分 550 可以连接在轴承壳体 530 上。

[0164] 轴承壳体 530 和 532 的每一个可以容纳轴承部件 540 (参见图 5 和 6)。轴承部件 540 可以包括本领域内已知的任何合适的轴承部件，包括由 Kulpsville, Pennsylvania 的 SKF USA Inc 制造的型号“202SZZST”，该公司运营网站为 www.skf.com。

[0165] 可以在邻近的壳体部分之间提供密封件。例如，在壳体部分 550 和轴承壳体 530 之间可以设置 o 型环 560 (参见图 5) 在第一机械密封壳体 524 和中心部分 522 之间可以设置 o 型环 562 (参见图 5)，并且在第二机械密封壳体 526 和中心部分 522 之间可以设置 o 型环 564 (参见图 6)。

[0166] 混合室 330

[0167] 现在转向图 7，混合室 330 设置在第一机械密封壳体 524 和第二机械密封壳体 526 之间的壳体 520 的中心部分 522 内部。混合室 330 在混合装置 100 的两个组件转子 600 和定子 700 之间形成。转子 600 可以具有侧壁 604，该侧壁 604 具有界定了一般中空内部 610 的内表面 605 和外表面 606。侧壁 604 可以为约 0.2 英寸至约 0.75 英寸厚。在一些实施方式中，侧壁 604 为约 0.25 英寸厚。然而，由于混合装置 100 可以按比例变化以适应具体应用，所以具有比所提供的值厚或薄的侧壁 604 的装置的实施方式在本教导的范围内。侧壁 604 包括第一末端部分 612 和第二末端部分 614，以及在第一末端部分 612 和第二末端部分 614 之间形成的多个穿孔 608。任选地，侧壁 604 的外表面 606 可以包括其他部件，如孔隙、突出、纹理及类似部件。第一末端部分 612 具有被构造为接纳轴环 618 的缓冲部分 (relieved portion) 616，且第二末端部分 614 具有被构造为接纳轴环 622 的缓冲部分 620。

[0168] 转子 600 设置在定子 700 的内部。定子 700 具有侧壁 704，该侧壁 704 的内表面 705 界定了其中设置转子 600 的一般中空内部 710。侧壁 704 可以为约 0.1 英寸至约 0.3 英寸厚。在一些实施方式中，侧壁 604 为约 1.5 英寸厚。定子 700 可以在基本上固定的位置不可旋转地连接在壳体 520 上。可选择地，定子 700 可以与壳体 520 以整体形成。侧壁 704 具有第一末端部分 712 和第二末端部分 714。任选地，在第一末端部分 712 和第二末端部分 714 之间的定子 700 的侧壁 704 内形成多个孔隙 708。任选地，侧壁 704 的内表面 705 可以包括其他部件，如穿孔、突出、纹理及类似部件。

[0169] 转子 600 相对于固定的定子 700 环绕旋转轴“ α ”以图 9 中箭头“C3”所指示的方向旋转。转子 600 和定子 700 的每一个可以一般为圆柱形状并且具有纵轴。转子 600 具有外径“D1”，并且定子 700 可以具有内径“D2”。直径“D1”可以在例如约 0.5 英寸至约 24 英寸的范围内。在一些实施方式中，直径“D1”为约 3.04 英寸。在一些实施方式中，直径“D1”为约 1.7 英寸。大于直径“D1”的直径“D2”可以在约 0.56 英寸至约 24.25 英寸的范围内。在一些实施方式中，直径“D2”为约 4 英寸。因此，混合室 330 可以具有约 0.02 英寸至约 0.125 英寸厚 (即，直径“D2”和直径“D1”之间的差) 的环形横截面形状。在具体的实施方式中，混合室 330 为约 0.025 英寸厚。现有技术装置 10 (参见图 1) 的转子 12 和定子 34 之间的通道 32 具有约 0.09 英寸厚的环形横截面形状。因此，在具体实施方式中，混合室 330

的厚度小于现有技术装置 10 的通道 32 的约三分之一。

[0170] 转子 600 的纵轴可以与其旋转轴“ α ”对齐。转子 600 的纵轴可以与定子 700 的纵轴对齐。转子 600 沿旋转轴“ α ”可以具有约 3 英寸至约 6 英寸的长度。在一些实施方式中,转子 600 沿旋转轴“ α ”可以具有约 5 英寸的长度。定子 700 沿旋转轴“ α ”可以具有约 3 英寸至约 6 英寸的长度。在一些实施方式中,定子 700 沿旋转轴“ α ”可以具有约 5 英寸的长度。

[0171] 尽管转子 600 和定子 700 被描述为一般具有圆柱形状,但是本领域的那些普通技术人员了解可以使用替代形状。例如,转子 600 和定子 700 可以为圆锥形、球形、任意形状及类似形状。另外,转子 600 和定子 700 不必为相同形状。例如,转子 600 可以为圆柱形,并且定子 700 为矩形,或者反之亦然。

[0172] 图 4-7 中所描绘的定子 700 的孔隙 708 和穿孔 608 一般为圆柱形。穿孔 608 的直径可以在约 0.1 英寸至约 0.625 英寸的范围内。孔隙 708 的直径可以在约 0.1 英寸至约 0.625 英寸的范围内。定子 700 的一个或多个孔隙 708 可以具有与其他孔隙 708 不同的直径。例如,孔隙 708 的直径可以从定子 700 的第一末端部分 712 至定子 700 的第二末端部分 714 增加,孔隙 708 的直径可以从定子 700 的第一末端部分 712 至定子 700 的第二末端部分 714 降低,或者孔隙 708 的直径可以沿定子 700 以另一方式变化。转子 600 的一个或多个穿孔 608 可以具有与其他穿孔 608 的直径不同的直径。例如,穿孔 608 的直径可以从转子 600 的第一末端部分 612 至转子 600 的第二末端部分 614 增加,穿孔 608 的直径可以从转子 600 的第一末端部分 612 至转子 600 的第二末端部分 614 降低,或者穿孔 608 的直径可以沿转子 600 以另一方式变化。

[0173] 如下面关于替代性实施方式所描述的,孔隙 708 和穿孔 608 可以具有不为一般圆柱形的形状,并且这些实施方式在本发明的范围内。例如,穿孔 608 可以包括较窄的部分、弓形部分、锥形部分及类似部分。参考图 7,每个穿孔 608 包括外部分 608A、窄部分 608B 和锥形部分 608C,该锥形部分 608C 在外部分 608A 和窄部分 608B 之间提供过渡。类似地,孔隙 708 可以包括较窄的部分、弓形部分、锥形部分及类似部分。

[0174] 图 8 提供定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的穿孔 608 的合适排列的非限制性实例。定子 700 的孔隙 708 可以基本上垂直于旋转轴“ α ”以基本上平行的侧排“SLAT-1”至“SLAT-6”排列。定子 700 的孔隙 708 也可以基本上平行于旋转轴“ α ”以基本上平行的纵排“SLONG-1”至“SLONG-7”排列。换言之,定子 700 的孔隙 708 可以为垂直排(即,侧排与纵排垂直)的格栅样模式排列,其具有与旋转轴“ α ”基本上平行的纵排“SLONG-1”至“SLONG-7”。

[0175] 与定子 700 的孔隙 708 类似,转子 600 的穿孔可以基本上垂直于旋转轴“ α ”以基本上平行的侧排“RLAT-1”至“RLAT-6”排列。然而,不是以垂直排的格栅样模式排列,转子 600 的穿孔 608 还可以按照沿螺旋状路径纵向延伸的基本上平行的排“RLONG-1”至“RLONG-7”排列。可选择地,转子 600 的穿孔 608 还可以按照与旋转轴“ α ”成角度而非平行地纵向延伸的基本上平行的排“RLONG-1”至“RLONG-7”排列。

[0176] 定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的穿孔 608 可以被构建为当将转子 600 设置在定子 700 内部时,侧排“SLAT-1”至“SLAT-6”分别至少部分地与侧排“RLAT-1”至“RLAT-6”对齐。以这种方式,当转子 600 在定子 700 内旋转时,穿孔 608 经过孔隙 708。

[0177] 在侧排“RLAT-1”至“RLAT-6”的每一排中的穿孔 608 可以侧向间隔开而使得在侧排内的所有穿孔 608 至少部分地与定子 700 的侧排“SLAT-1”至“SLAT-6”的对应侧排中的孔隙 708 同时对齐。纵向延伸的排“RLONG-1”至“RLONG-6”可以被构造成在每个纵向延伸的排中的第一侧排“RLAT-1”中的穿孔 608 在最后侧排“RLAT-6”中的穿孔 608 开始与定子 700 的对应最后侧排“SLAT-6”的孔隙 708 部分对齐之前完全经过对应侧排“SLAT-1”的孔隙 708。

[0178] 尽管在图 8 中,关于转子 600 图示了 6 个侧排和 6 个纵向延伸的排,关于定子 700 图示了 6 个侧排和 7 个纵向延伸的排,但是对于本领域的那些普通技术人员来说明显的是可以对转子 600 和 / 或定子 700 使用替代数目的侧排和 / 或纵向排而不背离本教导。

[0179] 为了确保在任一时刻在对应侧排之间仅有一对开口是一致的,在定子 700 上的侧排“SLAT-1”至“SLAT-6”的每一个中的孔隙 708 的数目可以与转子 600 上的对应侧排“RLAT-1”至“RLAT-6”的每一个中的穿孔 608 的数目相差预定的数目(例如,1 个、2 个以及类似数目)。因此,例如,如果侧排“RLAT-1”环绕转子 600 周围均匀地间隔有 20 个穿孔 608,则侧排“SLAT-1”可环绕定子 700 周围均匀地间隔有 20 个孔隙 708。

[0180] 回到图 7,混合室 330 具有开放的第一末端部分 332 和开放的第二末端部分 334。在转子 600 的侧壁 604 内形成的穿孔 608 使转子 600 的内部 610 与混合室 330 连接。

[0181] 转子 600 通过与转子 600 的旋转轴“ α ”对齐的驱动轴 500 在定子 700 内旋转。驱动轴 500 可以与转子 600 的第一末端部分 612 和第二末端部分 614 连接并延伸穿过转子 600 的中空内部 610。换言之,驱动轴 500 的部分 720 设置在转子 600 的中空内部 610 中。

[0182] 轴环 618 被构造为接纳设置在中空内部 610 中的驱动轴 500 的部分 721,并且轴环 622 被构造为接纳设置在中空内部 610 中的驱动轴 500 的部分 722。

[0183] 部分 721 具有可以在约 0.5 英寸至约 2.5 英寸的范围内的外径“D3”。在一些实施方式中,直径“D3”为约 0.625 英寸。部分 722 具有尽管不需要但是基本上与直径“D3”类似的外径“D4”。直径“D4”可以在约 0.375 英寸至约 2.5 英寸的范围内。

[0184] 转子 600 可以分别通过轴环 618 和轴环 622 不可旋转地固定到驱动轴 500 的部分 721 和部分 722 上。举例来说,轴环 618 和 622 的每一个可以分别安装到缓冲部分 616 和 620 内部。然后,可以加热合并的转子 600 和轴环 618 和 622 来使它们膨胀。接着,将驱动轴 500 穿过轴环 618 和 622 插入,并容许该部件冷却。随着在冷却期间轴环 618 和 622 收缩,它们分别紧密地环绕驱动轴 500 的部分 722A 和 722B,以足以防止驱动轴 500 相对于转子 600 旋转的紧密程度夹紧驱动轴 500。不相对于部分 721 旋转也不相对于缓冲部分 616 旋转的轴环 618 将驱动轴 500 的旋转传递给转子 600 的第一末端部分 612。不相对于部分 722 旋转也不相对于缓冲部分 620 旋转的轴环 622 将驱动轴 500 的旋转传递给转子 600 的第二末端部分 614。驱动轴 500 和转子 600 以单个单元一起旋转。

[0185] 驱动轴 500 可以具有第一末端部分 724(参见图 5)和第二末端部分 726(参见图 6)。第一末端部分 724 可以具有约 0.5 英寸至约 1.75 英寸的直径“D5”。在具体实施方式中,直径“D5”可以为约 1.25 英寸。第二末端部分 726 可以具有可以基本上与直径“D5”类似的直径“D6”。

[0186] 第二材料 120 可以通过旋转驱动轴 500 的第一末端部分 724 和第二末端部分 726 之一被运入混合室 330 中。驱动轴 500 的第一末端部分 724 和第二末端部分 726 的另一个

可以连接在发动机 510 上。在图 5 和图 6 中所描绘的实施方式中，第二材料 120 通过第一末端部分 724 被运入混合室 330，驱动轴 500 的第二末端部分 726 连接在发动机 510 上。

[0187] 转向图 5，驱动轴 500 可以具有在其中形成的通道 728，该通道 728 从第一末端部分 724 延伸进入设置在转子 600 的内部 610 的部分 720。通道 728 具有在第一末端部分 724 内形成的开口 730。当运行混合装置 100 时，第二材料 120 通过开口 730 被引入通道 728。

[0188] 阀 732 可以设置在位于驱动轴 500 的第一末端部分 724 中的通道 728 的部分内。阀 732 可以限制或者以其他方式控制第二材料 120 从中空内部 610 穿过通道 728 的逆向流动和 / 或第二材料 120 进入通道 728 的正向流动。阀 732 可以包括本领域内已知的任何阀，包括止回阀。合适的止回阀包括 The Lee Company USA 制造的零件号为“CKFA1876205A”的自由流动正向止回阀 (free flow forward check valve)，该公司在 Bothell, WA 具有办事处并且运营的网站为 www.theleeco.com。

[0189] 驱动轴 500 可以包括位于转子 600 的内部 610 的孔隙 740，该孔隙 740 连接通道 728 与转子 600 的内部 610。尽管图 5 中仅图示出了单个孔隙 740，但是对于本领域的那些普通技术人员来说明显的是可以使用多个孔隙来连接通道 728 与转子 600 的内部 610。

[0190] 参考图 2，任选地，外部泵 220 可以将第二材料 120 抽吸到混合装置 100 中。泵 220 可以包括本领域内已知的任何合适的泵。作为非限制性实例，泵 220 可以包括本领域内已知的任何合适的泵，包括隔膜泵、化学泵、蠕动泵、重力供料泵 (gravity feed pump)、活塞泵、齿轮泵、上述泵的任何的组合以及类似的泵。如果第二材料 120 为气体，则可以通过从来源 122 释放气体来将该气体加压并驱入在驱动轴 500 的第一末端部分 724 中所形成的开口 730。

[0191] 泵 220 或来源 122 通过阀 732 连接至通道 728。被运入通道 728 内部的第二材料 120 通过孔隙 740 出通道 728 进入转子 600 的内部 610。第二材料 120 随后通过转子 600 的侧壁 608 中所形成的穿孔 608 从转子 600 的内部 610 出来。

[0192] 参考图 5，混合装置 100 可以包括连接在驱动轴 500 的第一末端部分 724 的密封部件 750。密封部件 750 保持在壳体 520 所界定的室 752 内。室 752 具有横过该室与第二末端部分 756 间隔开的第一末端部分 754。室 752 还包括提供进入室 752 的通道的入口 758 和出口 759。室 752 可以通过壳体部分 550 和轴承壳体 530 界定。第一末端部分 754 可以在壳体部分 550 内形成，并且第二末端部分 756 可以与轴承壳体 530 邻接。入口 758 可以在轴承壳体 530 内形成，并且出口 759 可以在壳体部分 550 内形成。

[0193] 密封部件 750 包括安置在壳体部分 550 和轴承壳体 530 内的室 752 的第一末端部分 754 中的第一固定密封件 760。第一固定密封件 760 环绕驱动轴 500 的第一末端部分 724 的部分 762 延伸。密封部件 750 还包括安置在轴承壳体 530 中的室 752 的第二末端部分 756 中的第二固定密封件 766。第二固定密封件 766 环绕驱动轴 500 的第一末端部分 724 的部分 768 延伸。

[0194] 密封部件 750 包括不可旋转地连接在部分 762 和部分 768 之间的驱动轴 500 的第一末端部分 724 的旋转部件 770。旋转部件 770 与它们一起作为单元旋转。旋转部件 770 包括与第二密封件 774 相反的第一密封件 772。在第一密封件 772 和第二密封件 774 之间设置偏压构件 776 (如，弹簧)。偏压构件 776 向第一固定密封件 760 对第一密封件 772 加偏压，并且向第二固定密封件 766 对第二密封件 774 加偏压。

[0195] 将冷却润滑剂供应给室 752 和环绕旋转部件 770。润滑剂通过入口 758 进入室 752 并通过出口 759 从室 752 出来。润滑剂可以润滑由轴承壳体 530 所容纳的轴承部件 540。轴承壳体 530 和机械密封壳体 524 之间可以设置室 570。轴承壳体 530 还可以包括连接在室 570 的第二出口 759，润滑剂可以被抽吸到室 570 中。抽吸到室 570 中的润滑剂可以润滑轴承部件 540。密封部件 750 可以显著，即便不是极大地，降低装置的这个部分内由转子 600 旋转引起的摩擦力，并且可以增加密封件 770 的有效寿命。该密封件可以包括使用碳化硅构建的表面。

[0196] 参考图 9，在转子 600 环绕旋转轴“ α ”以箭头“C1”所指示的方向旋转时，转子将第二材料 120 排入混合室 330。排出的第二材料 120 的泡、小滴、粒子以及类似形式从转子 600 出来，并且被转子 600 赋予圆周速度（以箭头“C3”所指示的方向）。可以通过泵 220（参见图 2）、旋转转子 600 的离心力、第二材料 120 相对于第一材料 110 的浮力以及它们的组合来从混合室 330 驱出第二材料 120。

[0197] 发动机 510

[0198] 回到图 6，驱动轴 500 的第二末端部分 726 可以通过联接器 900 连接到发动机 500 的旋转心轴 780。心轴 780 一般可以具有直径“D7”为约 0.25 英寸至约 2.5 英寸的圆环形的横截面形状。在具体实施方式中，直径“D7”可以为约 0.25 英寸至约 1.5 英寸。尽管在图 6 中所描绘的实施方式中，驱动轴 500 的第一末端部分 724 的直径“D5”基本上等于心轴 780 的直径“D7”，但是其中直径“D5”和直径“D7”的一个大于另一个的实施方式在本发明的范围内。

[0199] 还参考图 4，可能需要覆盖或遮蔽联接器 900。在图 4 和 6 中所图示的实施方式中，驱动防护罩 910 覆盖联接器 900。驱动防护罩 910 一般可以为 U 形的，具有两侧为一对基本上线性的部分 915 和 916 的弯曲部分 914。驱动防护罩 910 的基本上线性的部分 915 和 916 的每一个的远端可以分别具有法兰 918 和 919。驱动防护罩 910 可以通过其法兰 918 和 919 的每一个紧扣到底座 106 上。

[0200] 发动机 510 可以通过支撑构件 920 被支撑在底座 106 上。支撑构件 920 可以连接到近心轴 780 的发动机 510 上。在所描绘的实施方式中，支撑构件 920 包括心轴 780 所通过的穿孔。支撑构件 920 可以使用本领域内已知的任何方法连接在发动机 510 上，包括用一个或多个螺栓 940 将支撑构件 920 拴到发动机 510 上。

[0201] 联接器 900 可以包括适于将足以旋转定子 700 内的转子 600 的量的扭矩从心轴 780 传送到驱动轴 500 上的任何联接器。在图 4 和 6 所图示的实施方式中，联接器 900 为波纹管联接器。如果心轴 780 和驱动轴 500 不对齐，则波纹管联接器是有利的。此外，波纹管联接器可以有助于吸收施加于驱动轴 500 上的轴向力，否则该轴向力将传递给心轴 780。合适的波纹管联接器包括由 Marlborough, MA 的 Ruland 制造有限公司 (Ruland Manufacturing Company, Inc.) 制造的“BC32-8-8-A”型联接器，该公司运营的网站为 www.ruland.com。

[0202] 发动机 510 可以约 0.1 转 / 分钟（“rpm”）至约 7200rpm 旋转转子 600。发动机 510 可以包括根据本教导适于旋转定子 700 内的转子 600 的任何发动机。作为非限制性实例，合适的发动机可以包括以 230/460 伏特和 3450/分钟（“rpm”）运行的二分之一马力发电机。合适的发动机包括 Grafton, WI 的 LEESON 电气公司 (LEESON Electric Corporation) 所制造的“C4T34NC4C”型发动机，该公司运营的网站为 www.leeson.com。

[0203] 第一室 310

[0204] 转向图 4 和 7,第一室 320 分别设置在第一机械密封壳体 524 与转子 600 的第一末端部分 612 之间的壳体 520 的中心部分 522 内和第一机械密封壳体 524 与定子 700 的第一末端部分 712 之间的壳体 520 的中心部分 522 内。第一室 310 可以为环形的并且具有基本上为圆环形的横截面形状。第一室 310 和混合室 330 形成连贯的体积。驱动轴 500 的部分 1020 穿过第一室 310 延伸。

[0205] 如在图 4 中所最好地观察到的,第一室 310 具有入口 1010,第一材料 110 穿过该入口 1010 进入混合装置 100。第一材料 110 可以通过外部泵 210 被抽吸到第一室 310 内(参见图 2)。外部泵 210 可以包括本领域内已知的用于将第一材料 110 以足以供应给第一室 310 的速率抽吸的任何泵。

[0206] 入口 1010 基本上垂直于旋转轴“ α ”定向。因此,第一材料 110 以正切穿过第一室 310 延伸的驱动轴 500 的部分 1020 的速度进入第一室 310。第一材料 110 进入第一室 310 的流动的切向方向由箭头“T1”标示。在图 4 和 7 中所描绘的实施方式中,入口 1010 可以偏移旋转轴“ α ”。如对本领域那些普通技术人员所明显的,驱动轴 500 的旋转方向(在图 9 中由箭头“C1”标示)具有切向分量。入口 1010 被放置成使得第一材料 110 以基本上与驱动轴 500 的旋转方向的切向分量相同的方向被运送进入第一室 310。

[0207] 第一材料 110 进入第一室 310 并且被环绕驱动轴 500 的部分 1020 的第一室 310 的内侧偏转。在其中第一室 310 具有基本上圆环形横截面形状的实施方式中,第一室 310 的内侧可以按环绕驱动轴 500 的部分 1020 的基本圆环形路径(由图 9 中的箭头“C2”标示)使第一材料 110 偏转。在这种实施方式中,第一材料 110 的切向速度可以使其以至少部分由切向速度决定的圆周速度环绕旋转轴“ α ”运送。

[0208] 第一材料 110 一旦在第一室 310 中,便被放置在第一室 310 中的泵 410 从第一室 310 中抽吸到混合室 330 中。在包括外部泵 210 的实施方式中(参见图 2),外部泵 210 可以被构造成以至少与泵 410 从第一室 310 抽吸第一材料 110 的速率一样高的速率将第一材料 110 抽吸到第一室 310 中。

[0209] 第一室 310 与混合室 330 的开放的第一末端部分 332 联通,并且在第一室 310 内的第一材料 110 可以自由地流入混合室 330 的开放的第一末端部分 332。以这种方式,第一材料 110 不会越过混合室 330 与第一室 310 之间的任何角落或拐弯。在所描绘的实施方式中,第一室 310 与混合室 330 的整个开放的第一末端部分 332 联通。第一室 310 可以完全用第一材料 110 填充。

[0210] 泵 410 由驱动轴 500 穿过第一室 310 延伸的部分 1020 提供动力。泵 410 可以包括本领域内已知的具有容纳在由固定壳体(即,壳体 520)界定的室(即,第一室 310)内的旋转泵构件 2022 的任何泵。合适的泵的非限制性实例包括:旋转式正排量泵(rotary positive displacement pump),如螺杆泵(progressive cavity pump)、单螺杆泵(例如,阿基米德螺旋泵)以及类似的泵。

[0211] 图 7 和 9 中所描绘的泵 410 一般称为单螺杆泵。在这个实施方式中,泵构件 2022 包括环绕驱动轴 500 的部分 1020 设置的轴环部分 2030。轴环部分 2030 与驱动轴 500 的部分 1020 一起作为单元旋转。轴环部分 2030 包括一个或多个流体排放构件 2040。在图 7 和 9 所描绘的实施方式中,轴环部分 2030 包括具有沿螺旋路径环绕轴环部分 2030 的螺旋

形状的单流体排放构件 2040。

[0212] 参考图 9, 图示了第一室 310 的内部。泵 410 赋予第一室 310 内的第一材料 110 向着混合室 330 的开放的第一末端部分 332 的轴向流 (由箭头“A1”和箭头“A2”标示)。由泵 410 所赋予的第一材料 110 的轴向流具有超过可由现有技术装置 10 (参见图 1) 的外部泵所获得的压力的压力。

[0213] 泵 410 还可以被构造在第一材料 110 向混合室 330 的开放的第一末端部分 332 运送时赋予第一材料 110 绕流 (由箭头“C2”标示)。在第一材料 110 进入混合室 330 之前赋予其的绕流使得已经以初始圆周速度以所需的方向运送的第一材料 110 进入混合室 330。在图 1 中所描绘的现有技术装置 10 中, 第一材料 110 进入现有技术装置 10 的通道 32 时没有圆周速度。因此, 单独的现有技术装置 10 的转子 12 必须赋予第一材料 110 绕流。由于第一材料 110 轴向移动, 在现有装置 10 中, 第一材料 110 以比第一材料 110 经过混合装置 100 的混合室 330 慢的圆周速度经过在转子 12 与定子 30 之间形成的通道 32 的至少一部分。换言之, 如果第一材料 110 的轴向速度在现有技术装置 10 和混合装置 100 二者中是相同的, 则第一材料 110 在经过混合室 330 的轴向长度之前能绕旋转轴“ α ”完成比在经过通道 32 的轴向长度之前完成的转数多的旋转。增加的旋转使第一材料 110 (和混合的第一材料 110 和第二材料 120) 暴露于定子 700 的实质上更大部分的有效内表面 706 (参见图 7)。

[0214] 在包括外部泵 210 的实施方式中 (参见图 2), 由与根据本教导定位的入口 1010 合并的外部泵 210 赋予的圆周速度可足以单独地增加第一材料 110 (和合并的第一材料 110 和第二材料 120) 环绕旋转轴“ α ”的旋转。此外, 在一些实施方式中, 由泵 210 赋予的圆周速度和由泵 410 赋予的圆周速度相组合达成了第一材料 110 (和合并的第一材料 110 和第二材料 120) 环绕旋转轴“ α ”的足够数目的旋转。如本领域的那些普通技术人员所理解的, 其他结构元件, 如第一室 310 的横截面形状可能有利于泵 210、泵 410 和它们的组合赋予的圆周速度。

[0215] 在图 10 中所描绘的替代性实施方式中, 泵 410 可以包括被构造在第一材料 110 向混合室 330 的开放的第一末端部分 332 运送时赋予第一材料 110 绕流的一个或多个叶片 2042。

[0216] 第二室 320

[0217] 现在转向图 4 和 7, 第二室 320 分别设置在第二机械密封壳体 526 与转子 600 的第二末端部分 614 之间的壳体 520 的中心部分 522 内和第二机械密封壳体 526 与定子 700 的第二末端部分 714 之间的壳体 520 的中心部分 522 内。第二室 320 可以基本上与第一室 310 类似。然而, 第二室 320 可以包括出口 3010 而不是入口 1010。驱动轴 500 的部分 3020 穿过第二室 320 延伸。

[0218] 第二室 320 和混合室 330 形成连贯的体积。此外, 第一室 310、混合室 330 和第二室 320 形成连贯的体积。第一材料 110 经混合装置 100 从第一室 310 流至混合室 330 并且最后流至第二室 320。当在混合室 300 中时, 第一材料 110 与第二材料 120 混合形成输出材料 102。输出材料 102 穿过出口 3010 从混合装置 100 出来。任选地, 输出材料 102 可以返回入口 1010 并且与另外数量的第二材料 120、第三材料 130 或它们的组合混合。

[0219] 出口 3010 基本上垂直于旋转轴“ α ”定向, 并且可以与第一室 310 中所形成的入口

1010 相反地定位。具有转子 600 赋予其的圆周速度（在图 9 中箭头“C3”所指示的方向）的输出材料 102 从混合室 330 进入第二室 320。圆周速度与穿过第二室 320 延伸的驱动轴 500 的部分 3020 正切。在图 4、6 和 7 中所描绘的实施方式中，出口 3010 可以偏移旋转轴“ α ”。出口 3010 被放置成使得以与驱动轴 500 旋转的方向（在图 9 中箭头“C1”所标示的方向）基本上相同的方向运送进入第二室 320 的输出材料 102 向着出口 3010 运送。

[0220] 输出材料 102 进入第二室 320 并且被环绕驱动轴 500 的部分 3020 的第二室 320 的内侧偏转。在其中第二室 320 具有基本上圆环形横截面形状的实施方式中，第二室 320 的内侧可以按环绕驱动轴 500 的部分 3020 的基本圆环形路径使输出材料 102 偏转。

[0221] 参考图 2，任选地，可以通过外部泵 430 从第二室 320 内抽吸输出材料 102。外部泵 430 可以包括本领域内已知的用于将输出材料 102 以足以避免限制混合装置 100 的通量的速率抽吸的任何泵。在这种实施方式中，在外部泵 430 从第二室 320 抽吸输出材料 102 时，外部泵 430 可以将切向速度（在图 4 和 11 中由箭头“T2”指示的方向）引入输出材料 102 的至少一部分中。输出材料 102 的该部分的切向速度可以使其以部分由切向速度决定的圆周速度环绕旋转轴“ α ”运送。

[0222] 泵 420

[0223] 转向图 6 和 7，放置在第二室 320 中的泵 420 可以将输出材料 102 从第二室 320 抽吸到出口 3010 中和 / 或从混合室 330 抽吸到第二室 320 中。在包括外部泵 430 的实施方式中，外部泵 430 可以被构造成以至少与泵 420 将输出材料 102 抽吸到出口 3010 的速率一样高的速率从第二室 320 抽吸输出材料 102。

[0224] 第二室 320 与混合室 330 的开放的第二末端部分 334 联通，并且在混合室 330 内的输出材料 102 可以自由地从开放的第二末端部分 334 流入第二室 320。以这种方式，输出材料 102 不会越过混合室 330 与第二室 320 之间的任何角落或拐弯。在所描绘的实施方式中，第二室 320 与混合室 330 的整个开放的第二末端部分 334 联通。第二室 320 可以完全用输出材料 102 填充。

[0225] 泵 420 由穿过第二室 320 延伸的驱动轴 500 的部分 3020 提供动力。泵 420 可以基本上与泵 410 相同。上文描述的适合用作泵 410 的任何泵可以用于泵 420。泵 410 将第一材料 110 抽吸到混合室 330 中，而泵 420 从混合室 330 中抽吸输出材料 102。因此，泵 410 和泵 420 两者可以在相同方向上定向抽吸。

[0226] 如本领域的那些普通技术人员所了解的，第一材料 110 可以与输出材料 102 不同。例如，第一材料 110 和输出材料 102 的一种可以比另一种更具粘性。因此，泵 410 可以与泵 420 不同。泵 410 可以被构造成适合第一材料 110 的特性并且泵 420 可以被构造成适合输出材料 102 的特性。

[0227] 图 6 和 7 中所描绘的泵 420 一般称为单螺杆泵。在这个实施方式中，泵构件 4022 包括环绕驱动轴 500 的部分 3020 设置的轴环部分 4030。轴环部分 4030 与驱动轴 500 的部分 3020 一起作为单元旋转。轴环部分 4030 包括一个或多个流体排放构件 4040。轴环部分 4030 包括具有沿螺旋路径环绕轴环部分 4030 的螺旋形状的单流体排放构件 4040。

[0228] 参考图 11，图示了第二室 320 的内部。泵 420 赋予第二室 320 内的输出材料 102 离开混合室 330 的开放的第二末端部分 334 的轴向流（由箭头“A3”和箭头“A4”标示）。

[0229] 泵 420 还可以被构造成在输出材料 102 离开混合室 330 的开放的第二末端部分

334 运送时赋予输出材料 102 绕流（由箭头“C4”标示）。输出材料 102 中被赋予的绕流可以有助于降低转子 600 所需的工作量。绕流还将输出材料 102 引向出口 3010。

[0230] 在替代性实施方式中，泵 420 可以具有图 10 中所描绘的泵 410 的基本上相同的构造。在这个实施方式中，构造一个或多个叶片 2042 以便在输出材料 102 离开混合室 330 的开放的第二末端部分 334 时赋予输出材料 102 绕流。

[0231] 如对于那些普通的技术人员明显的是，可以修改混合装置 100 的各种参数以获得不同的混合特征。可以被修改的示例性参数包括：穿孔 608 的尺寸、穿孔 608 的形状、穿孔 608 的排列、穿孔 608 的数目、孔隙 708 的尺寸、孔隙 708 的形状、孔隙 708 的排列、孔隙 708 的数目、转子 600 的形状、定子 700 的形状、混合室 330 的宽度、混合室 330 的长度、驱动轴 500 的转速、内部泵 410 所赋予的轴向速度、内部泵 410 所赋予的圆周速度、内部泵 420 所赋予的轴向速度、内部泵 420 所赋予的圆周速度、转子 600 的外表面 606 上所形成的干扰的构造（例如，纹理、突出、凹槽、孔隙以及类似构造）、定子 700 的内表面 706 上所形成的干扰的构造（例如，纹理、突出、凹槽、孔隙以及类似构造），以及类似参数。

[0232] 替代性实施方式

[0233] 参考图 12，描绘混合装置 5000。混合装置 5000 为混合装置 100 的替代性实施方式。本文使用相同的参考号来标示与混合装置 100 的对应组件基本上类似的混合装置 5000 的组件。将只描述与混合装置 100 的组件不同的混合装置 5000 的组件。

[0234] 混合装置 5000 包括用于容纳转子 600 和定子 5700 的壳体 5500。定子 5700 可以通过其第一末端部分 5712 和其第二末端部分 5714 不可旋转地连接至壳体 5500。在壳体 5500 和两侧为第一末端部分 5712 和第二末端部分 5714 的定子 5700 的部分 5820 之间界定了室 5800。壳体 5500 包括提供进入室 5800 的通道的入口 5830。入口 5830 可以基本上垂直于旋转轴“ α ”定向。然而，这并不是必需的。

[0235] 定子 5700 包括连接室 5800 和混合室 330（在转子 600 和定子 5700 之间界定）的多个穿孔 5708。可以使用外部泵 230 将第三材料 130（它可以与第二材料 120 相同）经由入口 5830 抽吸到室 5800 中。抽吸到室 5800 中的第三材料 130 可以经由定子 5700 中形成的穿孔 5708 进入混合室 330。可以通过泵 230、第三材料 130 相对于第一材料 110 的浮力以及它们的组合将第三材料 130 驱出通道 5800。随着转子 600 旋转，它还可以将第三材料 130 从通道 5800 拖入混合室 330。被转子 600 赋予圆周速度的第三材料 130 可以作为泡、小滴、粒子以及类似形式进入混合室 330。

[0236] 替代性实施方式

[0237] 混合装置 100 的替代性实施方式可以使用图 13 中所描绘的中心部分 5900 和图 14 中所描绘的轴承壳体 5920 构建。图 13 描绘在其内部具有定子 700（参见图 7）的中心部分 5900。本文使用相同的参考号来标示与混合装置 100 的对应组件基本上类似的、与中心部分 5900 相关的组件。将只描述与中心部分 522 的组件不同的中心部分 5900 的组件。中心部分 5900 和定子 700 两者都由导电性材料构建，所述材料如金属（例如，不锈钢）。入口 1010 和出口 3010 两者均由非导电性材料构建，所述材料如塑料（例如，PET、Teflon、尼龙、PVC、聚碳酸酯、ABS、Delrin、聚砜等）。

[0238] 电接触器 5910 与中心部分 5900 连接，并被构造为向其中递送电荷。中心部分 5900 将施加至电接触器 5910 的电荷传导至定子 700。在其他实施方式中，中心部分 5900 可以

由非导电性材料构建。在这类实施方式中,电接触器 5910 可以穿过中心部分 5900 并与定子 700 连接。由电接触器 5910 施加给定子 700 的电荷可以有助于混合室 330 内的氧化还原或其他化学反应。

[0239] 任选地,可以环绕中心部分 5900 设置绝缘材料(未显示)以将中心部分 5900 与环境电隔离。此外,可以在中心部分 5900 与其两侧的第一机械密封件 524 和第二机械密封件 526 之间使用绝缘材料以将中心部分 5900 与混合装置的其他组件电隔离。

[0240] 现在转向图 14,将描述轴承壳体 5920。轴承壳体 5920 环绕驱动轴 500 的部分 726 圆周设置。电接触器 5922 与轴承壳体 5920 连接。旋转电刷接触器 5924 提供驱动轴 500 和电接触器 5922 之间的电连接。

[0241] 在这个实施方式中,驱动轴 500 和转子 600 两者都由导电性材料构建,所述材料如金属(例如,不锈钢)。轴承壳体 5920 可以由导电性材料或非导电性材料构建。电荷通过电接触器 5922 和旋转电刷接触器 5924 施加给驱动轴 500。驱动轴 500 将电荷传导至转子 600。

[0242] 使用图 13 中所描绘的中心部分 5900 和图 14 中所描绘的轴承壳体 5920 构建的混合装置 100 的替代性实施方式可以按照至少两种方式操作。第一种,电接触器 5910 和 5922 可以被构造成分别不向定子 700 和转子 600 提供电荷。换言之,电接触器 5910 和 5922 均不与电流源、电压源以及类似物连接。

[0243] 可选择地,电接触器 5910 和 5922 可以被构造成分别向定子 700 和转子 600 提供电荷。例如,电接触器 5910 和 5922 可以与 DC 电压源(未显示)连接提供跨电接触器 5910 和 5922 的稳压或恒压。DC 电压源的负极可以与电接触器 5910 和 5922 的任一个连接,并且 DC 电压源的正极可以与电接触器 5910 和 5922 的另一个连接。跨电接触器 5910 和 5922 提供的电压可以在约 0.0001 伏特至约 1000 伏特的范围内。在具体实施方式中,电压可以在约 1.8 伏特至约 2.7 伏特的范围内。就另一实例而言,可以使用具有约 1% 至约 99% 之间的工作循环的脉冲 DC 电压。

[0244] 尽管运行混合装置的方法的上述实例跨电接触器 5910 和 5922 提供了 DC 电压,但是如对本领域内的那些普通技术人员明显的是,可以跨电接触器 5910 和 5922 提供具有各种形状和量值的对称 AC 电压或不对称 AC 电压,并且这些实施方式在本发明的范围内。

[0245] 混合室 330 内的混合

[0246] 如上面所提到的,在现有技术装置 10(在图 1 中显示)中,第一材料 110 经由单个受限的入口 37 进入转子 12 与定子 30 之间的通道 32,入口 37 仅沿通道 32 的开放的第二末端的一部分定位。同样,输出材料 102 经由单个受限的出口 40 出通道 32,出口 40 仅沿通道 32 的开放的第一末端的一部分定位。这种安排会引起不希望的和不必要的摩擦力。通过将单个受限的入口 37 和单个受限的出口 40 分别替换为室 310 和 320,降低了摩擦力。此外,第一材料 110 在进入混合室 330 之前不会越过角落并且输出材料 102 在出混合室 330 之前不会越过角落。而且,室 310 和 320 在进入通道 32 之前和出通道 32 之后为材料提供圆周速度。

[0247] 因此,跨混合装置 100 的压降基本上降低了。在图 2、4-9 和 11 中所描绘的实施方式中,在混合装置 100 被构造为每分钟产生约 60 加仑的输出材料 102 时,入口 1010 与出口 3010 之间的压降仅为约 12psi。这相对于图 1 中所描绘的现有技术装置 10 有所改善,

该现有技术装置 10 在每分钟产生约 60 加仑的输出材料时,入口与出口之间的压降为至少 26psi。换言之,跨混合装置 100 的压降小于现有技术装置 10 所经受的压降一半。

[0248] 根据其他方面,由驱动轴 500 提供动力的泵 410 和 420 的加入提供了与现有技术中所用的外部泵相比基本上更有效地混合材料并且需要更少的能量的构造。

[0249] **微穴**

[0250] 在混合装置 100 的运行期间,输入材料可以包括第一材料 110(例如,流体)和第二材料 120(例如,气体)。第一材料 110 和第二材料 120 在转子 600 与定子 700 之间形成的混合室 330 内混合。定子 700 内的转子 600 的旋转搅动混合室 330 内第一材料 110 和第二材料 120。转子 600 内形成的穿孔 608 和 / 或定子 700 内形成的孔隙 708 赋予混合室 330 内的第一材料 110 和第二材料 120 的流紊流。

[0251] 不受理论限制,据信第二材料 120 向第一材料 110 内扩散的效率和持久性部分地是由结合图 15-17 描述的微穴引起的。在材料流经光滑表面时,由于移动的流体和固定的表面之间的表面张力,形成了具有薄边界层的确切层流,该层流为静止的或移动极为缓慢。穿孔 608 和任选的孔隙 708 破坏层流并且可引起第一材料 110 的局部压缩和解压缩。如果在解压缩循环期间压力足够低,则材料中将形成空隙(穴泡)。穴泡产生像旋风一样的旋转流模式 5990,这是因为局部的低压区吸引主材料和输注材料,如图 15 中所示。当穴泡破裂时,产生极高的压力。在两个对齐的开口(例如,孔隙 708 之一和穿孔 608 之一)彼此经过时,出现振荡(冲击波),产生显著的能量。与穴和振荡相关的能量将第一材料 110 与第二材料 120 混合在一起至极高的程度,可能在分子水平。

[0252] 转子 600 的切向速度和每次旋转经过彼此的开口数目可决定混合装置 100 的频率。已确定在超声频率范围内运行混合装置 100 可能在许多应用中是有益的。据信在超声区频率内运行混合装置提供改变流体分子键角的最大的连续冲击能量,这使得其能运送其通常所不能保留的额外量的第二材料 120。当混合装置 100 用作扩散器时,混合装置 100 运行的频率似乎影响扩散的程度,从而导致第二材料 120(输注材料)在第一材料 110(主材料)中更长的持续性。

[0253] 现在参考图 15,提供了转子 600 的替代性实施方式转子 6000。可以将混合室 330 中第一材料 110 内产生的穴构造成沿混合室 330 的长度以不同频率出现。可以通过改变沿转子 600 的长度的穿孔 6608 的数目和 / 或布置来改变穴的频率。穿孔 6608 的每一个可以基本上类似于穿孔 608(上面讨论的)。

[0254] 作为非限制性实例,转子 6000 可以被再分为三个单独的示例性部分 6100、6200 和 6300。穿孔 6608 的密度从部分 6100 至部分 6200 增加,部分 6100 的孔的数目高于部分 6200 的孔的数目。穿孔 6608 的密度从部分 6200 至部分 6300 也是增加的,部分 6200 的孔的数目高于部分 6300 的孔的数目。由于部分 6100、6200 和 6300 中形成的穿孔 6608 数目不同,它们的每一个在它们的具体区域以不同的频率产生振荡。

[0255] 通过制造具有在具体区域内适当地排列的所需数目的穿孔 6608 的转子 6000,可以确定混合室 330 中振荡的所需频率。类似地,可以通过在定子 700 上的具体位置适当地排列的孔隙 708 的所需数目确定穴的所需频率,转子 600 在所述定子 700 中旋转。此外,混合室 330 内的所需的一个振荡频率(或多个振荡频率)可以通过选择定子 700 内形成的孔隙 708 的具体数目和排列以及转子 600 内形成的穿孔 608 的具体数目和排列来达成。

[0256] 图 19-21 描绘在定子 700 内形成的孔隙 708 和在转子 600 内形成的穿孔 608 的各种替代性排列, 它们被构成达成关于所产生的穴的不同结果。图 16 图解了其中孔隙 708 和穿孔 608 沿轴 7000 对齐的构造, 轴 7000 不与穿过转子 600 的旋转轴“ α ”的任何线(例如, 线 7010) 平行。换言之, 如果转子 600 具有圆柱形状, 轴 7000 不穿过转子 600 的中心。因此, 混合室 330 内的第一材料 110 的方向将不与孔隙 708 和穿孔 608 所产生的压缩和解压缩垂直。压缩和解压缩将替代地具有至少一个分量与混合室 330 内的第一材料 110 的绕流(在图 9 的箭头“C3”的方向)平行的力矢量。

[0257] 孔隙 708 与穿孔 608 的相对对齐也可以影响混合室 330 中的穴的产生。图 17 图解其中孔隙 708 跨混合室 330 与穿孔 608 对准的实施方式。在这个实施方式中, 转子 600 的旋转使转子的穿孔 608 与定子 700 的孔隙 708 直接对齐。当彼此直接对齐时, 由孔隙 708 和穿孔 608 产生的压缩和解压缩力直接彼此对齐。

[0258] 在图 18 中所描绘的实施方式中, 孔隙 708 和穿孔 608 沿旋转轴“ α ”偏移“X”的偏移量。作为非限制性实例, 偏移量“X”可以作为孔隙 708 的尺寸的函数来确定。例如, 偏移量“X”可以约等于孔隙 708 的直径的一半。可选择地, 偏移量“X”可以作为穿孔 608 的尺寸的函数来确定。例如, 偏移量“X”可以约等于穿孔 608 的直径的一半。如果转子 600 或定子 700 内包括不为穿孔 608 和孔隙 708 的部件(如, 凹陷、突出等)或除穿孔 608 和孔隙 708 外的其他部件(如, 凹陷、突出等), 则偏移量“X”可以作为这些部件的尺寸的函数确定。以这种方式, 由定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的穿孔 608 引起的压缩力和解压缩力以微小的偏移冲突, 在混合室 330 内引起额外的旋转力和扭矩力。这种额外的力增加了混合室 330 中第二材料 120 向第一材料 110 中的混合(例如, 扩散作用)。

[0259] 现在参考图 22-25, 提供了孔隙 708 和穿孔 608 的合适的横截面形状的非限制性实例。孔隙 708 和 / 或穿孔 608 的横截面形状可以如图 22 所示为正方形, 如图 23 所示为圆形以及类似形状。

[0260] 孔隙 708 和 / 或穿孔 608 的各种横截面形状可用于在转子 600 在定子 700 内旋转时改变第一材料 110 的流动。例如, 图 24 描绘具有与宽部分 7022 相对的窄部分 7020 的泪滴横截面形状。如果穿孔 608 具有这种泪滴形状, 则当转子 600 旋转时(通常以箭头“F”所指示的方向), 在混合室 330 中施加给第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 的力在材料由泪滴的宽部分 7022 向窄部分 7020 经过时增加。

[0261] 可以通过形成具有如图 25 所示的螺旋构造的孔隙 708 和 / 或穿孔 608 将另外的旋转力引入混合室 330。流入和流出具有螺旋构造的孔隙 708 和 / 或穿孔 608 的材料经受由螺旋构造所引发的旋转力。图 22-25 中所图解的实例作为可在混合装置 100 中采用的替代性实施方式的非限制性示例提供。通过本领域的普通技术人员的应用, 可以按多种方法构造孔隙 708 和 / 或穿孔 608 以实现适于在混合室 330 中混合材料的各种振荡和搅动力。

[0262] 双层效应

[0263] 混合装置 100 可以被构造为通过第一材料 110 与第二材料 120 的复杂且非线性流体动态相互作用产生输出材料 102, 复杂的动态紊流提供了进一步有利于电动效应(下面所述)的复杂混合。这些电动效应的结果可以在输出材料 102 内以电荷再分配和氧化还原反应观察到, 包括在输出材料内被稳定的溶解电子形式。

[0264] 表面基团的离子化或解离和 / 或从液体吸附离子使得与液体接触的大部分固体

表面变为带电荷的。参考图 26, 环绕与液体 7120 接触的示例性表面 7110 形成了电双层 (“EDL”) 7100。在 EDL 7100 中, 一个电荷的离子 7122(这种情况下为负电荷离子) 吸附到表面 7120, 并且形成通常被称为 Stern 层的表面层 7124。表面层 7124 吸引电荷相反并且量值相等的抗衡离子 7126(在这种情况下为正电荷离子), 该抗衡离子 7126 在表面层 7124 下形成通常被称为扩散层的抗衡离子层 7128。抗衡离子层 7128 比表面层 7124 分布更广泛并且位于下面的本体材料 7130 中均匀且相等分布的两种离子上。对于中性水中的 OH⁻ 和 H⁺ 离子, Gouy-Chapman 模型表明扩散抗衡离子层向水中延伸约 1 微米。

[0265] 根据具体方面, 上面提到的电动效应是由带电荷表面 7110 旁边的液体 7120 的移动引起的。在液体 7120(例如, 水、盐水溶液以及类似液体) 中, 形成表面层 7124 的吸附的离子 7122 被固定在表面 7120 上, 即使当液体 7120 在移动时(例如, 以箭头“G”所指示的方向流动); 然而, 剪切平面 7132 存在于与表面 7120 隔开的扩散抗衡离子层 7128 之内。因此, 在液体 7120 移动时, 扩散抗衡离子 7126 的一些被远离表面 7120, 而吸附的离子 7122 则保持在表面 7120 上。这产生了所谓的“流动电流”。

[0266] 在混合室 330 中, 第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 经受由定子 700 的内表面 705 和 / 或转子 600 的外表面 606 产生的电磁场、内表面 705 与外表面 606 之间的电压、和 / 或由在第一材料 110 中形成的至少一种 EDL 引起的电动效应(例如, 流动电流)。所述至少一种 EDL 可以通过定子 700 的内表面 705 和转子 600 的外表面 606 的至少一个被引入第一材料 110。

[0267] 第一材料 110 穿过混合室 330 相对于表面干扰(例如穿孔 608 和孔隙 708) 的移动产生了混合室 330 内的第一材料 110 中的穴, 该穴可以将第二材料 120 扩散到第一材料 110 中。这些穴可以增强第一材料 110 和 / 或第二材料 120 与定子 700 的内表面 705 上形成的电双层和 / 或转子 600 的外表面 606 上形成的电双层之间的接触。混合室的较大的表面与体积的比、混合材料在混合室内增加的滞留时间、以及进一步与小的平均泡尺寸组合(以及因此实质上更大的泡表面积)使得能有效对本发明的输出材料赋予 EDL 介导的效应。

[0268] 在其中内表面 705 和外表面 606 由诸如不锈钢的金属材料构造的实施方式中, 液体 7120 和 / 或所述一种或多种流动电流的运动有助于在内表面 705 和外表面 606 处的涉及 H₂O、OH⁻、H⁺ 和 O₂ 的氧化还原反应。

[0269] 参考图 27, 不受理论的限制, 据信内表面 705 与外表面 606 之间的混合室 330 的部分 7140 可以被模制成一对平行的板 7142 和 7144。如果第一材料 110 为液体, 则第一材料 110 通过入口“入”进入部分 7140 并且通过出口“出”从部分 7140 出来。入口“入”和出口“出”限制了进入部分 7140 和出部分 7140 的流体。

[0270] 参考图 28, 平行板 7142 和 7144 之间的区域具有高的表面积与体积的比。因此, 当第一材料 110 在板 7142 和 7144 之间移动时, 大部分的抗衡离子层 7128(和抗衡离子 7126) 可以是运动的。运动的抗衡离子 7126 的数目可以超过容许通过入口“入”进入部分 7140 的数目和容许通过出口“出”出部分 7140 的数目。分别将第一材料 110 供应至部分 7140 和从部分 7140 移出的入口“入”和出口“出”具有远小于平行板 7142 和 7144 的表面积(和较低的表面积与体积的比), 从而降低了第一材料 110 中进入和离开部分 7140 的运动的抗衡离子 7126 部分。因此, 进入部分 7140 和从部分 7140 出来局部地增加了流动电流。尽管混合装置 100 内总是存在由流动的第一材料 110 在任何表面上引起的背景流动电流(由箭

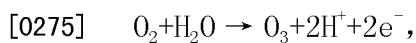
头“BSC”标示),板 7142 和 7144 将在部分 7140 内引入增加的“过量”流动电流(由箭头“ESC”标示)。

[0271] 在第一材料 110 流动的相反方向,板 7142 和 7144 中没有的导电性回流(由箭头“RC”标示),与吸附离子 7122 具有相同标记的过量电荷 7146 将在入口“入”附近积聚,而与抗衡离子 7126 具有相同标记的过量电荷 7148 将在出口“出”附近积聚。由于这种积聚电荷 7146 和 7148 相反并且因此相互吸引,所以不能产生试图通过导电装置结合在一起的不确定的积聚电荷。如果板 7142 和 7144 完全电绝缘,积聚的电荷 7146 和 7148 可以仅通过第一材料 110 自身再定位。当在部分 7140 中导电性回流(由箭头“RC”标示)基本上等同于过量的流动电流(由箭头“ESC”标示)时,达成具有 0 的静过量流动电流的稳态,并且在入口“入”附近的过量电荷 7146 与出口“出”附近的过量电荷 7148 之间的静电电势差在它们之间产生了稳态的电荷分离。

[0272] 电荷分离的量以及由此的入口“入”附近的过量电荷 7146 与出口“出”附近的过量电荷 7148 之间的静电电势差取决于由泵(例如,转子 600、内部泵 410 和 / 或外部泵 210)提供的每单位电荷的额外能量,该额外能量用于抵抗相反电场(由电荷分离产生)“推动”电荷以产生接近可由无离子(即,离子 7122 和 7126)液体所获得的流速的液体流速。如果板 7142 和 7144 是绝缘体,则静电电势差是泵(例如,转子 600、内部泵 410 和 / 或外部泵 210)可以产生的 EMF 的直接量度。在这种情况下,可以使用具有一对导线的电压计通过将导线之一放置在入口“入”附近的第一材料 110 中并将另一导线放置在出口“出”附近的第一材料 110 中来测量静电电势差。

[0273] 对于绝缘板 7142 和 7144,任何回流都是纯的离子电流(或离子流),因为回流只涉及离子穿过第一材料 110 的传导。如果在入口“入”附近的过量电荷 7146 和出口“出”附近的过量电荷 7148 之间存在通过更多导电性通路的其他导电机制,则回流可以使用那些更多导电性通路。例如,导电性金属板 7142 和 7144 可以提供更多导电性通路;然而这些更多导电性通路仅传递电子电流而不传递离子电流。

[0274] 如那些普通技术人员所了解的,为了将离子携带的电荷转移至金属中的一个或多个电子或者相反的情况,金属表面必须发生一个或多个氧化还原反应,产生反应产物。假设第一材料 110 是水 (H_2O) 并且第二材料 120 是氧 (O_2),将负电荷注入导电板 7142 和 7144 的氧化还原反应的非限制性实例包括下列已知的半电池反应:



[0276] 再次假设第一材料 110 为水 (H_2O) 并且第二材料 120 为氧 (O_2),氧化还原反应的非限制性实例包括下列已知的半电池反应,其将负电荷从导电板 7142 和 7144 移出,包括下列已知的半电池反应:



[0278] 对于导电金属板 7142 和 7144,据信大部分的回流为电子电流,因为导电板 7142 和 7144 导电性高于第一材料 110(条件是氧化还原反应快得足以不是限制因素)。对于导电金属板 7142 和 7144,入口“入”和出口“出”之间积聚了较少的电荷分离,并且其间存在少得多的静电电势。然而,这并不意味着 EMF 较少。

[0279] 如上文所述,EMF 涉及由泵提供的促进第一材料 110 抵抗由电荷分离产生的相反电场流动的每单位电荷的能量。由于静电电势较小,泵可以提供较少的每单位电荷的能量

来引起第一材料 110 流动。然而,上述实例的氧化还原反应不需要自发发生,并且因此可能需要可以由泵提供的工作输入。因此,可以使用 EMF 的一部分(在较小的静电电势差中不受影响的部分)来提供驱动氧化还原反应所需的能量。

[0280] 换言之,可以使用由泵提供的推动对抗由绝缘板 7142 和 7144 的电荷分离产生的相反电场的相同压力差来“推动”电荷穿过导电板 7142 和 7144 并驱动氧化还原反应。

[0281] 参考图 29,提供了本发明人进行的实验的实验设置。实验包括基本上相同的间隔开的一对 500ml 标准锥形瓶 7150 和 7152,它们各自含有一定体积的去离子水 7153。将橡胶塞子 7154 插入瓶 7150 和 7152 的每一个的开口端。塞子 7154 包含三条通路,各用于中空管 7156、正电极 7158 和负电极 7160。对于瓶 7150 和 7152 的每一个,中空管 7156、正电极 7158 和负电极 7160 的每一个都从瓶外穿过塞子 7154 延伸到瓶内的去离子水 7153 中。正电极 7158 和负电极 7160 由不锈钢构建。瓶 7150 和 7152 二者中的中空管 7156 都具有连接至通用氧来源 7164 的开口端部分 7162。插入瓶 7152 的正电极 7158 和负电极 7160 分别连接至 DC 电源 7168 的正极端子和负极端子。每个瓶中使用完全相同的喷头。

[0282] 氧以约 1SCFH 至约 1.3SCFH(合并的流速)的流速(进料)通过中空管 7156 流入瓶 7150 和 7152。跨插入瓶 7152 的正电极 7158 和负电极 7160 施加的电压为约 2.55 伏。选择这个值是因为相信该值为足以影响所有氧类的电化学电压值。连续施加这个电压 3 至 4 小时,其间来自来源 7164 的氧鼓入瓶 7150 和 7152 的每一个的去离子水 7153 中。

[0283] 用 HRPE 和连苯三酚测试瓶 7150 中的去离子水 7153 得到了 HRO 介导的连苯三酚反应活性,与本文所述的替代性转子/定子实施方式所产生的流体特性是一致的。HRP 光密度与相同氧含量的压力罐溶液或细泡溶液相比高约 20%。这个实验的结果表明混合室 330 内的混合涉及了氧化还原反应。根据具体方面,本发明的混合室提供包含增加的电子的输出材料,所述电子通过在本发明的输出溶液中的富含氧的水结构稳定或通过由于该过程内的电效应而存在的一些形式的氧类稳定。

[0284] 此外,采用工业上标准的比色测试安瓿瓶测试了瓶 7150 和 7152 两者中去离子水 7153 的臭氧和过氧化氢,该测试的灵敏度对于过氧化氢为 0.1ppm,对于臭氧为 0.6ppm。对于任一物质没有阳性迹象,直到这些安瓿瓶的检测限。

[0285] 滞留时间

[0286] 滞留时间是第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 在混合室 330 中花费的时间量。混合室 330 的长度与混合室 330 的直径比可以显著地影响滞留时间。该比率约大,则滞留时间越长。如在背景部分中所提到的,现有技术装置 10(参见图 1)的转子 12 具有约 7.500 英寸的直径和约 6.000 英寸的长度,提供了约 0.8 的长度与直径比。相比之下,在具体实施方式中,混合装置 100 的混合室 330 的长度为约 5 英寸并且转子 600 的直径“D1”为约 1.69 英寸,得到约 2.95 的长度与直径比。

[0287] 滞留时间代表第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 能够与本文所述的电动现象相互作用的时间量。现有技术装置 10 被构造为产生每分钟约 60 加仑的输出材料 102,而混合装置 100 被构造为产生每分钟约 0.5 加仑的输出材料 102,现有技术装置 10(参见图 1)具有约 0.05 秒的流体滞留时间,而混合装置 100 的实施方式具有约 0.35 秒的基本上较高(约 7 倍高)的滞留时间。这种较长的滞留时间容许第一材料 110、第二材料 120 和任选的第三材料 130 与混合室 330 内的表面 606 和 705(参见图 7)相互作用是现有

技术装置 10 的可能的时间的约 7 倍。在其他实施方式中,滞留时间是现有技术装置 10 可能的滞留时间的至少 1.5 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍或更长。

[0288] 参考以下表 1,通过首先以加仑 / 秒测定各装置的流速来计算上述滞留时间。在现有技术装置 10 被构造成以每分钟约 60 加仑的输出材料运行的情况下,而混合装置 100 被构造为在更宽的流速范围内运行,包括每分钟约 0.5 加仑的输出材料的最佳范围。然后通过以加仑 / 秒的流动速率乘以 1 加仑的立方英寸数(即,231 立方英寸)将流动速率转换为立方英寸 / 秒。然后,将现有技术装置 10 的通道 32 的体积(12.876 立方英寸)除以装置的流速(231 立方英寸 / 秒)以获得滞留时间(以秒表示),并且将混合装置 100 的混合室 330 的体积(0.673 立方英寸)除以装置的流速(以立方英寸 / 秒表示,为 1.925 立方英寸 / 秒)以获得滞留时间(以秒表示)。

[0289] 表 1. 本发明的装置可以适应一系列的滞留时间,包括与现有技术装置相比实质上增加的(例如,7 倍)滞留时间。

[0290]

装置	流速 加仑 / 分 钟	流速 加仑 / 秒	流速 立方英 寸 / 秒	混合室 体积 (立方 英寸)	滞留时 间(秒)
现有技 术装置 10	60	1.000	231.000	12.876	0.056

[0291]

装置	流速 加仑 / 分 钟	流速 加仑 / 秒	流速 立方英 寸 / 秒	混合室 体积 (立方 英寸)	滞留时 间(秒)
混合装 置 100	2	0.033	7.700	0.673	0.087
混合装 置 100	0.5	0.008	1.925	0.673	0.350

[0292] 表 I

[0293] 输注速率

[0294] 混合装置 100 的具体方面提供与现有技术相比,包括与现有技术装置 10(参见图 1)相比改善的氧输注速率。当第一材料 110 为水并且第二材料 120 为氧时,它们都在 20 摄氏度或近似 20 摄氏度以单次通过(即,图 2 的返回框被设置为“否”)被混合装置 100 处理,输出材料 102 具有约 43.8 百万分率的溶解氧水平。在某些方面,具有约 43.8ppm 的溶解氧的输出材料是经由本发明的流体通过本发明的非加压(非压力罐)法在约 350 毫秒内产生的。相比之下,当第一材料 110(水)和第二材料 120(氧)均在 20 摄氏度或近似 20 摄氏度以单次通过被现有技术装置 10 处理时,在 56 毫秒的单次通过中输出材料具有仅约 35 百万分率的溶解氧水平。

[0295] 输出材料 102

[0296] 当第一材料 110 为液体(例如,淡水、盐水、GATORADE®以及类似液体)并且第二材料 120 为气体(例如,氧、氮气以及类似气体)时,混合装置 100 可以使第二材料 120 扩散到第一材料 110 中。下面讨论为表征来自被混合装置 100 处理的输出材料 102 的一个或多个特性而对输出材料 102 进行分析的结果。

[0297] 当第一材料 110 为盐水溶液并且第二材料 120 为氧气时,实验表明在盐水溶液中产生的大部分氧泡的大小不大于 0.1 微米。

[0298] 溶解氧水平的衰减

[0299] 现在参考图 30,其中图解了在混合装置 100 中用氧处理并且储存在 500ml 的薄壁塑料瓶和 1000ml 的玻璃瓶的水中的 DO 水平。将每个瓶封盖并储存在 65 度华氏温度下。点 7900 为装瓶时的 DO 水平。线 7902 示出了亨利定律(Henry's Law)平衡状态(即,在 65 度华氏温度下水中应该有的溶解氧的量),它是略小于 10ppm 的 DO 水平。点 7904 和 7906 分别代表 65 天和 95 天塑料瓶中的水的 DO 水平。如可以在点 7904 处看到的,当塑料瓶在装瓶后约 65 天开瓶时,水中的 DO 水平为约 27.5ppm。当在装瓶后约 95 天开瓶时,如在点 7906 处所指示的,DO 水平为约 25ppm。同样,对于玻璃瓶,DO 水平在 65 天如点 7908 所指示为约 40ppm 并且在 95 天如点 7910 所示为约 41ppm。因此,图 30 表明在 65 度华氏温度下,塑料瓶和玻璃瓶中的 DO 水平均保持相对较高。

[0300] 现在参考图 31,其中图解了在混合装置 100 中富含氧并储存在 500ml 的薄壁塑料瓶和 1000ml 的玻璃瓶中达至少 365 天的水中的 DO 水平。将每个瓶封盖并储存在 65 度华氏温度下。如在图中可以看到的,富含氧的流体的 DO 水平保持相当恒定达至少 365 天。

[0301] 现在参考图 33,其中图解了在混合装置 100 中用氧富集并且储存在 500ml 的薄壁塑料瓶和 1000ml 的玻璃瓶中的水中的 DO 水平。将两种瓶子都在 39 度华氏温度下冷藏。再次,富含氧的流体的 DO 水平保持稳定并且仅略微降低达至少 365 天。

[0302] 施用的途径和形式

[0303] 如在此所用的“受治疗者”可指任何有生命的生物,优选地是动物,更优选地是哺乳动物,并且甚至更优选地是人。

[0304] 在具体的示例性实施方式中,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 G 蛋白受体相关病患的至少一种症状。本发明的治疗组合物包括能够被施用给需要它们的受治疗者的组合物。在

某些实施方式中，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试剂：载体、佐剂、乳化剂、悬浮剂、增甜剂、调味剂、香料和粘合剂。

[0305] 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（suppositorywax）；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。

[0306] 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。

[0307] 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性流体和递送新颖的富含气体的治疗性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。

[0308] 在某些实施方式中，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。在具体的实施方式中，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治疗者的改进的治疗组合物。

[0309] 某些实施方式提供了治疗组合物，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。

[0310] 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（intraocular）、耳内（intraotical））、鼻内、吸入以及可植入装置或材料的注射或插入。

[0311] 施用途径

[0312] 对于具体受治疗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。在某些实施方式中,口服或局部施用是优选的。

[0313] 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。

[0314] 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。

[0315] 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。

[0316] 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。

[0317] 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、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 (irrigation fluid) 及类似物。

[0318] 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。

[0319] 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。

[0320] 通过吸入施用的适合的制剂包括可凭借各种类型的计量剂量的加压气溶胶、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。

[0321] 对于经口腔的肺部施用,所述粉末或小滴的颗粒大小通常在 0.5–10 μm 的范围内,优选 1–5 μm ,以确保递送到支气管树中。对于鼻腔施用,在范围 10–500 μm 中的颗粒大小是优选的以确保驻留在鼻腔中。

[0322] 计量剂量的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。在某些实施方式中,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10 μL到150 μL)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。

[0323] 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。

[0324] 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。

[0325] 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试剂,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。

[0326] 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。

[0327] 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。

[0328] 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。

[0329] 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治疗者所需要的任何途径一起利用。

[0330] 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*（药物和药剂学实践），J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Bunker 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)。

[0331] 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。

[0332] 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。

[0333] 适合的药物载体描述于本领域的一本标准参考文本 Remington's Pharmaceutical Sciences（雷明顿药学），Mack 出版公司中。

[0334] 施用给受治疗者（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。适合的剂量是在受治疗者中产生已知实现希望的反应的治疗组合物的浓度。

[0335] 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。

[0336] 以下实施例仅是旨在说明而不以任何方式限制。

实施例

[0337] 实施例 1

[0338] 溶剂化电子的产生

[0339] 其他证据也已表明由本发明的扩散器装置产生的富集过程导致在富含气体的流体内的溶剂化电子。由于极谱溶解氧探头的结果，相信扩散的流体表现出电子俘获效应，因此流体在富含气体的材料内可包括溶剂化电子。

[0340] 存在两种用电学方法测量溶解氧水平的基本技术：电镀测量技术和极谱测量法。每种方法使用一个电极系统，其中被测试的溶液内的溶解氧水平与该探头的阴极反应以产生电流。溶解氧水平传感器由两个电极组成，一个阳极和一个阴极，所述阳极和阴极都浸入在传感器体内的电解质中。氧可渗透的膜将阳极和阴极与被测试的溶液分隔开。氧扩散经过该膜并且与该探头的内部组分相互作用以产生电流。阴极是氢电极并且相对于阳极携带负电位。电解质溶液包围电极对并且被膜包含。当没有氧存在时，阴极被氢极化并阻抗电

流的流动。当氧通过该膜时,阴极被去极化并且电子被消耗。阴极根据以下等式电化学将氧还原成羟基离子 :



[0342] 当进行根据本发明的系统的富含气体的溶液的溶解氧水平的测量时,反复经历溢出状态,其中溶解氧测定仪显示比该测定仪能够读出的更高的读数。然而,通过温克勒滴定对富含气体的溶液的评估表明该溶液的溶解氧 (DO) 水平比通过探头表明的更低。通常,DO 探头(例如在这些实验中使用的 Orion 862) 具有 60ppm 的最大读数。然而,当该测定仪被放在本发明的富含气体的水中时,它溢出。

[0343] 不希望被任何具体的作用机制束缚,该测定仪的机制在氧发生反应处响应电子。然而,根据电子自旋共振,在流体中不存在游离的离子。因此,流体可能包含由也存在于该流体中的氧类稳定的溶剂化电子。

[0344] 实施例 2

[0345] 谷胱甘肽过氧化物酶研究

[0346] 通过使用标准测定法 (Sigma) 测试与谷胱甘肽过氧化物酶的反应性来测试本发明的富含氧的流体中过氧化氢的存在。通过加入该酶混合物并颠倒来测试水样品。在 $A_{340\text{nm}}$ 和室温下 (25 摄氏度) 进行连续的分光率测定。所测试的样品是 :1. 去离子水 (阴性对照), 2. 低浓度本发明富含氧的流体, 3. 高浓度本发明富含氧的流体, 4. 过氧化氢 (阳性对照)。过氧化氢阳性对照示出强反应性, 而所测试的其他流体都不与谷胱甘肽过氧化物酶反应。

[0347] 实施例 3

[0348] MRSA 杀菌作用

[0349] 用本文所述的流体测试了甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA)。对于 MRSA, 使用 ATCC#29213 (甲氧西林敏感菌株 (MSSA))。在具体方面, 使用 ATCC#33591 (技术上 MRSA; 对甲氧西林为抗性的但是对苯唑西林敏感)。在具体方面, 使用 ORSA (ATCC#43300) (对苯唑西林和甲氧西林均为抗性的)。

[0350] 将 MRSA 暴露于苯唑西林与通过本文所公开的本发明装置处理的流体的组合或与通过本发明装置处理的富含气体的流体的组合。结果显示在以下表 1 中。如所表明的, 通过所述的装置 (Solas) 处理的流体与通过该装置的富含气体的流体 (OS20, 富含 20ppm 浓度的氧的流体; OS40, 富含 40ppm 的氧的流体; OS60, 富含 60ppm 浓度的氧的流体) 一样显示出比对照增加的 MRSA 细菌杀伤。

[0351] 表 1. 用本发明的电动产生的溶液对 MRSA 菌株的处理。百分比的数据值为没有生长 MRSA 的板的百分比。

[0352]

组分	在指定时间（分钟）没有生长的板的百分比						
	0 分钟	30 分钟	120 分钟	240 分钟	480 分钟	1080 分钟	1440 分钟
Solas	50.00%	0.00%	16.67%	33.33%	50.00%	100.00%	33.33%
OS 20	50.00%	0.00%	16.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
OS 40	16.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
OS 60	16.67%	0.00%	16.67%	16.67%	33.33%	0.00%	0.00%
药物	16.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
细菌	16.67%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

[0353] 实施例 4

[0354] (电动产生的超级充氧的流体和 Solas 示出在领域认可的人支气管收缩的动物模型 (人哮喘模型) 中提供了与沙丁胺醇的体内协同延长效应 (例如支气管收缩的抑制)

[0355] 实验 1：

[0356] 在开始的实验中,评估十六只豚鼠支气管扩张剂对气道功能连同醋甲胆碱诱导的支气管收缩的作用。在确定最佳给药后,以 50 μg/mL 对每只动物进行给药以递送每只动物在 250 μL 中的 12.5 μg 的硫酸沙丁胺醇的靶剂量。

[0357] 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 250 μL 的在一种或两种稀释剂中的 50 μg/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的水。使用 Penn Century 微型喷雾器以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位代表每个治疗组。

[0358] 在沙丁胺醇施用后 2 小时显示基线 PenH 值的至少 75% 的动物不被包括在数据分析中。这个排除标准是基于过去的研究,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。

[0359] 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。如以下表 3 中所列出的那样,组 B 动物的 50% (阴影的) 受保护免于支气管收缩达 10 小时 (在这个时间测试被终止)。

[0360] 表 3

[0361] 如用醋甲胆碱的攻击所测量的支气管收缩保护

[0362] 组 A

[0363] 按动物编号的免受支气管收缩的百分比保护

[0364]

时间 (小时)	1	2	3	4	5	6	7
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
2	20.81	23.82	32.89	11.56	7.91	24.95	20.15

6	15. 67	9. 96	8. 53	8. 40	81. 66	75. 60	91. 97
10	173. 92	130. 34	95. 45	68. 14	57. 85	103. 95	69. 03

[0365] 组 B

[0366] 按动物编号的免受支气管收缩的百分比保护

[0367]

时间 (小时)	1	2	3	4	5	6	7	8
0	100. 00	100. 00	100. 00	100. 00	100. 00	100. 00	100. 00	100. 00
2	15. 85	18. 03	17. 88	24. 09	18. 59	15. 18	21. 33	13. 33
6	211. 57	10. 96	68. 79	23. 72	11. 09	99. 00	118. 26	6. 95
10	174. 54	12. 87	88. 16	20. 40	21. 45	31. 60	123. 47	8. 46

[0368]

[0369] 实验 2 :在雄性 Hartley 豚鼠中用硫酸沙丁胺醇进行了 RDC1676 的支气管收缩评估 :

[0370] 使用更大数目的动物进行另外一组实验来评估本发明的电动产生的流体 (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醋甲胆碱诱导的支气管收缩的保护作用。

[0371] 材料:

[0372] 豚鼠 (Cavia porcellus) 是购自查尔斯河加拿大 (Charles River Canada) 公司 (St. Constant, 魁北克, 加拿大) 的 Hartley 白化病种, Cr1: (HA) BR。重量 :在治疗的开始是大约 $325 \pm 50\text{g}$ 。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.)。

[0373] 方法:

[0374] 施用途径是通过 Penn Century 微型喷雾器的气管内灌注和通过全身吸入的醋甲胆碱攻击。选择气管内途径以使对测试物品 / 对照溶液的肺部暴露最大化。已选择全身吸入攻击用于醋甲胆碱的攻击以便激起上气道超敏反应 (即支气管收缩)。

[0375] 治疗的持续时间是一天。

[0376] 表 4 示出实验设计。在 TA/ 对照施用后 2 小时, 使所有动物经历醋甲胆碱的吸入暴露 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$)。所有动物接受 $250 \mu\text{l}$ 的剂量体积。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 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度。

[0377] 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 ($500 \mu\text{g}/\text{mL}$) 中配制 4 个不同浓度的硫酸沙丁胺醇的溶液 (0、25、50 和 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$)。硫酸沙丁胺醇的这些浓度也被配制在非电

动产生的对照流体（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。在给药当天制备醋甲胆碱的溶液 (500 μg/ml)。

[0378] 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血管内灌注。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）使喉可见并且将微型喷雾器的尖端插入到气管中。施用 250 μl / 动物的剂量体积的测试物品或对照。

[0379] 使用补充来自 Buxco bias 流泵的空气的 aeroneb 超声喷雾器使醋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，每个运行在依靠位于排气线中的门阀而保持的微小的负压下。使用真空泵来以需要的流速抽空吸入室。

[0380] 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醋甲胆碱以引导严重的但非致命的急性支气管收缩的最大暴露时间。将四只动物暴露于醋甲胆碱 (500 μg/ml) 中 30 秒，并且在气溶胶开始后测量呼吸参数达 10 分钟。适当地调整醋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。

[0381] 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，并且在针对醋甲胆碱的气溶胶攻击开始后使用 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）和增强的暂停 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，之后醋甲胆碱、500ug/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)。

[0382] 在给药前的醋甲胆碱攻击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。

[0383] 将认为是非生理学的数据从进一步分析中排除。

[0384] 对经 15 分钟时间段的 Penh 改变进行作图并且 Penh 值被表达为曲线下面积。数字数据经历组平均值和标准差的计算（当适用时）。

[0385] 表 4. 实验设计；每组 7 只雄性豚鼠。

[0386]

组的标识	沙丁胺醇 (0 μg/ 动物)	沙丁胺醇 (6/25 μg/ 动物)	沙丁胺醇 (12.5 μg/ 动物)	沙丁胺醇 (25 μg/ 动物)
1(对照 1) (环境氧)	7 只雄性	7 只雄性	7 只雄性	7 只雄性
5(RDC1676-00 (Solas)	7 只雄性	7 只雄性	7 只雄性	7 只雄性

6(RDC1676-01 (20ppm 氧)	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性
7(RDC1676-02 (40ppm 氧)	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性
8(RDC1676-03 (60ppm 氧)	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性

[0387] 结果：

[0388] 如图 107A-D 所示,在不存在沙丁胺醇的情况下,当经 26 小时时段被测量时,本发明的电动产生的流体的施用对基线 PenH 值的平均百分比没有明显作用。

[0389] 然而出人意料地,如图 108A-D 所示,在本发明的电动产生的流体(在测试的所有氧水平的值;环境的(图 108-A)、20ppm(图 108-B)、40ppm(图 108-C) 和 60ppm(图 108-D))中配制的沙丁胺醇的施用(示出 25 μg 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作用的惊人的延长。即,醋甲胆碱结果显示沙丁胺醇延长支气管扩张达至少 26 小时。图 108A-D 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。

[0390] 因此,根据本发明的具体的方面,本发明的电动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,并且增长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。

[0391] 实施例 5

[0392] 细胞因子的概况

[0393] 从单个健康的人类志愿者供体获得混合的淋巴细胞。根据去除血小板的标准程序洗涤血沉棕黄层(buffy coat)样品。将淋巴细胞以每板 2×10^6 个的浓度在 RPMI 培养基(+50mm HEPES)中铺板,所述 RPMI 培养基用本发明的富含气体的流体或蒸馏水(对照)稀释。用 1 μg/mL 的 T3 抗原或 1 μg/mL 的植物凝集素(PHA)凝集素(全 T 细胞激活剂)刺激细胞或者未刺激细胞(阴性对照)。在 24 小时孵育后,检查细胞的生存力,提取并且冷冻上清液。

[0394] 将上清液融化、离心并使用 XMAP®(Luminex) bead lite 方案和平台测试细胞因子的表达。值得注意的是,IFN-γ 水平在具有 T3 抗原的本发明的富含气体的培养基中比在具有 T3 抗原的对照培养基中高,而 IL-8 在具有 T3 抗原的本发明的富含气体的培养基中比在具有 T3 抗原的对照培养基中低。另外,IL-6、IL-8 和 TNF-α 的水平在具有 PHA 的本发明的富含气体的培养基中比在具有 PHA 的对照培养基中低,而 IL-1b 水平在具有 PHA 的本发明的富含气体的流体中当与具有 PHA 的对照培养基相比时更低。在单独的气体本发明培养基中,IFN-γ 水平比在对照培养基中高。

[0395] 在具有本发明富含氧的流体(水)(孔 1、3 和 5)或蒸馏水(2、4 和 6)的完全 RPMI+50mm Hepes 中将两百万个细胞铺板到 24 孔板的 6 个孔中(将 10X RPMI 稀释到水中

以成为 1x)。用 1ug/ml T3 抗原 (孔 1 和孔 2) 或 PHA (孔 3 和孔 4) 刺激细胞。对照孔 5 和 6 不被刺激。在 24 小时后, 检查细胞的生存力, 收集并且冷冻上清液。接下来, 将上清液融化并且在 8,000g 离心以沉淀。使用 LUMINEX BEAD LITE 方案和平台针对所列出的细胞因子测定澄清的上清液。数字数据列于表 1 中。

[0396] 表 1

[0397]

样品	IFN	IL-10	IL-12p40	IL-12p70	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-1 β	IL-10	TNF α
1	0	0	0	2.85	0	0	7.98	20.3	1350	7.56	11500	15.5
2	0	0	0	3.08	0	0	8	15.2	8940	3.68	4280	7.94
3	0	581	168	3.15	0	0	8	16400	2200	3280	862	13700
4	0	377	56.3	4.22	0	0	8.08	23800	22100	33600	558	16200
5	0	0	0	2.51	0	0	7.99	24	1330	7.33	5900	8.55
6	0	0	0	2.77	0	0	8	5.98	3210	4.68	3330	0

[0398] 实施例 6

[0399] 细胞因子的表达

[0400] 在具体的方面, 用处于电动产生的富含氧的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-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-17、Eotaxin、IFN- γ 、GM-CSF、MIP-1 β 、MCP-1、G-CSF、FGFb、VEGF、TNF- α 、RANTES、瘦素 (Leptin)、TNF- β 、TGF- β 和 NGF 的改变。如从图 38 所看到的那样, 所测试的促炎细胞因子 (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 GM-CSF)、趋化因子 (IL-8、MIP-1 α 、RANTES 和 Eotaxin)、炎性酶 (iNOS、COX-2 和 MMP-9)、变态原的反应 (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, 所测试的抗炎性细胞因子 (例如 IL1R- α 、TIMP) 相比于对照流体在测试流体中增加。

[0401] 为了详述这些数据, 申请人使用涉及卵白蛋白敏化作用的领域认可的用于评定过敏性超敏反应的模型系统。研究的终点是该反应的具体的细胞学的和细胞的组分以及蛋白和 LDH 的血清学测量。进行细胞因子分析, 包括 Eotaxin、IL-1A、IL-1B、KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1A、RANTES、TNF-A 和 VCAM 的分析。

[0402] 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 (2.0mg/ml) 中的卵白蛋白 (OVA) V 级 (Grade V) (A5503-1G, Sigma), 在第 1、2 和 3 天各一次。该研究是随机化 2×2 因子排列的处理 (4 组)。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 (通过混合装置处理的无菌盐水) 和 RDC1676-01 (通过添加了额外氧的混合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 攻击。

[0403] 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配到 Aeroneb 的 12 个子室的单入口。

[0404] 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。

[0405] 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%) 攻击, 所述 OVA 是使用 Penn Century 微型喷雾器 (1A-1B 型) 通过气管内 (intratracheal) 灌注来递送的。RDC 1676-00 组的另外 6 只大鼠用通过气管内 (intratracheal) 灌注递送的盐水攻击作为对照组。第二天, RDC 1676-01 组重复该程序。

[0406] 再次攻击后二十四小时, 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, 均质化, 并送到实验室做进一步处理。

[0407] BAL 分析。收集肺灌洗液并且在 4°C 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°C 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°C, 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攻击时渗漏通过膜的血清组分) 的水平和细胞死亡。专有的测试边示出比对照略少的蛋白。

[0408] 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。

[0409] 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°C。

[0410] 对于利用 Tri-Reagent (TB-126, 分子研究中心公司 (Molecular ResearchCenter, Inc.)) 的 RNA 提取, 将 0.2mL 的全血或血浆加到 0.75mL 的 TRIReagent BD 中, 每 0.2mL 的全血或血浆补充 20 μL 的 5N 乙酸。将管摇动并储存在 -80°C。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°C 冰箱中 24 小时, 然后转移至 -80°C 长期储存。

[0411] 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进行。测量的单位是光度单位并且将这些组分成 OVA 攻击的对照、OVA 攻击的处理和用专有流体的盐水攻击的处理。

[0412] 对于 Agilent 基因阵列数据的产生, 将肺组织分离并浸在 TRI Reagent (TR118, 分子研究中心公司 (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 中均质化。将样品储存在 -80°C。

[0413] 血液样品：

[0414] 图 49–58 示出全血样品评估的结果。

[0415] 示例性的图 49 示出血液样品数据的基本光度数据呈现形式。指明所测量的细胞因子标识的字母（在这种情况下是 KC）是在每个数据图的右上方。数据作为单个样品的数据点（上图）和条形图（下图）而呈现。在每种情况下，从左到右将图分成四组。头两组（分别是 RDC 1676–000VA 和 RDC1676–010VA）是用卵白蛋白（OVA）通过吸入再攻击的组，而最后两组（分别是 RDC1676–000VA 和 RDC1676–010VA）是只用盐水对照再攻击的组。再一次，后缀 00 代表盐水处理，而后缀 01 代表电动产生的流体处理组。

[0416] 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 攻击的对照；OVA 攻击的电动产生的流体处理；接着是盐水攻击的盐水处理；和盐水攻击的电动产生的流体处理。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。

[0417] 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。

[0418] 图 50 示出根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 RANTES(IL-8 超家族) 分析。最左侧两组（OVA 攻击的组）的光度单位表明一般在 RDC1676–01 处理组中的值小于 RDC1676–00 对照组，如通过上图部分中的散点图所示，所示散点图再一次示出这两组之间 30–35% 的差异，而在只暴露于盐水的组中，细胞因子水平的值大致相同，或者可能在 RDC1676–01 处理组中略微升高。

[0419] 图 51 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 MCP-1 分析。最左侧两组（OVA 攻击的组）的光度单位表明一般在 RDC1676–01 处理组中的值小于 RDC1676–00 对照组，如通过上图部分中的散点图所示，而在只暴露于盐水的组中，细胞因子水平的值大致相同，或者可能在 RDC1676–01 处理组中略微升高。

[0420] 图 52 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 TNF α 分析。最左侧两组（OVA 攻击的组）的光度单位表明一般在 RDC1676–01 处理组中的值小于 RDC1676–00 对照组，如通过上图部分中的散点图所示，而在只暴露于盐水的组中，细胞因子水平的值大致相同，或者可能在 RDC1676–01 处理组中略微升高。

[0421] 图 53 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 MIP-1 α 分析。最左侧两组（OVA 攻击的组）的光度单位表明一般在 RDC1676–01 处理组中的值小于 RDC1676–00 对照组，如通过上图部分中的散点图所示，而在只暴露于盐水的组中，细胞因子水平的值大致相同，或者可能在 RDC1676–01 处理组中略微升高。

[0422] 图 54 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 IL-1 α 分析。最左侧两组（OVA 攻击的组）的光度单位表明一般在 RDC1676–01 处理组中的值小于 RDC1676–00 对照组，如通过上图部分中的散点图所示，而在只暴露于盐水的组中，细胞因子水平的值大致相同，或者可能在 RDC1676–01 处理组中略微升高。

[0423] 图 55 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 Vcam 分析。最左侧两组 (OVA 攻击的组) 的光度单位表明一般在 RDC1676-01 处理组中的值小于 RDC1676-00 对照组, 如通过上图部分中的散点图所示, 而在只暴露于盐水的组中, 细胞因子水平的值大致相同, 或者可能在 RDC1676-01 处理组中略微升高。

[0424] 图 56 示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 IL-1 β 分析。最左侧两组 (OVA 攻击的组) 的光度单位表明一般在 RDC1676-01 处理组中的值小于 RDC1676-00 对照组, 如通过上图部分中的散点图所示, 而在只暴露于盐水的组中, 细胞因子水平的值大致相同, 或者可能在 RDC1676-01 处理组中略微升高。

[0425] 图 57 和 58 分别示出在根据具体的示例性方面的血液样品数据中的 Eotaxin 和 MCP-3 的分析。在每种情况下, 最左侧两组 (OVA 攻击的组) 的光度单位表明一般在 RDC1676-01 处理组中的值小于 RDC1676-00 对照组, 如通过上图部分中的散点图所示, 而在只暴露于盐水的组中, 细胞因子水平的值大致相同, 或者可能在 RDC1676-01 处理组中略微升高。

[0426] 支气管灌洗样品:

[0427] 图 59-68 示出支气管肺泡灌洗流体 (BAL) 样品评估的对应结果。

[0428] 图 59 示出在根据具体的示例性方面的 BAL 数据中的 KC 分析。在这种情况下, 与取样差异性结合的反应水平就 RDC1676-01 与 RDC1676-00 处理组之间的差异而言是非决定性的; 也就是说, KC 示出在这 2 组之间相对小的差异, 但是光度的单位非常小。

[0429] 同样, 图 60 示出在根据具体的示例性方面的 BAL 数据中的 RANTES 分析, 并且示出在 RDC1676-01 组中的显著的可变性, 其中一个读数显著高于其他读数, 使结果偏斜。

[0430] 同样, 图 61 示出在根据具体的示例性方面的 BAL 数据中 TNF α 的分析, 并且示出在 RDC1676-01 与 RDC1676-00 处理组之间的差异方面相对小的显著性。

[0431] 图 62 示出在根据具体的示例性方面的 BAL 数据中 MCP-1 的分析, 并且示出在 RDC1676-01 与 RDC1676-00 处理组之间的差异方面相对小的显著性。

[0432] 图 63 到 68 分别示出在根据具体的示例性方面的 BAL 数据中 MIP1-A、IL-1 α 、Vcam、IL-1 β 、MCP-3 和 Eotaxin 的分析, 并且示出在 RDC1676-01 与 RDC1676-00 处理组之间的差异方面相对小的显著性。

[0433] 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 攻击组的 RDC1676-01 处理组与 RDC1676-00 处理组之间大约 30% 的差异。相比之下, 在非 OVA 攻击组的 RDC1676-01 处理组与 RDC1676-00 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小基线改变。

[0434] 实施例 7

[0435] 缓激肽 B2 受体亲和力结合

[0436] 利用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器 Octet Rapid ExtendedDetection (RED) (forteBioTM) 以便检查缓激肽配体与缓激肽 B2 受体的膜受体亲和力结合。该生物传感器系统由嵌入到聚丙烯集线器中的、尖端具有传感器特定的化学的

抛光光学纤维组成。该生物传感器装置具有连接到光学纤维尖端的分子层，所述分子层在检测器产生干涉图。所结合的分子数目的任何改变引起光图像的测量位移。

[0437] 如图 69 所示，缓激肽 B2 膜受体被固定到氨基硅烷 (APS) 生物传感器上。样品板设置如图 69 中所指示，并且在图 70 中进行分析。接下来，根据如图 71 中所指明的样品设置对缓激肽与固定化受体的结合进行了评定。缓激肽结合的结果示于图 72 中。根据在图 73 中所指明的设置进一步滴定与受体结合的缓激肽。

[0438] 如图 74 所表明的，缓激肽与 B2 受体的结合是浓度依赖性的，并且在本公开的专有的富含气体的盐水流体中与生理盐水相比提高了结合亲和力。缓激肽与 B2 受体结合的稳定示于图 75 中。

[0439] 实施例 8

[0440] (将调节性 T 细胞测定用来显示在调节性 T 细胞测定中本发明的电动产生的流体在 T 细胞增殖和细胞因子 (IL-10) 及其他蛋白 (例如 GITR、粒酶 A、XCL1、pStat 和 Foxp3) 的调节和例如在 PBMC 中的类胰蛋白酶的调节中的作用)。

[0441] 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式调节 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。

[0442] 方法：

[0443] 简言之，在分选中使用的 FITC 缀合的抗 CD25 (ACT-1) 抗体购自 DakoCytomation (芝加哥, 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。

[0444] CD4+T 细胞是用 CD4+Rosette 试剂盒 (Rosette Kit) (干细胞技术 (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。

[0445] 在圆底 96 孔微量滴定板中进行抑制测定。如所示加入 3.75×10^3 CD4+CD25neg 应答 T 细胞、 3.75×10^3 自体 T reg、 3.75×10^4 同种异体的受辐射的去除 CD3 的 PBMC。所有孔补充以抗 CD3 (5.0 ug/ml 的克隆 HIT3a)。在补充以 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中于 37°C 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 1.0 mCi 的 ^{3}H -胸苷。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 (干细胞技术 (StemCell Technologies)) 紧接着 40Gy 的辐射来去除 T 细胞。

[0446] 用抗 CD3 和抗 CD28 条件刺激调节性 T 细胞，然后用 Live/Dead Red 生存力染料 (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 **Permeabilizer III®** 中透化。然后将细胞用针对每种具体选定分子的抗体染色。

[0447] 使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。通过使用双尾、不成对的 t 检验对两个组作比较。通过使用单因子方差分析对三组作比较。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。

[0448] 结果:

[0449] 如在图 76 中所示, 通过用柴油机排气微粒物 (PM, 来自 EPA) 刺激细胞研究了调节性 T 细胞的增殖。图 76 的 x 轴示出作为实心黑条的激活的自体 CD4+ 效应 T 细胞 (应答细胞) 和灰色条的单独的调节性 T 细胞 (为证实无反应性 (anergy) 而示出), 二者以 1 : 1 比率混合如白色条所示出。y 轴示出如由 ^{3}H - 胸苷的摄入所测量的增殖。如沿着 x 轴从左到右所示出的, “PM”表示柴油机排气获得的微粒物, “PM+Rev”表示 PM 加上本公开的富含气体的电动产生的流体 (Rev), “Solis”表示本公开的电动产生的流体和除了仅环境气体之外不富含气体的装置 (未添加 PM), “Rev”表示如以上所定义的单独 Rev (未添加 PM), “培养基”表示单独细胞生长培养基的对照 (减去 PM; 无 Rev, 无 Solis), 并且“盐水 Con”表示盐水对照 (减去 PM; 无 Rev, 无 Solis), “V”表示维拉帕米, 并且“P”表示心得安 (propanolol), 并且“DT”是 1 : 50 的 DT390。

[0450] 如在图 77 中所示, 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, 并且阻断图 77 中 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。

[0451] 同样, 用 GITR、粒酶 A、XCL1、pStat 和 Foxp3 分别获得了图 78-82 中所示的相似的结果。在各图中, “NSC”与“Solis”相同 (无 PM)。

[0452] 图 83 示出从评估类胰蛋白酶的外周血单核细胞 (PBMC) 的过敏性哮喘 (AA) 的概况获得的 AA PBMC 数据。该 AA PBMC 数据与以上 T 调节性细胞数据是一致的, 因为用微粒物 (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作用, 导致如对于单独的 PM(减去 Rev; 无 Rev, 无 Solis) 所看到细胞中升高的类胰蛋白酶水平。注意, 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。

[0453] 总之, 图 76 的数据 (示出存在 PM 和 Rev 与在对照流体中存在 PM(无 Rev, 无 Solis) 相比减少的增殖) 表明本发明的电动产生的流体 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, 这个实施例和图 76-83 的证据表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙通道阻断影响 Reversa 对 Treg 功能的活性。

[0454] 实施例 9

[0455] (用本发明的电动产生的流体处理主支气管上皮细胞 (BEC) 导致气道炎症途径的两种主要蛋白 MMP9 和 TSLP 的表达和 / 或活性降低)

[0456] 综述。如以上实施例 7 中所示 (例如图 75, 使用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器、Octet Rapid Extended Detection (RED) (forteBioTM) 示出缓激肽与 B2 受体结合的稳定), 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电动产生的流体 (例如 Rev; 富含气体的电动产生的流体) 中增加了结合亲和力。另外, 如在用

柴油排气微粒物 (PM, 标准的商品化来源) 刺激的 T 调节性细胞的背景下的实施例 8 中所示, 数据示出存在 PM 和 Rev 与在对照流体中存在 PM(无 Rev, 无 Solis) 相比减少了 T 调节性细胞的增殖 (图 76), 表明本发明的电动产生的流体 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, 在用微粒物 (PM) 刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 的过敏性哮喘 (AA) 的概况的背景下, 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, 在实施例 8 和图 76-83 中示出的白喉毒素 (DT390, 一种截短的白喉毒素分子; 饱和的商品化浓度的 1 : 50 稀释) 的作用表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙通道阻断影响电动产生的流体对 Treg 和 PBMC 功能的活性。此外, 实施例 9 中的数据示出根据其他方面, 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。图 85-89 分别示出连接黏着分子 JAM 2 和 JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4 和 GJA5 (连接黏附素)、OCLN (闭合蛋白)、密蛋白 (例如 CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1 (紧密连接蛋白 1) 的上调。此外, 如实施例 15 的膜片钳研究中所示, 本发明的电动产生的流体 (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。

[0457] 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。

[0458] 材料和方法:

[0459] 将商购获得的人的主支气管上皮细胞 (BEC) (来自 Promocell, Germany 的 HBEP-C-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 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 连同柴油机排气微粒物 (DEP 或 PM) 一起在细胞被运送用于 FACS 分析之前将这些细胞处理 6 小时, 如在本文实施例 8 中所述。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。

[0460] 结果:

[0461] 在图 115 和 116 中, DEP 代表暴露于单独的柴油机排气微粒物 (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” 代表用微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 Revera 60 的存在下用微粒物处理的细胞。此外, “Solas” 和 “DEP+Solas” 分别代表暴露于单独的或与微粒物组合的对照流体 Solas 的细胞。

[0462] 图 115 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 TSLP 受体表达降低 55%, 而生理盐水不能产生 TSLP 受体表达的相似水平的降低 (大约 20% 的降低)。考虑到最近的发现成果, 本发明的溶液在降低 TSLP 受体的表达中的作用是一项重要发现, 所述最近的发现成果示出 TSLP 在过敏性哮喘的病理学和 TSLP 受体功能缓解的过敏性疾病局部抗体介导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: 过敏性炎症的主开关), 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 受体缓解的过敏性疾病的局部阻断), Clin Immunol. 2008, Aug 29. (印刷前的电子版))。

[0463] 同样, 图 116 示出 Revera 60、Solas 和生理盐水对 DEP 介导的 MMP 9 的增加的作用。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。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, 已显示与健康的对照受治疗者相比, MMP-9 的水平在患有稳定哮喘的患者中显著提高并且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应答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 Med 158 :1945–1950, 1998; Hoshino 等人, Inhaled corticosteroids decreases 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 Immunol 108 :1021–1026, 2001; 以及 Lee 等人, Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1 expression 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 Immunol 2003 ;111 :1278–1284)。

[0464] 因此, 根据其他方面, 本发明的电动产生的流体具有调节 (例如降低) TSLP 受体表达和 / 或抑制 MMP-9 的表达和 / 或活性的大量的治疗效用, 包括例如炎症和哮喘的治疗。

[0465] 实施例 10

[0466] (本发明的电动产生的流体显示出在领域认可的过敏性哮喘的动物模型中具有与布地奈德的协同抗炎效应)

[0467] 这个工作实施例描述了如下实验: 进行这些实验来评定本发明的电动产生的流体 (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作用的领域认可的模型, 并且这个品系已被

广泛地用作例如过敏性哮喘的模型。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那些相似 (Elwood 等人, J Allergy Clin Immunol 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。在卵白蛋白攻击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。在攻击后 6 小时和 24 小时, 测量了总的血细胞计数和几种促炎细胞因子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作用。

[0468] 材料和方法:

[0469] 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。

[0470] 敏化。在实验的第一天, 通过施用 1ml 腹膜内注射的新鲜制备的每 1ml 0.9% 氯化钠的 2mg 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。

[0471] 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 (电动产生的流体 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 的全身室对动物进行给药, 并且使用补充来自 Buxco 偏流泵的空气的 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。

[0472] 卵白蛋白攻击。在第 21 天, 在用测试溶液处理后 2 小时, 所有动物用 1% 卵白蛋白雾化溶液攻击 15 分钟 (在全身室中以 2L/min 的气流)。

[0473] 样品采集。在卵白蛋白攻击后 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促炎细胞因子和抗炎细胞因子的水平。此外, 在卵白蛋白攻击后立即和在卵白蛋白攻击后 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。

[0474] 结果:

[0475] 嗜酸性细胞计数: 如预期的和在图 109 中示出的那样, 用布地奈德 (“NS+ 布地奈德 750 μg/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 (空心的条图) 进行的处理相比在攻击的动物中降低了总嗜酸性细胞计数。另外, 而用本发明的流体 “RDC 1676-03” 单独处理 (画有少许交叉阴影线的条图) 不显著降低嗜酸性细胞计数, 尽管如此, 它展示出在降低嗜酸性细胞计数中与布地奈德的明显协同效应 (“RDC1676-03+ 布地奈德 750 μg/Kg”, 实心黑色条图)。类似地, 在图 110 中, 嗜酸性细胞 % 也反映了相似的趋势。而单独的 RDC1676-03 (画有少许交叉阴影线的条图) 或布地奈德 750ug/kg (画有浓密交叉阴影线的条图) 对攻击的动物中的嗜酸性细胞 % 计数并不具有显著作用, 这二者结合显著地降低了嗜酸性细胞 % (实心黑色条图)。

[0476] 因此, 图 109 和图 110 根据本发明的具体方面示出本发明的电动产生的流体 (例如 RDC1676-03) 显示出在人类过敏性哮喘的领域认可的大鼠模型中具有显著降低嗜酸性细胞计数 (“嗜酸性细胞 %” 和总计数) 的与布地奈德组合的明显协同效用。

[0477] 呼吸参数：

[0478] 图 111A-C 和 112A-C 显示测试流体对在卵白蛋白攻击后立即、6 小时和 24 小时所测量的 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。

[0479] $\text{Penh} = (\text{最大呼气流量} / \text{最大吸气流量}) * (\text{呼气时间} / \text{呼出 } 65\% \text{ 的呼气量的时间} - 1)$ 。

[0480] 如从图 111A-C 中明显的，用布地奈德（以 500ug/kg 和 750ug/kg 二者）单独处理或与任何测试流体组合处理不能在攻击后立即影响 Penh 值。然而，在攻击后 6 小时，用 RDC1676-03 单独处理或与布地奈德 500ug/kg 或 750ug/kg 组合处理的动物显示 Penh 值的显著下降。尽管这种下降程度到攻击后 24 小时减小，但在这个时间点仍观察到布地奈德与 RDC 流体的协同效应的趋势。

[0481] 潮气量是在从终末呼气位置开始的吸气期间内被吸入到肺中的空气的容积，所述空气在平静呼吸过程中的呼气期间被动地离开肺。如在图 112A-C 中所示，用布地奈德单独处理的动物示出在攻击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 对潮气量有显著的刺激性作用。并且再次，与布地奈德 (500ug/kg 和 750ug/kg) 组合的 RDC1676-03 对这个时间点的潮气量测量具有更加显著的作用。在攻击后六小时，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作用。然而，在这些早期时间点所观察到的任何作用到 24 小时的时间点消失了。

[0482] 综观来说，这些数据显示 RDC1676-03 单独或与布地奈德组合一起提供了对气道炎症的显著缓解，如通过在攻击后 6 小时潮气量的增加和 Penh 值的减少所证明的。

[0483] 细胞因子分析：

[0484] 为了分析在以上讨论的生理学参数上看到的作用的机制，在生理学测量之后立即测量了在攻击后 6 小时和 24 小时所采集的血液样品中的许多促炎细胞因子以及抗炎细胞因子。

[0485] 图 113A 和 113B 清楚地显示单独的 Rev 60 (或 RDC1676-03) 在攻击后 6 小时和 24 小时都显著降低了 eotaxin 的血液水平。布地奈德 750ug/kg 在这两个时间点也降低了血液 eotaxin 的水平，而布地奈德 250ug/kg 仅在后面的时间点有值得注意的作用。然而，单独的测试溶液 Rev 60 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 eotaxin 的水平中）的作用。Eotaxin 是已知积累在和吸引嗜酸性细胞到过敏反应中的哮喘性肺和其他组织（例如在克罗恩病中的肠）中的小的碳 - 碳趋化因子。Eotaxin 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、嗜碱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 eotaxin 和 CCR3 的产生增加以及在这些分子与气道高应答性之间建立联系（综述于 Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung (Eotaxin 与吸引嗜酸性细胞到哮喘性肺)，Dolores M Conroy 和 Timothy J Williams Respiratory Research 2001, 2 :150-156 中）。特别令人感兴趣的是注意这些研究完全赞同图 109 和 110 中关于嗜酸性细胞计数的结果。

[0486] 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攻击后 24 小时血液中的嗜酸性细胞的总计数和%。这与早在攻击后 6 小时所观察到的血液中 eotaxin 水平的显著下降相关。

[0487] 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 的血液水平也在攻击后 6 小时显著增强。图 113C 和 113D 分别示出对于干扰素 γ 和 IL10 的此类作用。从这些图中明显的是单独的 Rev 60 或与布地奈德 250ug/kg 组合的 Rev 60 在直至攻击后 6 小时显著提高攻击动物的 IL10 的血液水平。类似地,Rev 60 单独或与布地奈德 250 或 750ug/kg 组合在攻击后 6 小时显著提高 IFN γ 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攻击后 6 小时在生理学呼吸参数上所看到的有益作用。在攻击后 24 小时不再观察到对这些细胞因子的作用(数据未示出)。

[0488] Rante 或 CCL5 是由循环性 T 细胞表达的细胞因子并且对于 T 细胞、嗜酸性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 也激活嗜酸性细胞来释放例如嗜酸性阳离子蛋白。它改变嗜酸性细胞的密度并且使它们低密度,这被认为代表一般化的细胞激活状态。它也是对于嗜酸性细胞特异的氧化代谢的有力激活剂。

[0489] 如在图 114 中所示,在用 Rev 60 单独或与布地奈德 250 或 750ug/kg 组合处理的动物中攻击后 6 小时而不是 24 小时显著降低了 Rante 的全身水平。再一次,具有这组数据中指出的布地奈德 750ug/kg 与 Rev 60 的清楚的协同效应。对于许多其他的促炎细胞因子例如 KC 或 IL8、MCP3、IL1b、GCSF、TGFb 以及 NGF 来说,在用 Rev60 单独或与布地奈德组合处理的动物中在攻击后 6 小时或 24 小时观察,观察到类似的向下趋势。

[0490] 实施例 11

[0491] (本发明的治疗性流体具有调节细胞间紧密连接的实质效用)

[0492] 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,包括与包括示例性多肽鲑鱼降钙素(sCT)的多肽的肺部和全身递送以及生物利用度相关的那些效用。

[0493] 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。

[0494] 方法:

[0495] 气管内药物递送。根据具体的实施方式,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 Micro-Sprayer 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。

[0496] 动物组和给药。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 O₂ 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

实施方式中,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 200 μ L 中的 10 μ g sCT)。[0497] 测定。在具体的方面,采集血液样品(例如 200 μ l) 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°C 直到使用 ELISA 测定 sCT。

[0498] 对于 Agilent 基因阵列数据的产生,将肺组织分离并浸没在 TRIReagent (TR118, 分子研究中心公司 (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 TeflonTM 或 PolytronTM 均质器使样品在 TRI Reagent 中均质化。将样品储存在 -80°C。

[0499] 结果:

[0500] 紧密连接的增强。图 84 示出 RDC1676-01(被处理通过具有添加的额外的氧的本专有装置的无菌盐水;本公开的富含气体的电动产生的流体 (Rev)) 减少了 sCT 的全身递送和生物利用度。根据具体的方面,减少的全身递送产生于 sCT 的吸附减少,最可能产生于肺部紧密连接的增强。RDC1676-00 表示根据本公开的方法处理但没有充氧的无菌盐水。

[0501] 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。图 85–89 分别示出连接黏着分子 JAM 2 和 JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4 和 GJA5(连接黏附素)、OCLN(闭合蛋白)、密蛋白(例如 CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1(紧密连接蛋白 1) 的上调。

[0502] 实施例 12

[0503] (本发明的治疗性流体具有调节一氧化氮水平的实质效应)

[0504] 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一氧化氮水平和 / 或相关酶的实质效应。图 90–94 示出从暴露于 RDC1676-01(被处理通过具有添加的额外的氧的本专有装置的无菌盐水;本公开内容的富含气体的电动产生的流体 (Rev)) 的人包皮的角质形成细胞获得的数据,显示出 NOS1 和 NOS3、以及 Nostrin、NOS3 的上调。相比之下,从大鼠肺组织(以上名为“细胞因子表达”的实施例的组织)获得的数据示出用 Rev 的 NOS2 和 NOS3、Nostrin 和 NOS 1AP 的下调(图 93、94)。

[0505] 实施例 13

[0506] (使用包含绝缘的转子和定子部件的特别设计的混合装置显示局部化的电动效应(电压 / 电流))

[0507] 在这个实施例中,使用包含绝缘的转子和定子部件的特别设计的混合装置显示部件 - 局部化的电动效应(电压 / 电流)。

[0508] 综述。如以上在“双层效应”之下(也参见图 26 和 28)本文所详细讨论的,混合装置 100 可以被构造为通过第一材料 110 和第二材料 120 与复杂的动态紊流的复杂且非线性流体动态相互作用产生输出材料 102,提供了进一步有利于电动作用的复杂混合。根据具体的方面,这些电动作用的结果可以在输出材料 102 内以电荷再分配和氧化还原反应而存在,包括以被稳定在输出材料内的溶解电子形式存在。

[0509] 除了在混合室中一般的表面相关的双层效应之外,申请人另外推断可借助在所述部件附近的部件诱导的微穴和流体加速及减速来赋予局部化电动效应。因此进行这个实施例的研究来进一步调查和证实所述额外的电动方面。

[0510] 材料:

[0511] 构建了类似于本文所述的本发明的混合装置的测试装置,其包括具有两个部件 18(以 180 度排列)的不锈钢转子 12 和具有单个部件 16 的定子 14,该定子 14 被旋转地与转子部件 18 和定子部件 16 相对安放。重要的是,该转子和定子部件在每种情况下对各自的转子和定子的主体是绝缘的(图 95)。将该装置制造成提供 0.020 英寸的一致的转子:定子间隙 20 以符合本文其他地方公开的装置。在转子轴(未示出)的末端有一个旋转接触器(未示出),该旋转接触器为转子表面和绝缘的转子部件提供电通路。同样,定子具有类似的绝缘部件 16(图 95),其中定子的内表面和绝缘的不锈钢部件被连接在定子外表上各自的接触器上。

[0512] 运算放大器(OpAmp)电路(M)22 被连接在接触器之间。构建运算放大器(OpAmp)电路(M)以提供通过利用此类放大器的高输入阻抗采集非常低的电压测量结果。OpAmp 的输出供给示波器(例如,具有 PicoScope 3000TM 的电池供电的便携式电脑运行示波器的应用)的输入。

[0513] 为了在该装置的测试过程中消除任何环境噪声的引入(例如,来自无线网络信号和来自 60Hz 电源线的 RF 辐射),构建一个细铜网的、RF 屏蔽的隔室(大约三乘四乘四英尺)来提供法拉第笼。当来自 60Hz AC 噪声(例如大约两伏特)和高频 RF 的干扰信号被完全降到感兴趣的信号之下时,这种构造在实验测试过程中提供优异的信噪比。使用具有 PicoScope 3000TM 的电池供电的便携式电脑运行示波器的应用使得由该测试装置的部件所产生的 30mV 信号的检测(如图 96 中)成为可能。此外,可变速率 DC 发动机被安放在法拉第笼的外侧并且通过一个非金属轴连接至该可旋转的测试装置以有效隔离发动机的噪声远离该测试装置。

[0514] 方法:

[0515] OpAmp 电路用来测量在使定子内表面 12 与绝缘定子部件 16 相连接的接触器之间的电压电位。对于具体的电路布置,只测量了一个电位。该装置的转速可在约 700rpm 到约 2800rpm 之间变化(其中图 96 的数据是用在约 1800rpm 运行的装置测量的)。

[0516] 为避免由于泵或蠕动泵产生任何外来电压,使用作用于与该装置相连接的槽中的流体的惰性的氮气或空气或氩气实现流体流过该装置。从流动机制中没有可感觉到的电压的贡献,并且通常空气被用作泵送力来提供流体流过该装置。

[0517] 通过该装置的流体流速是约 1L/min。

[0518] 通过引导流体流过该装置的室而没有旋转转子进行开始的一组非旋转实验,以便评定在定子主体 12 与分离的部件 16 之间任何电压的存在。对于两个流动方向进行分开的实验。

[0519] 然后以相同的流体流速进行另外一组旋转实验,并且其中该装置的转子以约 300rpm 到约 1800rpm 的不同速度旋转。对于任何给出的实验,流速和转速被保持恒定。

[0520] 结果:

[0521] 就非旋转实验而言,其中流体在任一方向流过装置而没有任何转子旋转,在定子的主体与绝缘的部件之间仅有几乎不能感觉到的电压(例如 1 到 2mV)。

[0522] 就旋转实验而言,并参考图 96,可以看到与相对的转子定子部件的旋转排列在时间上相关的电压脉冲(电位脉冲)(在该情况下为约 1800rpm)用该操作测试装置中的 OpAmp 可测量。此外,经从约 250rpm 或 300rpm 到约 1800 的范围可观察到与部件的排列相

关的此类周期性电压脉冲。另外，在有或没有流体流动的情况下，只要该装置的腔 / 流体室充满流体，就在旋转实验中观察到此类电压脉冲。根据具体的方面，并且不受机制束缚，在重复的旋转排列的部件附近的流体流动的快速、剧烈的挤压（例如气穴现象）、加速和减速产生了与旋转周期确切相关的对应的局部电压脉冲，至少部分地提供了根据本发明的电动产生的流体。其他的实验揭示电压脉冲的波幅（峰的形状和高度）随着转速的增加而增加，最初在这个具体的测试装置中可在约 250rpm 到 300rpm 观察到并且增加到至少约 2800rpm。在旋转排列的部件附近的流体流动的剧烈加速和减速等的幅度将预期一般随转速的增加而增加；至少达到最大值，反映由该装置的几何学、构造和 / 或流速强加的物理限值。根据其他方面，因为局部化的电压尖峰存在，在这些部件附近产生了局部化的电流流动（例如，电流脉冲），至少部分地提供了根据本发明的电动产生的流体（例如，不受机制限制，提供如本文其他地方所讨论的电化学反应）。

[0523] 根据其他方面，并且不受机制束缚，此类部件局部化效应（例如电压脉冲和电流和 / 或电流脉冲）有助于产生电动产生的流体组合更普遍的表面相关的双层和以上在“双层效应”之下本文其他地方所讨论的流动电流效应（也参见图 26 和 28）。

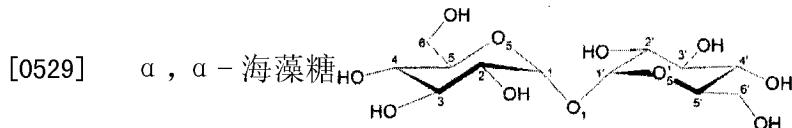
[0524] 实施例 14

[0525] （相对于非电动产生的对照流体，本发明的电动产生的流体示出在溶解的溶质 α , α -海藻糖的 ^{13}C NMR 分析中差别地影响线宽）

[0526] 综述。本文其他地方公开的申请人的数据支持效用和机制，其中本发明的电动产生的流体通过调节如下的至少一种来介导细胞内信号转导的调控或调节：细胞膜、膜电位 / 电导、膜蛋白（例如诸如 G 蛋白偶联受体的膜受体）、钙依赖性细胞信号传导系统和细胞间连接（例如紧密连接、间隙连接、黏着带和桥粒）。具体而言，使用各种领域认可的生物测试系统和测定法，申请人的数据示出与对照流体相比本发明的流体对例如以下的有差别的作用：调节性 T 细胞的增殖；细胞因子和蛋白质的水平（例如，IL-10、GITR、粒酶 A、XCL1、pStat5、以及 Foxp3、类胰蛋白酶（tryptase）、紧密连接相关蛋白、TSLP 受体、MMP9 等等）；缓激肽配体与缓激肽 B2 受体的结合；TSLP 受体的表达、全细胞电导；等等。此外，本文示出的白喉毒素（DT390）的作用表明 β 阻断（ β 2 肾上腺素能受体）和 / 或 GPCR 阻断和 / 或钙通道阻断影响电动产生的流体对例如 Trep 和 PBMC 功能的活性。

[0527] 综观来说，这些作用表明本发明的电动产生的流体不仅从根本上区别于现有技术的流体，而且它们提供了诸如本文目前公开和要求保护的新颖的组合物和实质效用。

[0528] 在这个实施例中。申请人已在这个实施例中进行核磁共振（NMR）研究以进一步表征本发明的电动产生的流体的基本性质。具体而言，申请人已分析相比于溶解在非电动产生的流体中，溶解在电动产生的流体中的 α , α -海藻糖的 ^{13}C NMR 谱。海藻糖（以下示出碳编号作参考）是一种 cosmotropic 溶质并且已知例如保护免于蛋白质变性、膜干燥、冷冻时器官的生存力等等。给出以上概述的数据的申请人推断 α , α -海藻糖可能提供一种有效工具来进一步探索本发明的电动产生的流体的特性 / 结构。申请人推断 NMR 相关的‘化学位移’和对‘线宽’的作用可用来评定本发明的流体的特性。对于这些研究，采用一种非超级充氧的本发明的电动产生的流体（本文称作“Solas”）来使顺磁性杂质例如溶解氧可能起作用对抗或以其他方式掩蔽被分析的作用的可能性降到最小。



[0530] 材料和方法：

[0531] 溶液的制备。磷酸盐（钠盐）和 D-(+)-海藻糖二水合物 (T9531-10G, 降低的金属含量) 和包含 1% DSS 的 99.9% D2O 购自 Sigma。“生理盐水”是来自 Hospira 的 pH 5.6(4.5–7.0) 的 0.9% 的氯化钠。通过将 0.949g 海藻糖溶解在 965 μL 生理盐水和 35mL 磷酸盐缓冲盐水（以如下方式制备的 0.9% NaCl 中的 100mM 磷酸盐缓冲液：使得当 35 μL 的这种缓冲液被加入到 1.0mL 海藻糖溶液中时 pH 变为 6.93）制备 0.25M 的 α, α -海藻糖溶液。

[0532] 核磁共振谱的采集。谱是在华盛顿大学 NMR 设备室使用装有 BrukerBBO :X{1H} 探针和运行的 XWINNMR 3.5 的 500MHz 或 300MHz BrukerAvance 系列仪器采集的。使用 14000Hz 或 7900Hz 的扫探宽度在 125.7MHz 或 75.46MHz 采集 ^{13}C NMR 谱，使用 64K 或 128K 的数据点和 128 或 256 扫描。得到的 FID 用零填充两次并且用 1.0Hz 的线扩张因子 (linebroadening factor) 进行处理。使用 Bruker Biospin Variable Temperature 元件控制温度。通过将 99.9% D2O+1% DSS+痕量丙酮放在购自 Wilmad 的共轴的 NMR 插入管中，采用外部氘锁定。使用来自 Mestrelab Research 的 iNMR 软件 v. 2.6.4 处理 NMR 数据。

[0533] 结果：

[0534] 样品的谱。图 97A-C 示出在彼此顶部重叠的六个 ^{13}C -NMR 谱的扩展，以致 DSS 信号在 -2.04ppm 列为一排。DSS 信号显示在图的最右侧，而丙酮的甲基信号显示在 30.9ppm 附近。剩余的信号对应于在以上 α, α -海藻糖的结构中示出的海藻糖的 6 个碳。如可以看到的那样，Solas 溶液中的碳信号示出与对照溶液相比的小化学位移（一般高磁场）。

[0535] 线宽的测量。以下表 1 示出对于 Solas 盐水（本发明的电动产生的流体）在 3 个不同温度海藻糖的六个碳和丙酮的甲基碳的测量的 ^{13}C NMR 线宽。对应的生理盐水样品代表在每个温度的非电动的对照溶液。在 Solas 溶液中，线宽显著不同于每个碳原子在对照溶液中的线宽。与对照溶液相比，在较低温度下 Solas 溶液中的较小线宽可能产生于海藻糖分子整体上（包括任何溶剂化水分子）较快的翻转率。

[0536] 表 1. 在 Solas& 生理盐水^{a, b} 中 α, α -海藻糖的 ^{13}C NMR 线宽

[0537]

测试流体(温度.度 K)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	丙酮
Solas (277)	8.4	8.22	8.3	8.15	8.3	11.1	5.1
生理盐水(269.9)	15.4	16.1	15.8	14.9	15.4	21.7	5.1
Solas (293)	9.52	8.7	9.28	9	8.9	11.25	5.63
生理盐水(292.9)	10.33	10.23	10.23	9.93	10.23	13.13	5.63
Solas (310)	2.28	2.03	2.18	2.19	2	2.55	0.67
生理盐水(309.9)	1.17	0.99	1.1	1.02	0.97	1.42	0.67

[0538] ^a 由于在处理过程中使用的 1.0Hz 线展宽，从所有线宽值中减去 1.0Hz。此外，相对于在外部参考管中的丙酮信号将线宽值标准化以补偿磁场的不均一性。这通过从生理盐

水的线宽中减去丙酮峰在对应的 Solas 盐水谱中被加宽的量而完成。

[0539] ^b 线宽测量中的误差估计将在 +/-0.30Hz 之内

[0540] 在图 97A 中以图的方式示出在每种情况下相对于丙酮线进行标准化的 Solas 和生理盐水中的 α , α -海藻糖的 ^{13}C NMR 线宽。总之, Solas 和生理盐水中的 α , α -海藻糖的 ^{13}C NMR 线宽的 NMR 数据表明存在改变溶质翻转的本发明的溶液的特性。

[0541] 综观以上和本文其他地方概述的生物活性, 这些 ^{13}C NMR 线宽作用表明本发明的电动产生的流体不仅在溶质相互作用方面从根本上区别于现有技术的流体, 而且它们提供了如本文目前公开并要求保护的新颖组合物和实质效用。

[0542] 实施例 15

[0543] (相对于非电动产生的对照流体, 本发明的电动产生的流体产生了有差别的方波伏安概况并且展示出在溶出极谱之下独特的电化学特性)

[0544] 综述。本文其他地方公开的申请人的数据支持效用和机制, 其中本发明的电动产生的流体通过调节如下的至少一种来介导细胞内信号转导的调控或调节: 细胞膜、膜电位 / 电导、膜蛋白 (例如诸如 G 蛋白偶联受体的膜受体)、钙依赖性细胞信号传导系统和细胞间连接 (例如紧密连接、缝隙连接、间隙连接、黏着带和桥粒)。具体而言, 使用各种本领域认可的生物测试系统和测定法。申请人的数据示出与对照流体相比本发明的流体对例如以下的有差别的作用: 调节性 T 细胞的增殖; 细胞因子和蛋白质的水平 (例如, IL-10、GITR、粒酶 A、XCL1、pStat5、以及 Foxp3、类胰蛋白酶 (tyrptase)、紧密连接相关蛋白、TSLP 受体、MMP9 等等); 缓激肽配体与缓激肽 B2 受体的结合; TSLP 受体的表达、全细胞电导; 等等。此外, 本文示出的白喉毒素 (DT390) 的作用表明 β 阻断 (β 2 肾上腺素能受体) 和 / 或 GPCR 阻断和 / 或钙通道阻断影响电动产生的流体对例如 Trep 和 PBMC 功能的活性。

[0545] 综观来说, 这些作用表明本发明的电动产生的流体不仅从根本上区别于现有技术的流体, 而且它们提供了诸如本文目前公开和要求保护的新颖的组合物和实质效用。

[0546] 在这个实施例中。申请人已在这个实施例中进行伏安研究以进一步表征本发明的电动产生的流体的基本性质。伏安法频繁用于确定氧化还原电位或测量流体的动态速率和常数。所有伏安方法的普遍特征是它们涉及将电位施加于电极并且通过电化学电池监测生成的电流。施加的电位通过以电化学方式还原或氧化有电活性的类别而产生电极表面处有电活性的类别的浓度改变。

[0547] 具体而言, 申请人已利用伏安方法 (即方波伏安法和溶出极谱) 来进一步表征在对照盐水流体与本发明的电动产生的测试流体 (例如 Solas 和 Revera) 之间的根本区别。给出以上概述的生物和膜效应数据的申请人推断方波伏安法和溶出极谱法将提供有效工具来进一步表征本发明的电动产生的流体的独特的特性。

[0548] 申请人还推断在特定电压下的电流的不同、不同浓度的有电活性的氧化还原化合物的产生、新氧化还原化合物的产生和独特的电化学特性的拥有可被用来评定和表征本发明的流体的特性。对于这些研究, 使用了超级充氧的电动产生的流体 (Revera) 和非超级充氧的本发明的电动产生的流体 (Solas) 二者。

[0549] 材料和方法:

[0550] 材料和溶液的制备。所述实验是在 EG & G SMDE 303A 极谱仪 (Princeton Applied Research) 上进行。在方波伏安法实验中使用的电解质 NaOH 购自 Sigma。通过添加 100 μL

的 NaOH 到 9.9mL 的 Revera 盐水中制成 0.18 摩尔溶液来制备本发明的流体溶液的 10mL 样品。关于溶出极谱法实验,没有利用额外的电解质。

[0551] 方波伏安法。如以上所述,伏安法用来确定氧化还原电位或测量流体中的动态速率和常数。在方波伏安法实验中,将 0.0 到大约 -1.75V 的电位施加于电极并且监测流过该电化学电池的生成的电流。

[0552] 溶出极谱。溶出极谱方法与方波伏安方法类似。然而,如以上所述没有利用电解质并且还涉及预步骤。在该预步骤中,将静态滴汞电极在 -1.1V 保持 30 秒以使还原形式在汞中可溶的任何化合物汞齐化。然后,扫描在 -1.1V 与 0.0V 之间的电位并且监测流过该电化学电池的生成的电流。到这种汞齐上的负电位中的线性扫描提供了对这些化合物的敏感测量。

[0553] 结果:

[0554] 方波伏安法。如从图 98 中所明显的,在 -0.14V、-0.47V、-1.02V 和 -1.36V 的电流概况在各种测试的试剂之间有差别。根据具体的方面,在各种特定电压下产生的电流的不同指示至少一种不同浓度的有电活性的氧化还原化合物和 / 或新的或独特的有电活性的氧化还原化合物和 / 或在包围该汞滴的扩散限制电双层上的改变。

[0555] 溶出极谱。图 99 示出本发明的电动产生的流体 Revera 和 Solas 显示出在 -0.9 伏特具有显著的峰的独特谱,所述显著的峰在非电动产生的空白和盐水对照流体中不存在。另外,非电动产生的空白和盐水对照流体在 -0.19 和 -0.3 伏特显示出在电动产生的 Solas 和 Revera 流体的谱中不存在的特征峰。

[0556] 因此根据具体的方面,这些结果示出本发明的电动产生的 Solas 和 Revera 流体与非电动产生的盐水对照流体相比的独特的电化学特性。根据其他方面,所述结果表明相对于非电动产生的流体在电动产生的流体中存在或产生不同浓度的有电活性的氧化还原化合物和新的和 / 或独特的有电活性的氧化还原化合物中的至少一种。

[0557] 除了在本文其他地方呈现的各种生物数据外,这种有差别的伏安数据尤其在连同对全细胞电导的差别效应、¹³C NMR 线宽分析和混合装置的部件局部化效应(例如电压脉冲和电流和 / 或电流脉冲)一起考虑时表明本发明的电动产生的流体不仅从根本上区别于现有技术的流体,而且提供了如本文目前所公开并要求保护的新颖的组合物和实质效用。

[0558] 实施例 16

[0559] (在充满了本发明的电动产生的流体 (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,并且用急剧提高全细胞电导的 cAMP 刺激的“混合物”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)

[0560] 在这个实施例中,进行膜片钳研究以进一步证实本发明的电动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通信系统。

[0561] 综述。如以上实施例 7 中所示(例如图 75,使用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器、Octet Rapid Extended Detection (RED) (forteBio™) 示出缓激肽与 B2 受体结合的稳定),与 B2 受体结合的缓激肽是浓度依赖性的,并且与生理盐水相比在本公开的电动产生的流体(例如 Rev;富含气体的电动产生的流体)中增加了结合亲和力。另外,如在

用微粒物 (PM) 刺激的 T 调节性细胞的背景下的实施例 8 中所示, 数据示出存在 PM 和 Rev 与在对照流体中存在 PM(无 Rev, 无 Solis) 相比减少了 T 调节性细胞的增殖 (图 76), 表明本发明的电动产生的流体 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, 在用微粒物 (PM) 刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 的过敏性哮喘 (AA) 的概况的背景下, 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, 在实施例 8 和图 76-83 中示出的白喉毒素 (DT390) 的作用表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙通道阻断影响电动产生的流体对 Treg 和 PBMC 功能的活性。此外, 实施例 11 中的数据示出根据其他方面, 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。图 85-89 分别示出连接黏着分子 JAM 2 和 JAM 3、GJA1、GJA3、GJA4 和 GJA5 (连接黏附素)、OCLN (闭合蛋白)、密蛋白 (例如 CLDN 3、5、7、8、9、10)、TJP1 (紧密连接蛋白 1) 的上调。

[0562] 进行膜片钳研究来进一步调查和证实所述效用。

[0563] 材料和方法:

[0564] 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电动产生的流体 (例如 RNS-60; 包含 60ppm 的溶解氧的电动处理的生理盐水; 有时在这个实施例中被称作“药物”) 的 Calu-3 细胞的作用。

[0565] 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 KC1、1.2mM CaCl2、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 充满到细胞上。

[0566] 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。

[0567] 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。

[0568] 使用 Olympus IX71 显微镜 (Olympus Inc., Tokyo, Japan) 的 40X DIC 物镜观察细胞。在建立细胞黏着的千兆欧封口 (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 $\pm 100\text{mV}$ 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, 使相同的细胞通过浴槽而充满测试流体, 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在不同的保持电位的全细胞电流。

[0569] 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。

[0570] 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 刺激性混合物刺激细胞。从水溶液中的 25mM 原液中使用 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)。

[0571] 膜片钳的结果:

[0572] 图 100 示出在基础 (无 cAMP) 条件下的全细胞电流, 具有从零 mV 保持电位步进到 +/-100mV 的方案。代表的描记是 n = 12 个细胞的平均。左侧的描记是对照, 紧接着在充满测试溶液时的全细胞描记 (中间)。右侧的描记是通过从对照条件下减去测试的平均值而获得的复合物 δ 。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电导的适中但显著的改变 (由于测试条件)。对全细胞电导的贡献即由药物 (本发明的电动产生的流体) 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。

[0573] 图 101 示出在基础条件下的全细胞电流, 具有从 -40mV 保持电位步进到 ±100mV 的方案。代表的描记是 n = 12 个细胞的平均。左侧的描记是对照, 紧接着在充满测试溶液时的全细胞描记 (中间)。右侧的描记是通过从对照条件下减去测试的平均值而获得的复合物 δ 。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电导的适中但显著的改变 (由于测试条件)。对全细胞电导的贡献即由药物 (本发明的电动产生的流体) 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。

[0574] 图 102 示出在基础条件下的全细胞电流, 具有从 -60mV 保持电位步进到 ±100mV 的方案。代表的描记是 n = 12 个细胞的平均。左侧的描记是对照, 紧接着在充满测试溶液时的全细胞描记 (中间)。右侧的描记是通过从对照条件下减去测试的平均值而获得的复合物 δ 。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电导的较小但显著的改变 (由于测试条件)。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。

[0575] 图 103 示出在基础条件下的全细胞电流, 具有从 -120mV 保持电位步进到 ±100mV 的方案。代表的描记是 n = 12 个细胞的平均。左侧的描记是对照, 紧接着在充满测试溶液时的全细胞描记 (中间)。右侧的描记是通过从对照条件下减去测试的平均值而获得的复合物 δ 。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电导的较小但显著的改变 (由于测试条件)。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。

[0576] 图 104 示出在 cAMP 刺激条件下的全细胞电流, 用从各个保持电位步进到 ±100mV 的方案获得。代表的描记是 n = 5 个细胞的平均。左侧的描记是对照, 接着是 cAMP 刺激之后的全细胞描记, 接着是用包含药物的溶液充满。右侧的描记是通过从对照条件下 (单独的 cAMP) 减去药物 +cAMP 的测试平均值而获得的复合物 δ 。在顶部的描记是从 0mV 电压方案获得的描记且下面的那些是在 -40mV 的描记。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电导的改变 (由于测试条件)。

[0577] 图 105 示出在 cAMP 刺激条件下的全细胞电流,用从各个保持电位步进到 $\pm 100\text{mV}$ 的方案获得。代表的描记是 $n = 5$ 个细胞的平均。左侧的描记是对照,接着是 cAMP 刺激之后的全细胞描记,接着是用包含药物的溶液充满。右侧的描记是通过从对照条件下(单独的 cAMP)减去药物+cAMP 的测试平均值而获得的复合物 δ 。在顶部的描记是从 -60mV 电压方案获得的描记且下面的那些是在 -120mV 的描记。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电导的改变(由于测试条件)。

[0578] 图 106 示出保持电位对 cAMP 激活的电流的作用。在不同电压方案($0\text{、}-40\text{、}-60\text{、}-120\text{mV}$ 保持电位)下观察到药物(本发明的电动产生的流体;RNS-60;包含 60ppm 溶解氧的电动处理的生理盐水)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,左上方的面板)。然而在 cAMP 激活的情况下,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(底部面板)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。

[0579] 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(本发明的电动产生的流体;RNS-60;包含 60ppm 溶解氧的电动处理的生理盐水)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充满 cAMP 刺激的“混合物”(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,表明所述电动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)。

[0580] 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电动产生的流体(例如 RNS-60;包含 60ppm 溶解氧的电动处理的生理盐水)是一致的,所述电动产生流体在被封闭或从质膜收回的一个或多个通道上产生改变。

[0581] 综观申请人的其他数据(例如工作实施例的数据),本发明的具体方面提供了用于调节细胞内信号转导的组合物和方法,包括膜结构、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通信系统中的至少一种的调节,包括使用本发明的电动产生的溶液来赋予膜结构(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。根据另外的方面,这些效应调节基因表达,并且可持久依赖于例如个体通信成分的半寿期等。

[0582] 通过引用并入

[0583] 在本说明书中提到和/或在本申请的数据单中列出的以上所有的美国专利、美国专利申请公布文本、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0584] 应该理解本文的附图和详细描述被认为是以说明而非限制的方式,并且并非旨在将本发明限制为所公开的具体的形式和实例。相反,本发明包括对于本领域的普通技术人员明显的任何其他的修改、改变、重排、更换、替代、设计的选择和实施方式,而不背离本发明的精神和范围,如由下列权利要求书所定义的那样。因此,意图在于下列权利要求书被解释为包括所有这些其他的修改、改变、重排、更换、替代、设计的选择和实施方式。

[0585] 上述实施方式描绘了包含在不同的其他组成部分之内或与其相联系的不同组成部分。应该理解这些描绘的结构仅是示例性的，并且事实上实现相同功能的许多其他结构可以被实施。在概念的意义上，实现相同功能的任何组成部分的安排被有效地“关联”以使得期望的功能得以实现。所以，若不考虑构造或中间组成部分，联合实现具体功能的本文的任何两个组成部分可被看做彼此“相关联”以使得期望的功能得以实现。同样，这样关联的任何两个组成部分也可视作对彼此“可操作地相连”或“可操作地连接”来实现期望的功能。

[0586] 尽管已经对本发明的具体实施方式进行了显示和描述，对本领域的熟练技术人员将明显的是，基于本文的教导，可以进行改变和修改而不背离本发明及其较广阔方面，因此，所附的权利要求书在其范围之内涵盖如本发明的真正精神和范围之内的所有这些改变和修改。此外，必须理解本发明只由所附的权利要求书限定。本领域内技术人员将理解，一般而言，本文且尤其在所附权利要求书（例如所附权利要求书的主体）中所使用的术语一般旨在作为“开放式”术语（例如，术语“包括”应该被解释为“包括但不限于”，术语“具有”应该被解释为“至少具有”，术语“包含”应该被解释为“包含但不限于”，等等）。本领域内的技术人员还将理解如果介绍的权利要求的陈述内容的具体数目是预期的，这种预期将被明确地在该权利要求中陈述，并且在不存在这种陈述时就不存在这种预期。例如，作为对理解的辅助，下列所附权利要求书可包含介绍性短语“至少一种”和“一种或多种”的使用以介绍权利要求的陈述内容。然而，这类短语的使用不应该被解释为暗示通过不定冠词“一(a)”或“一(an)”介绍一项权利要求陈述内容将包含这种介绍的权利要求陈述内容的任何具体的权利要求限制成仅包含一项这种陈述内容的发明，即使当相同的权利要求包括介绍性短语“一种或多种”或“至少一种”和不定冠词例如“一(a)”或“一(an)”时（例如，“一(a)”和 / 或“一(an)”通常应该被解释为表示“至少一种”或“一种或多种”）；对于用来介绍权利要求陈述内容的定冠词的使用同样也是如此。此外，即使明确地陈述介绍的权利要求陈述内容的具体数目，本领域的熟练技术人员也会认识到这种陈述应通常被解释为表示至少所陈述的数目（例如，没有其他修饰语的“两个陈述内容”的单纯陈述通常表示至少两个陈述内容或两个或多个陈述内容）。

[0587] 据此，除了通过所附的权利要求书之外，本发明不被限制。

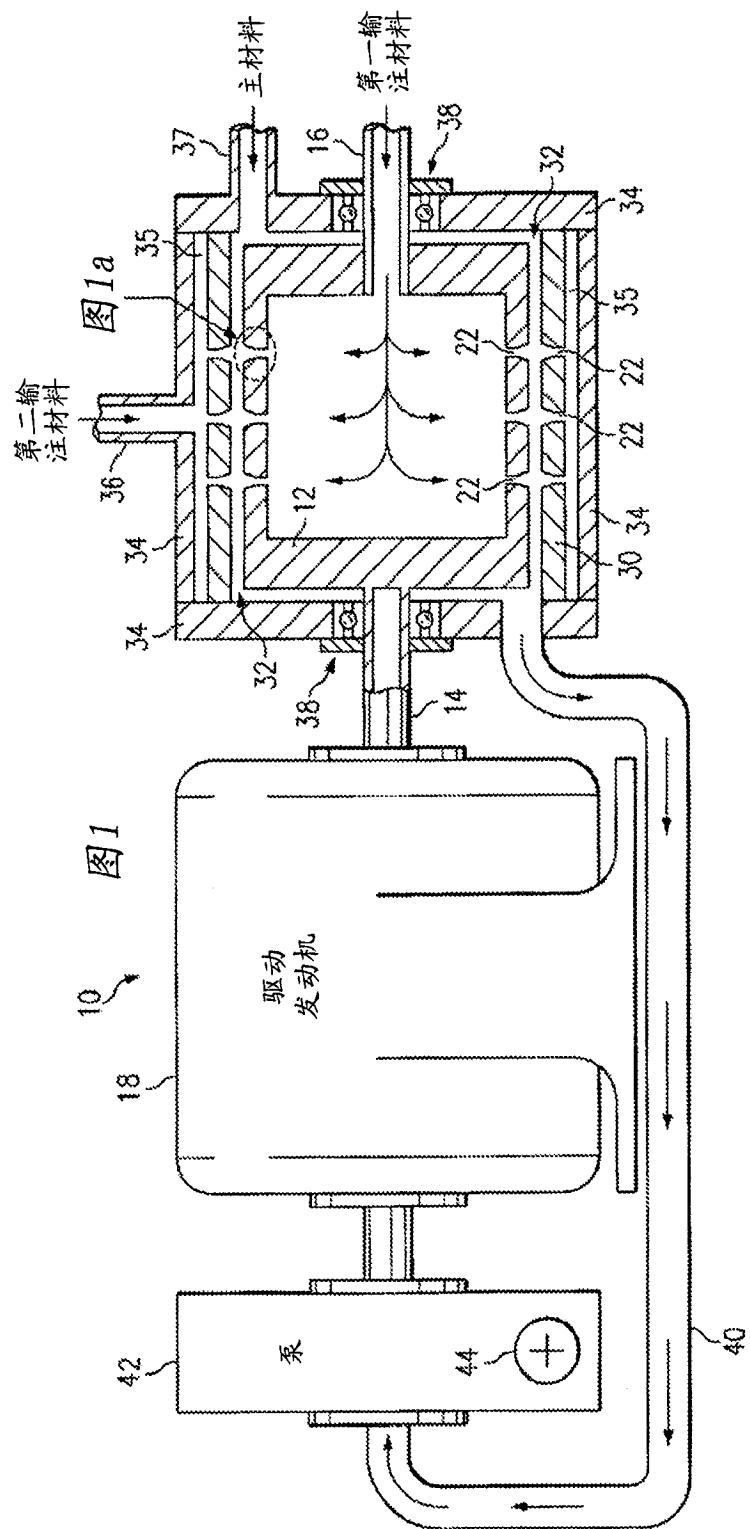


图 1(现有技术)

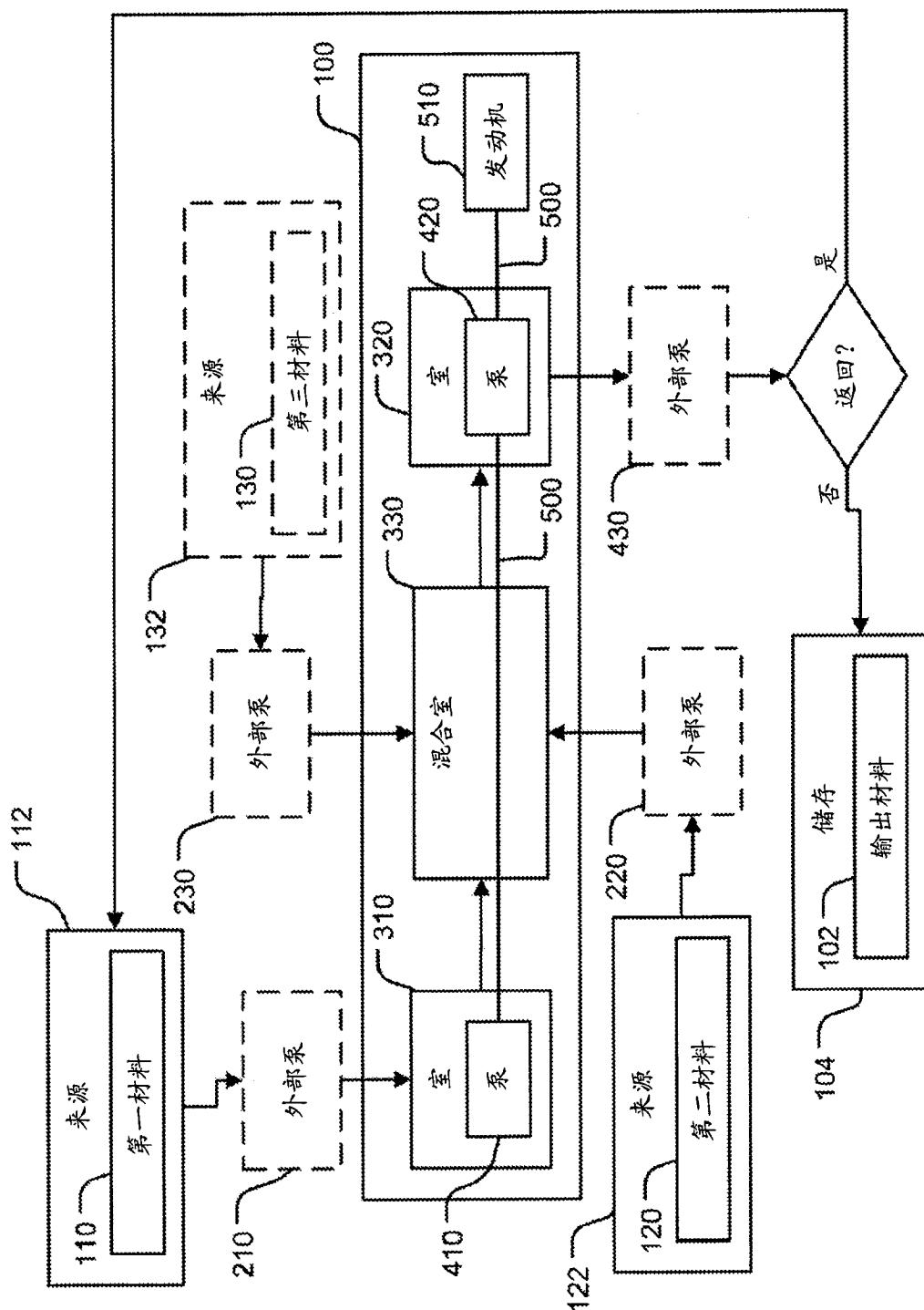


图 2

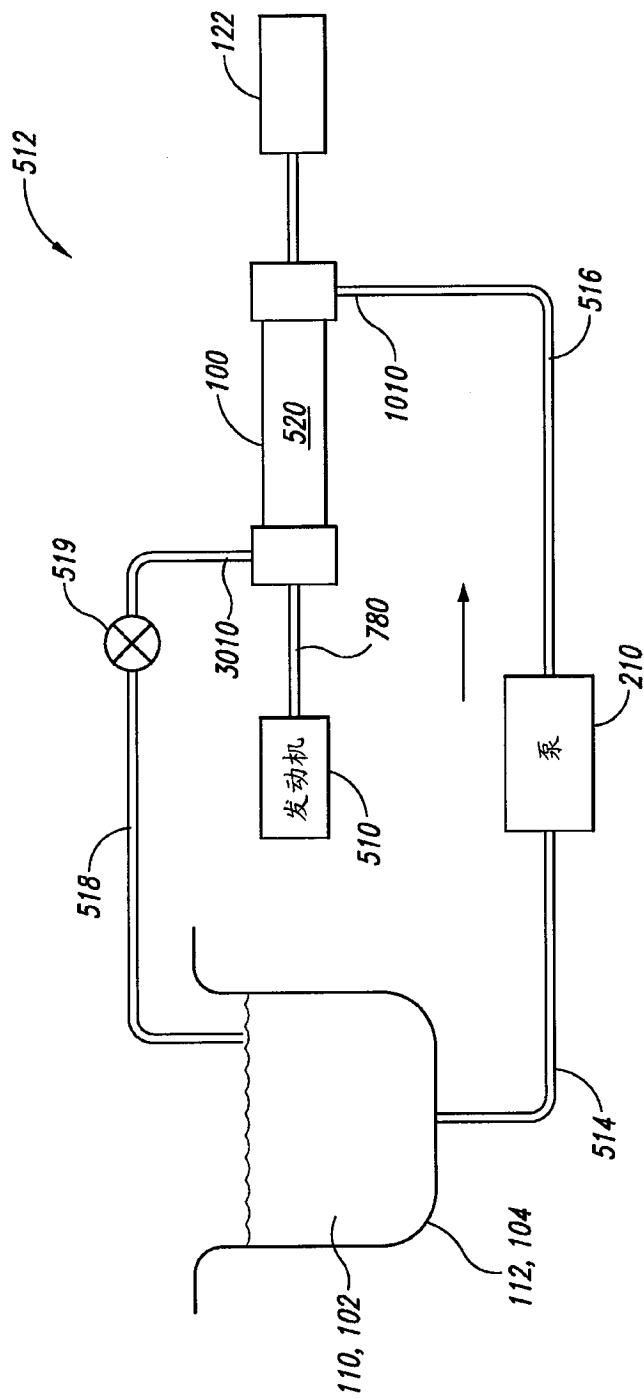


图 3

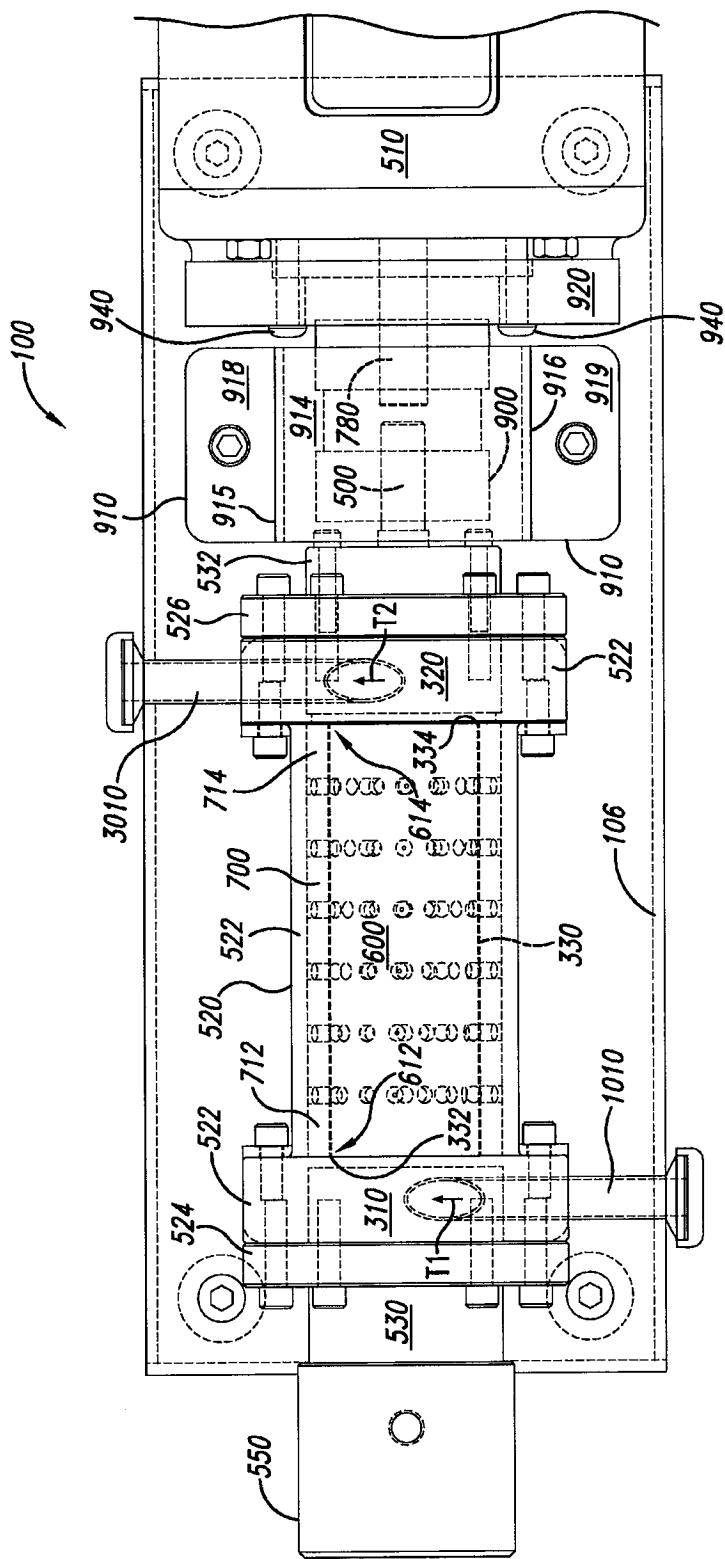


图 4

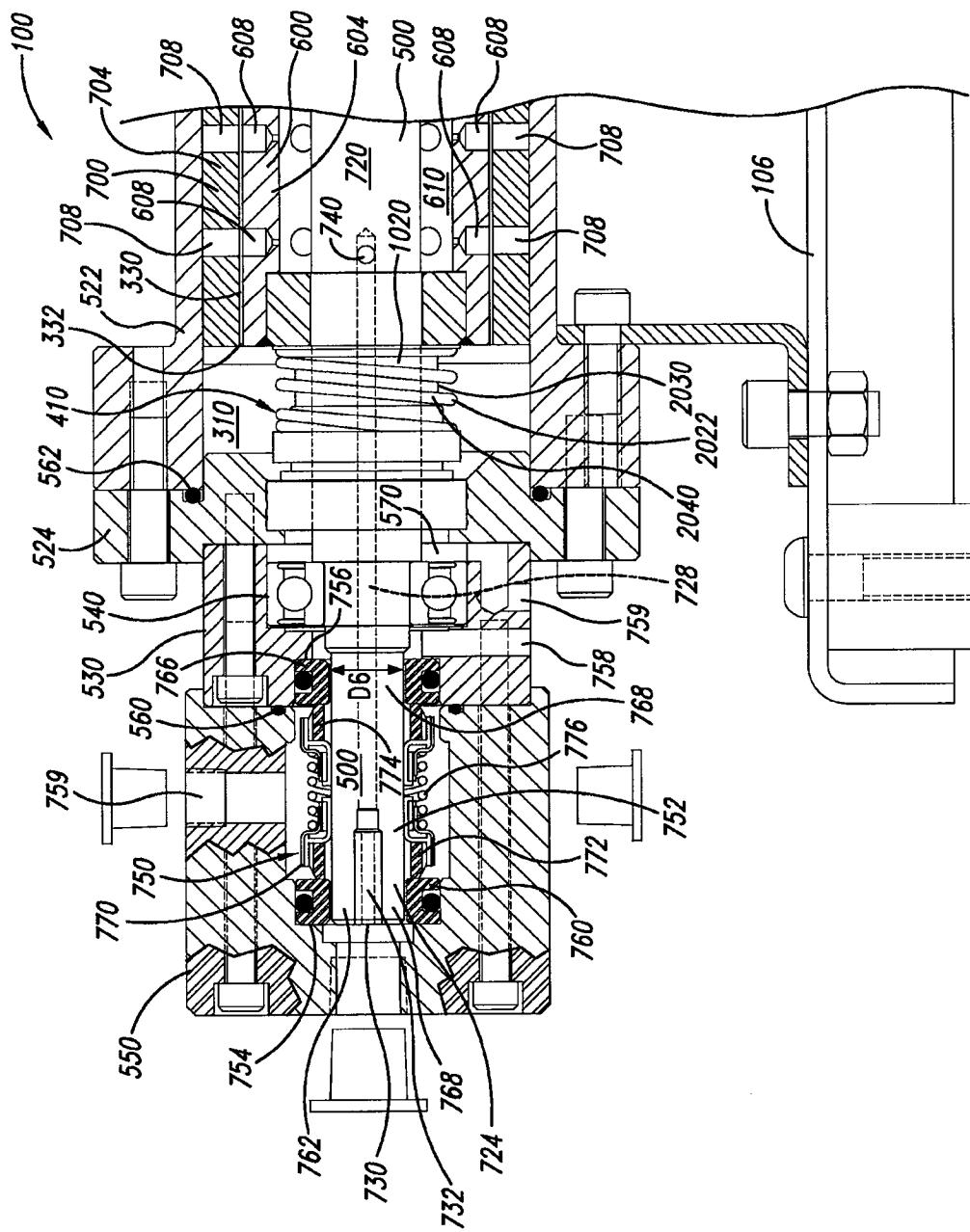


图 5

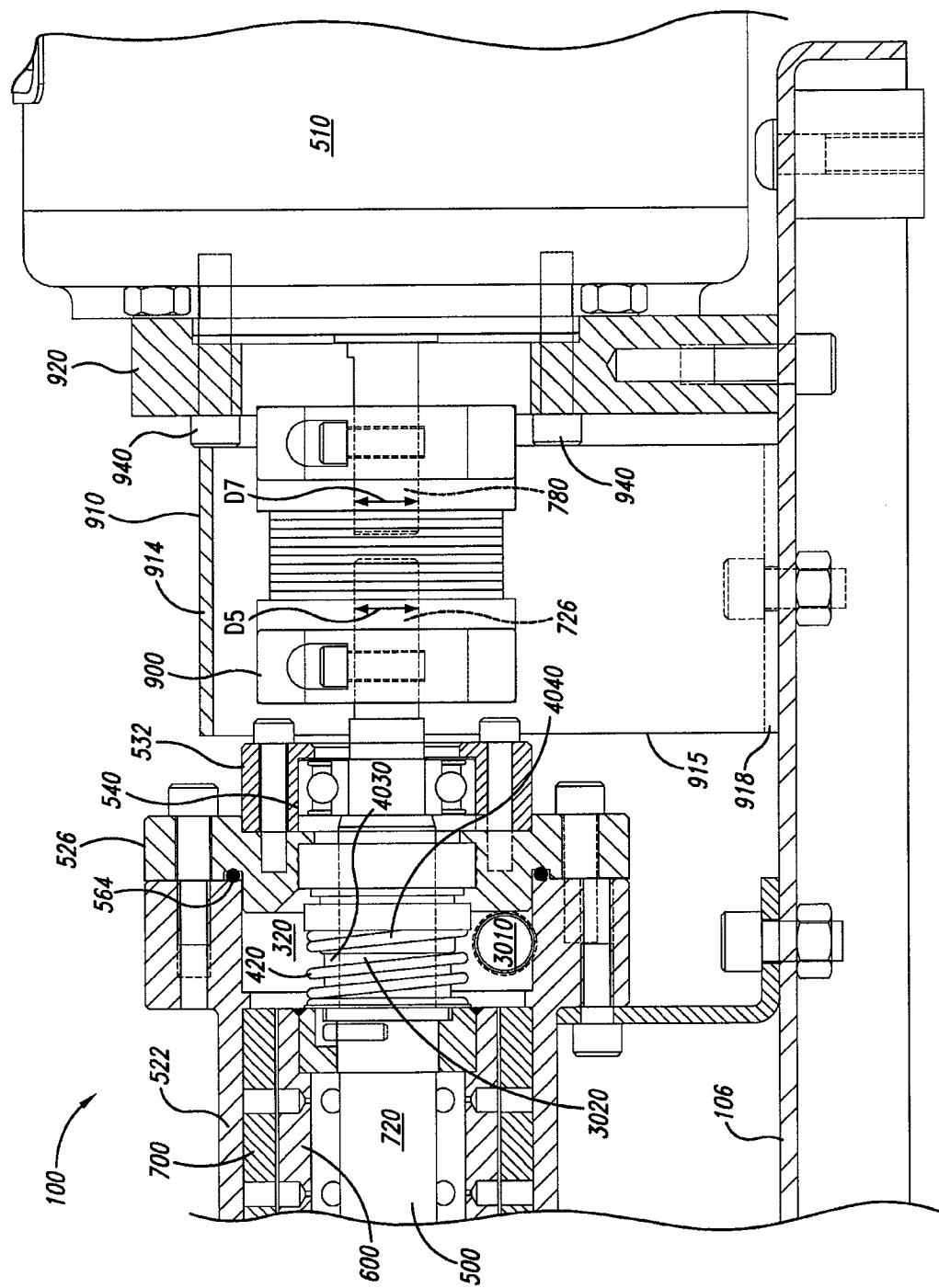


图 6

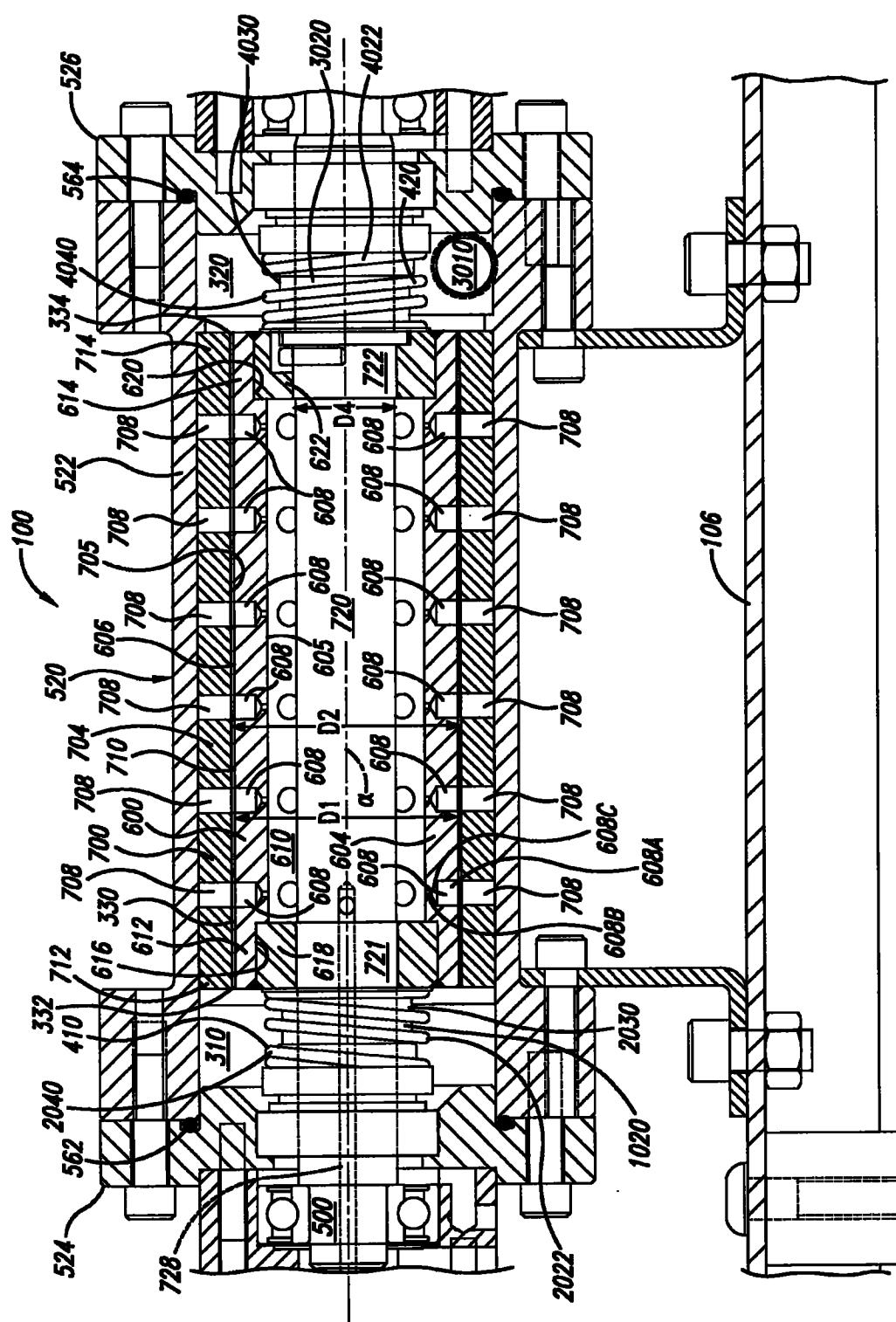


图 7

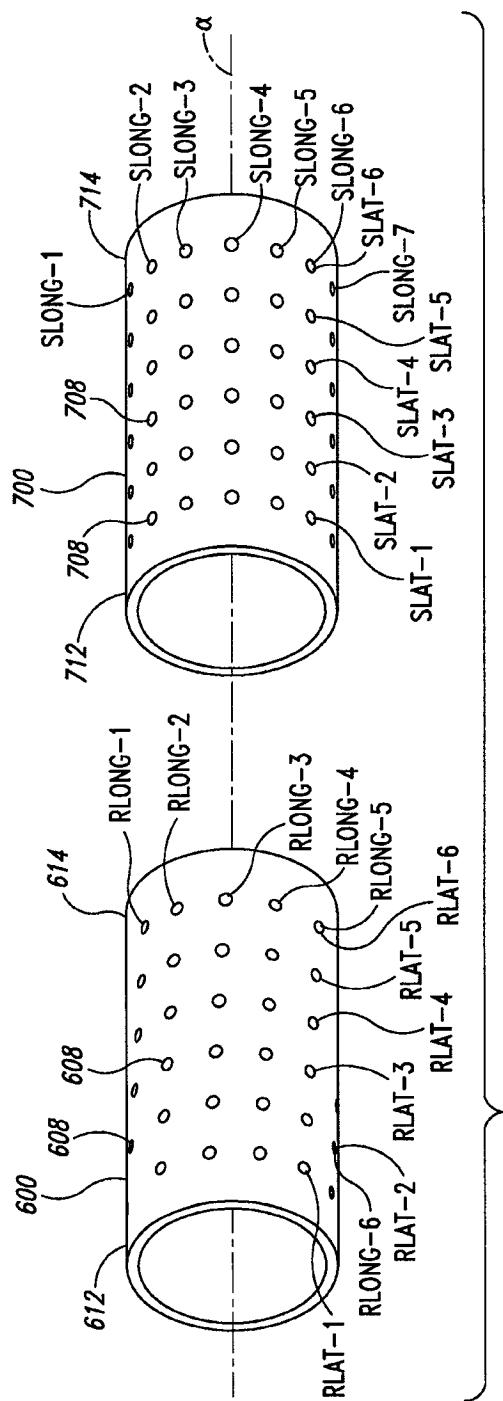


图 8

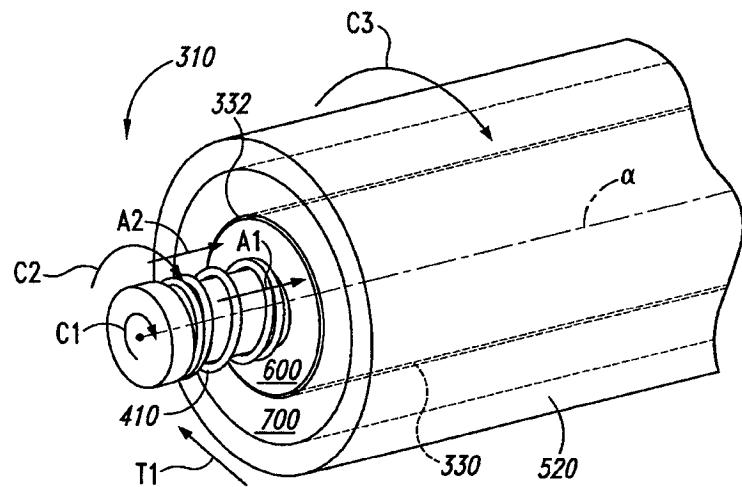


图 9

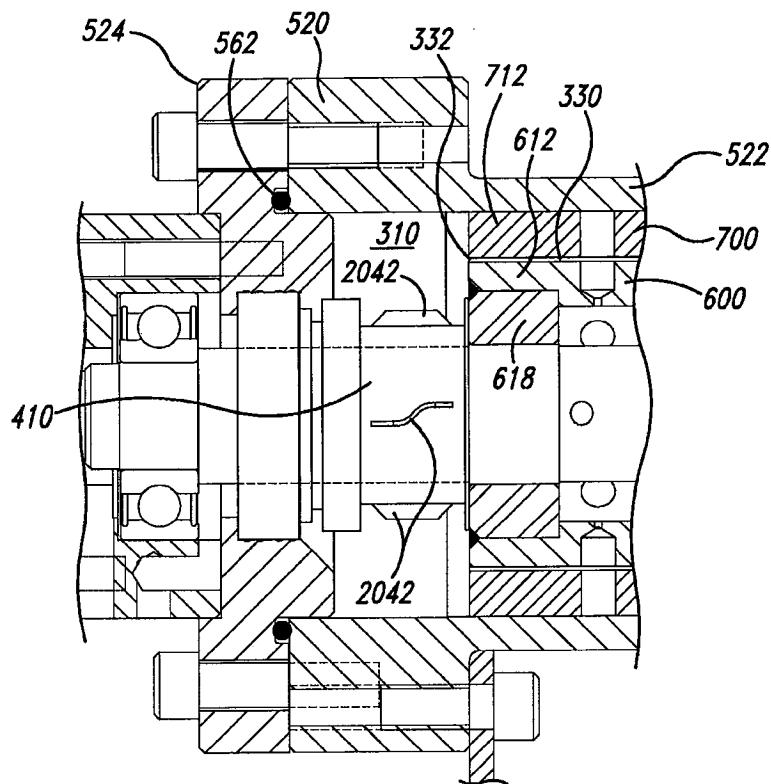


图 10

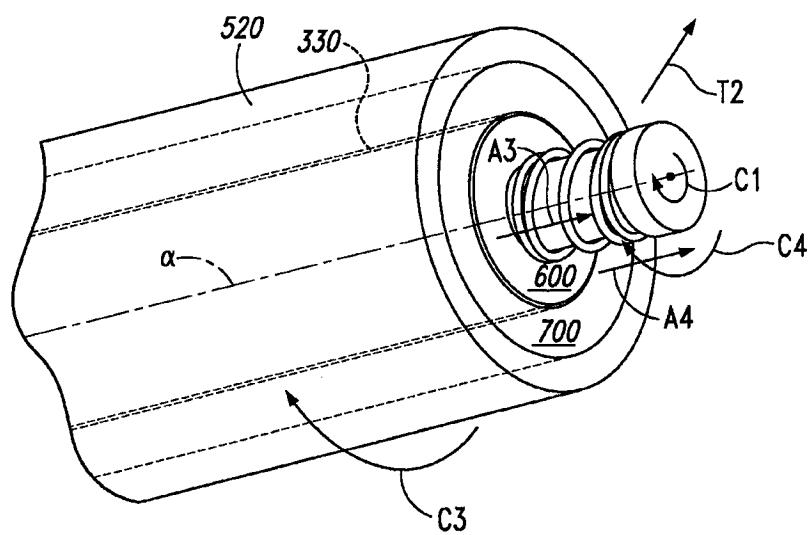


图 11

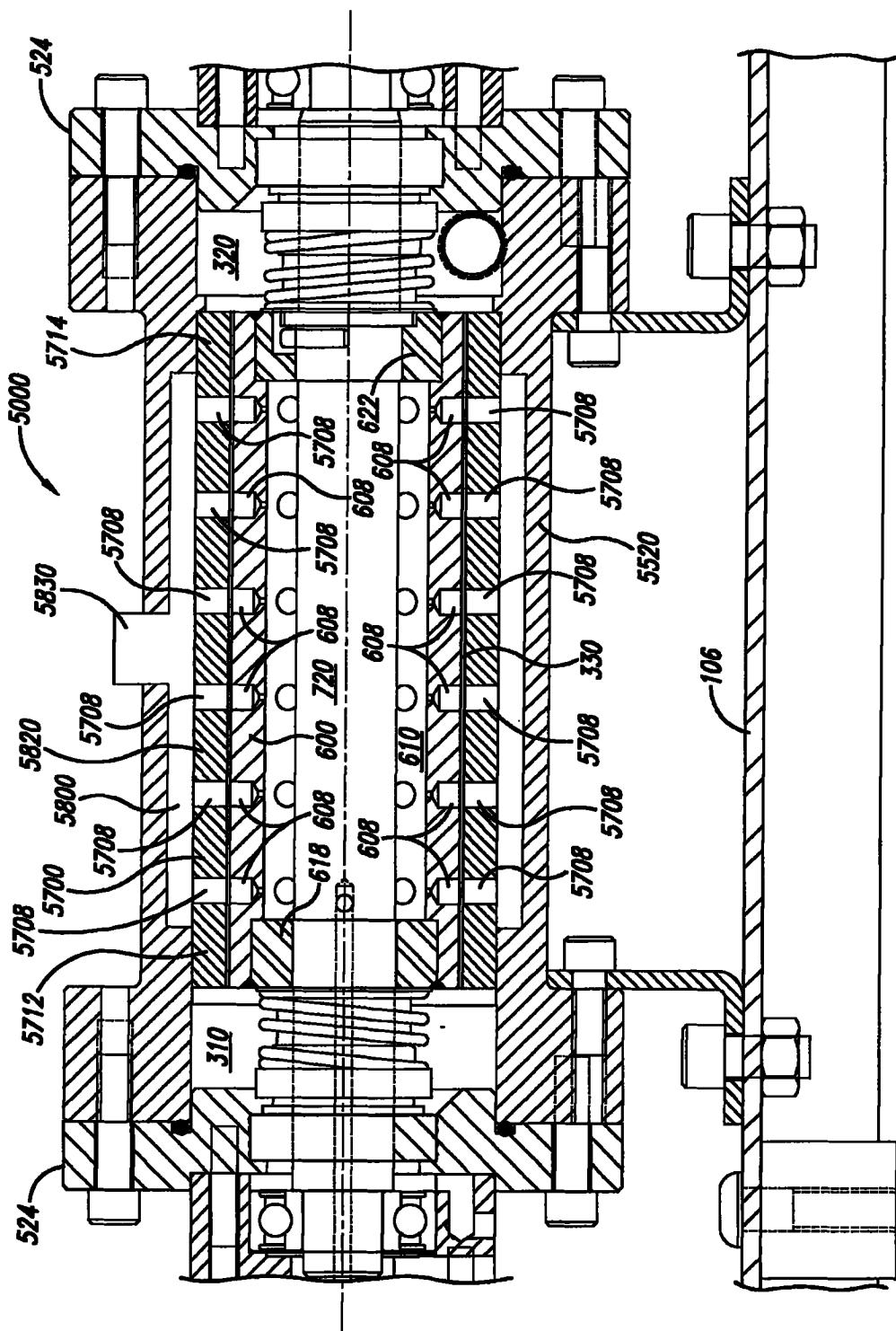


图 12

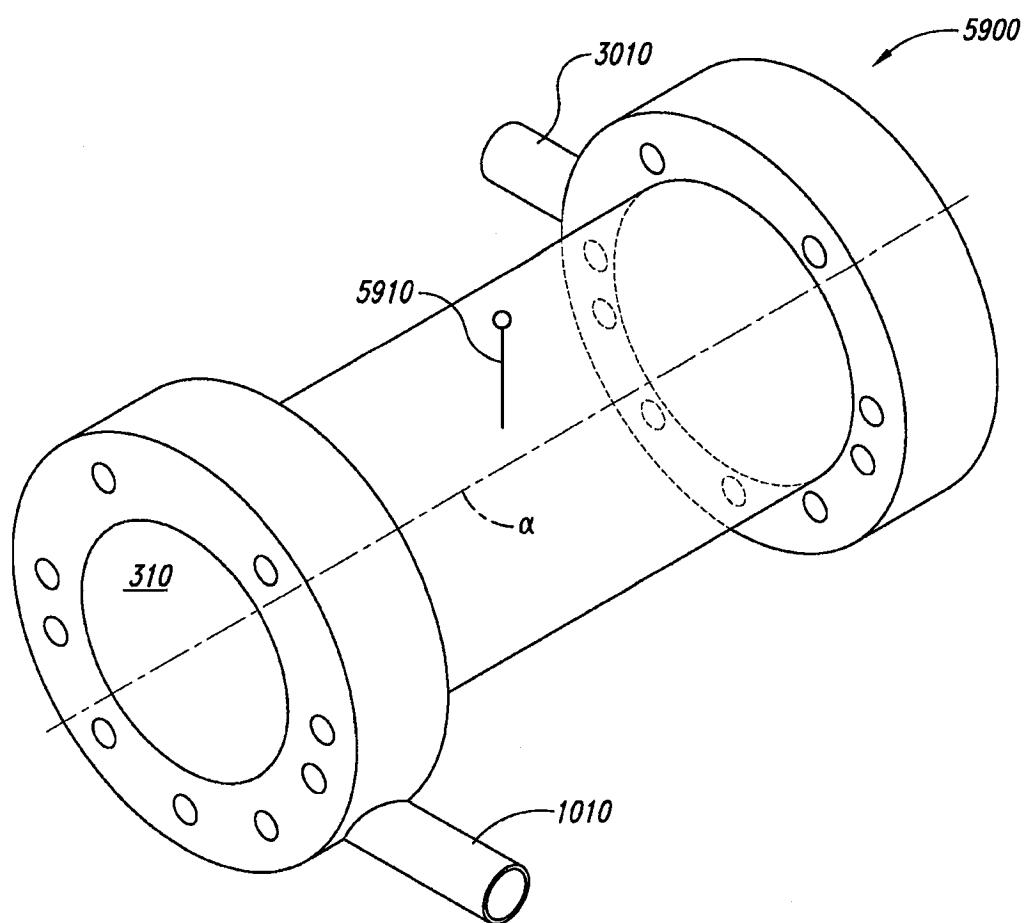


图 13

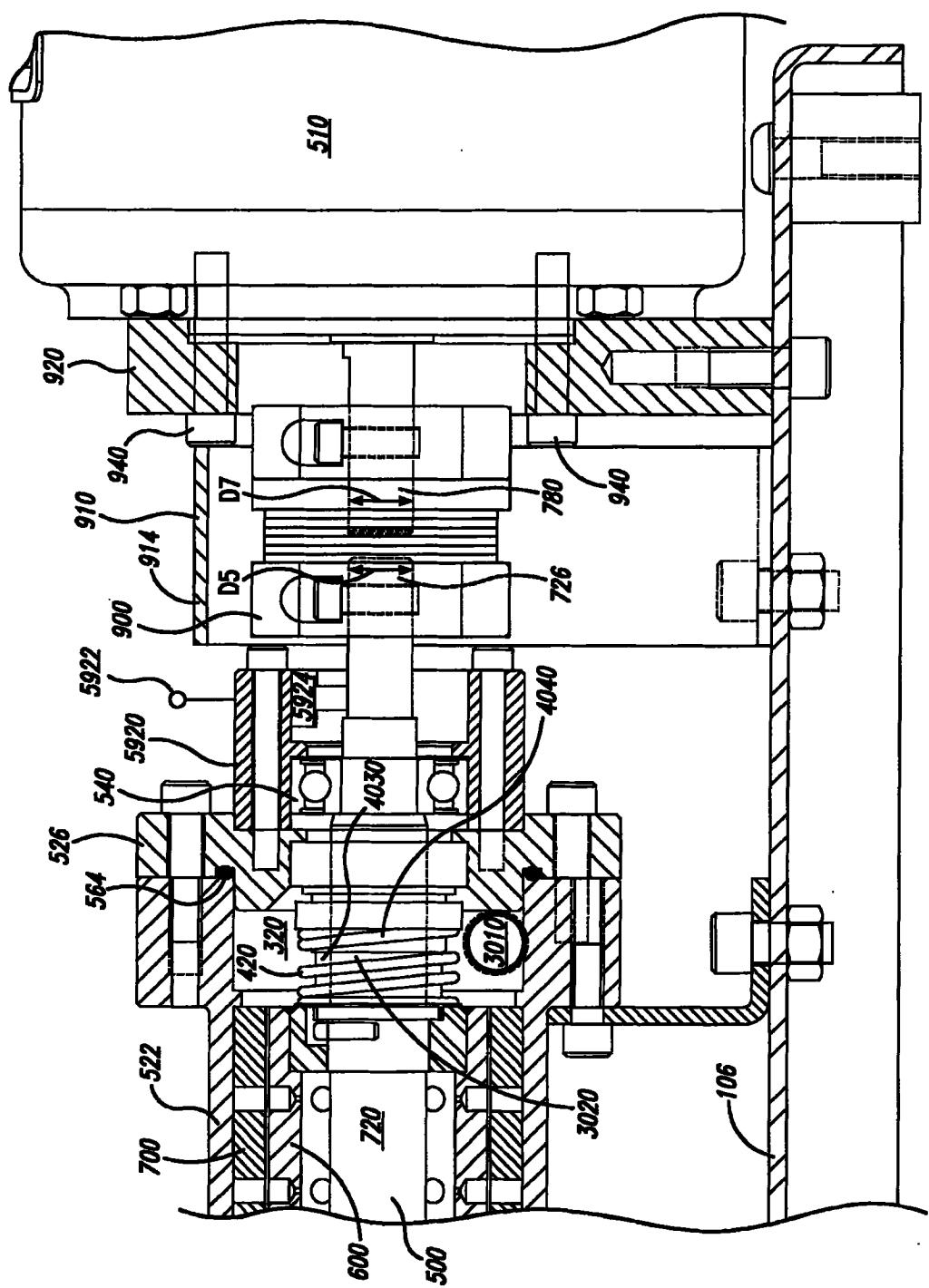


图 14

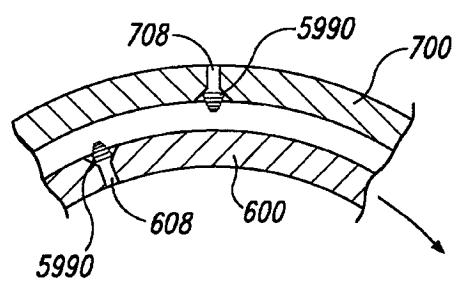


图 15

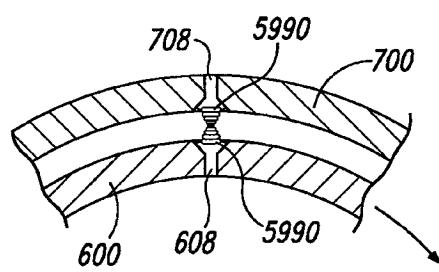


图 16

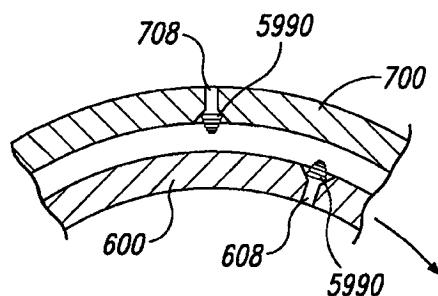


图 17

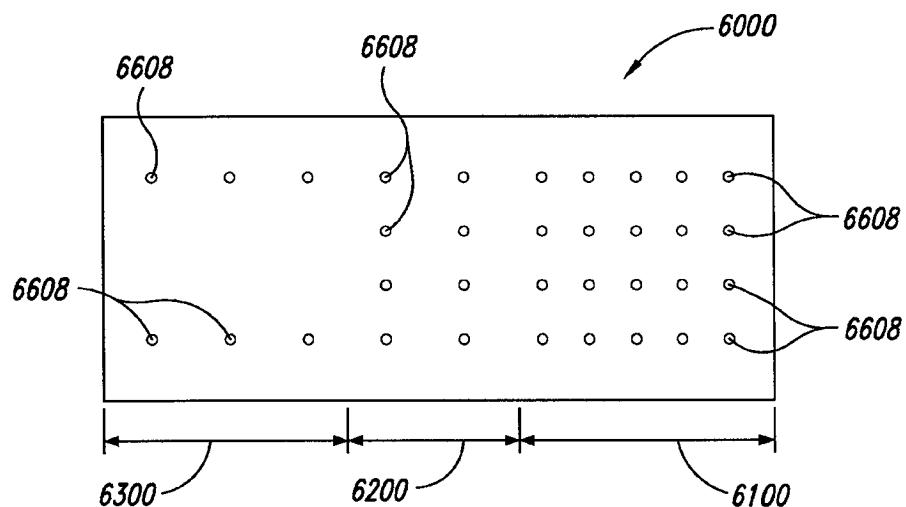


图 18

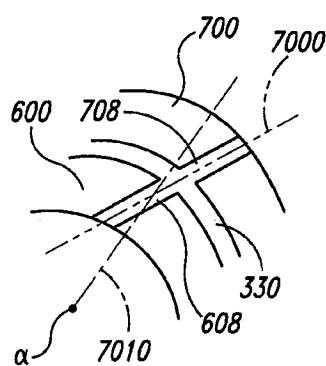


图 19

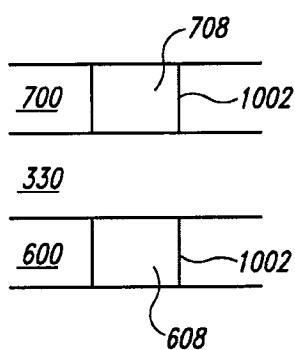


图 20

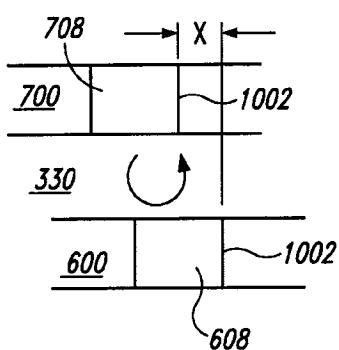


图 22

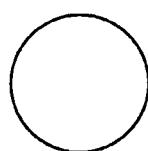


图 23

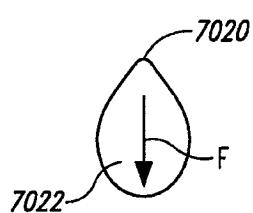


图 24

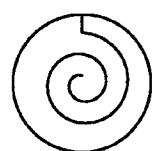


图 25

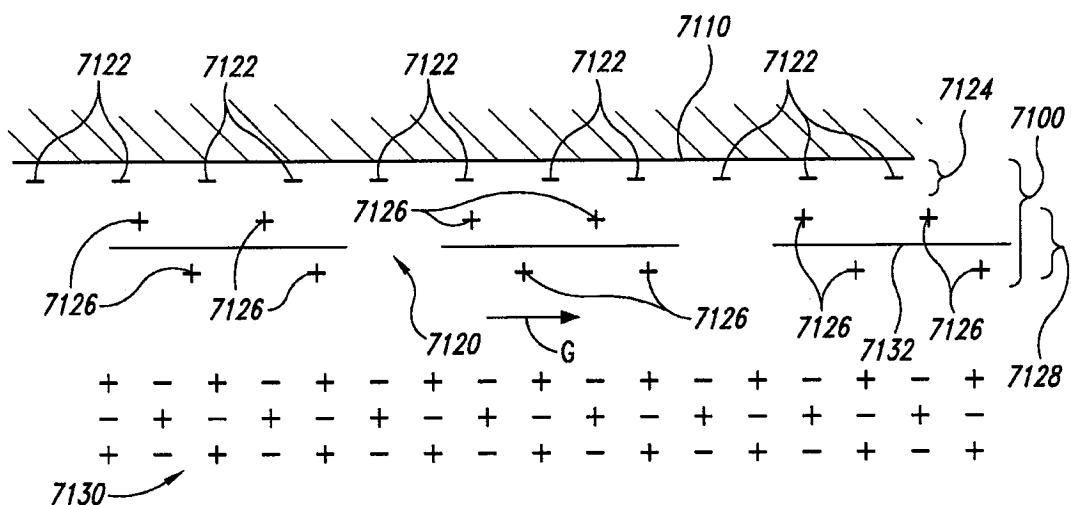


图 26

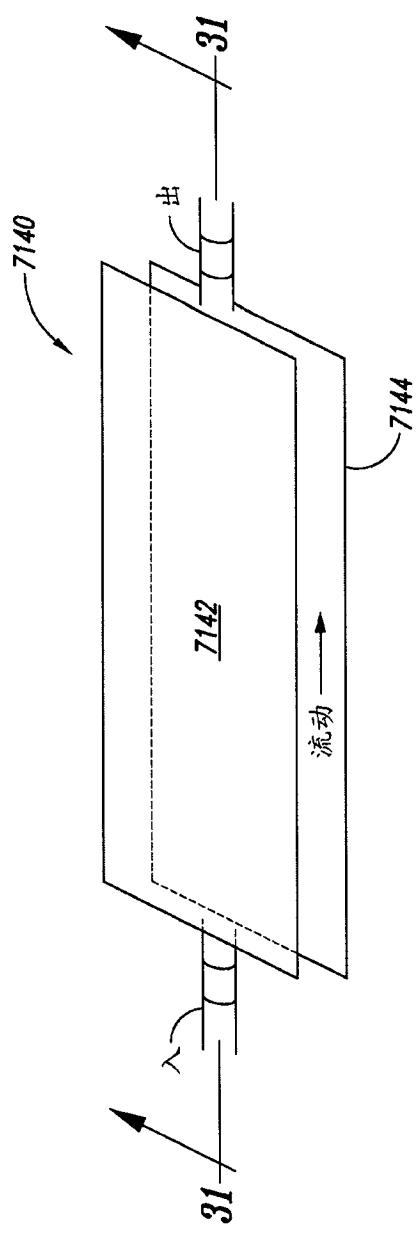


图 27

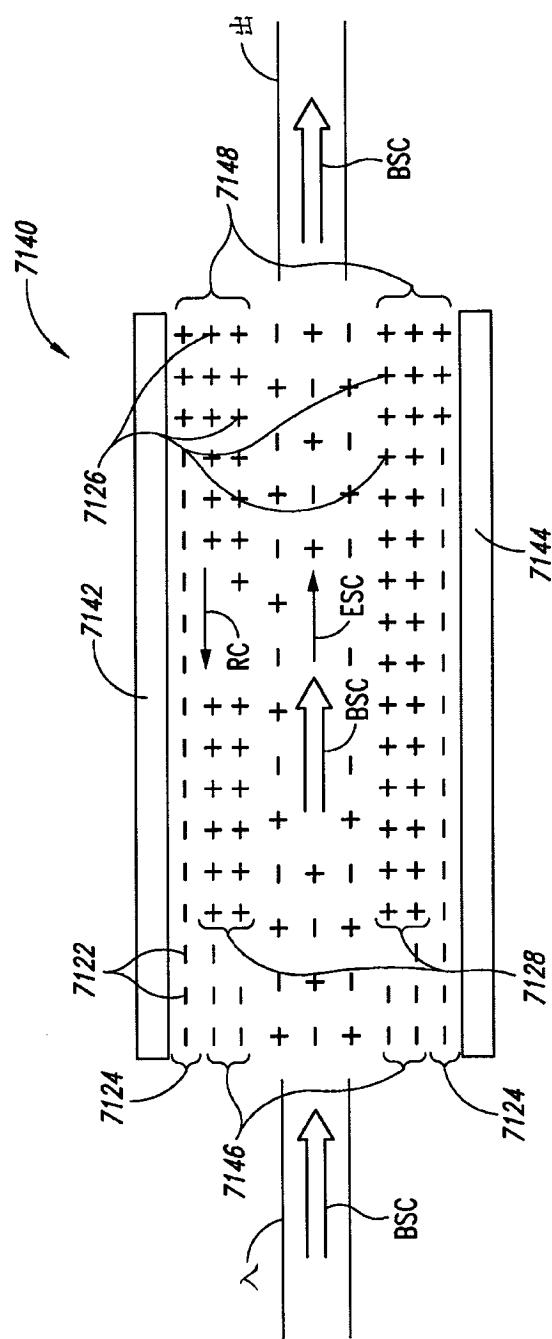


图 28

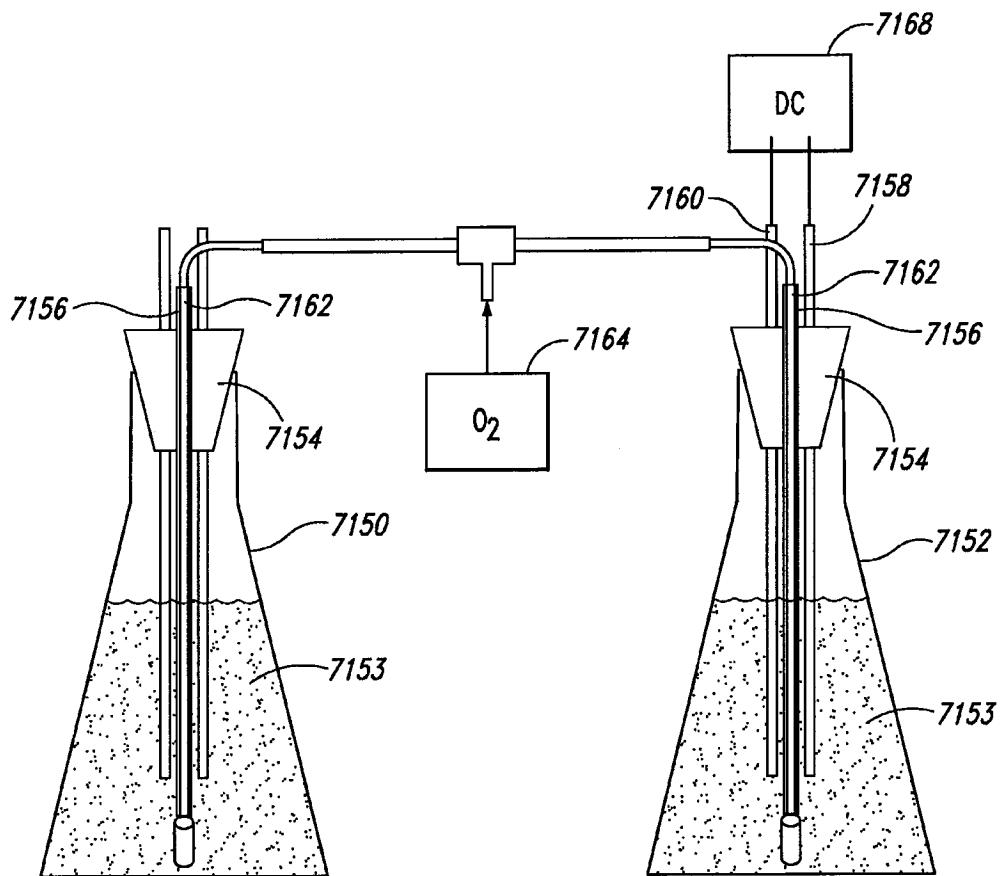


图 29

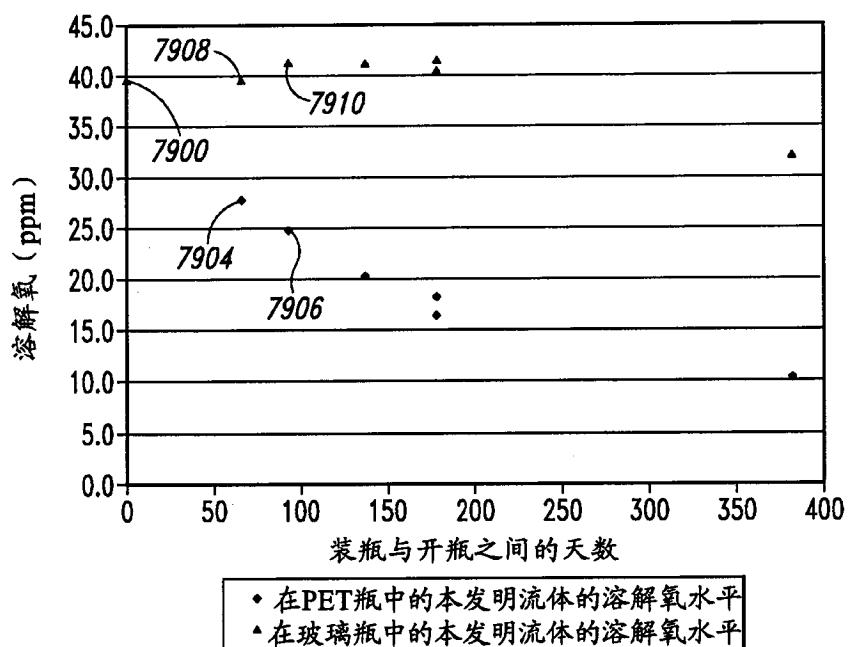


图 30

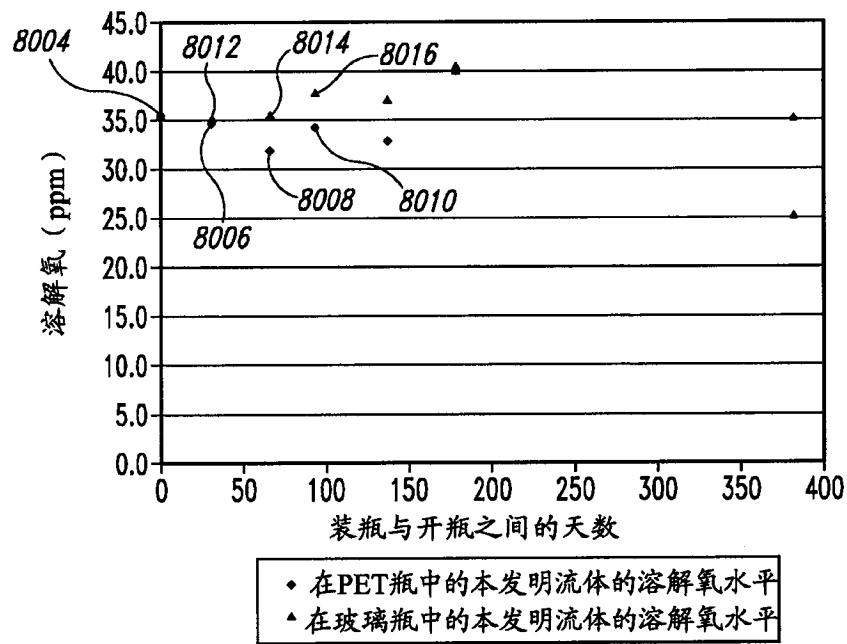


图 31

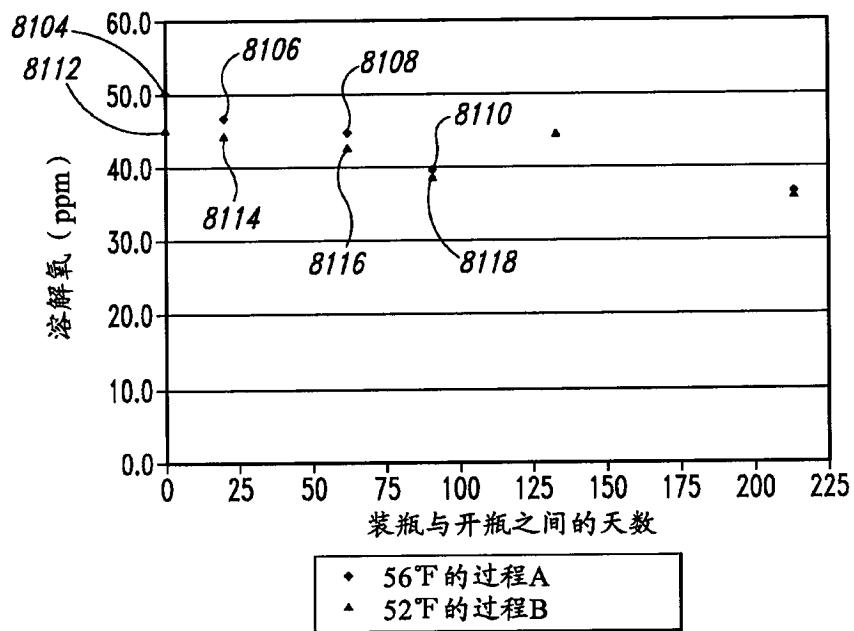


图 32

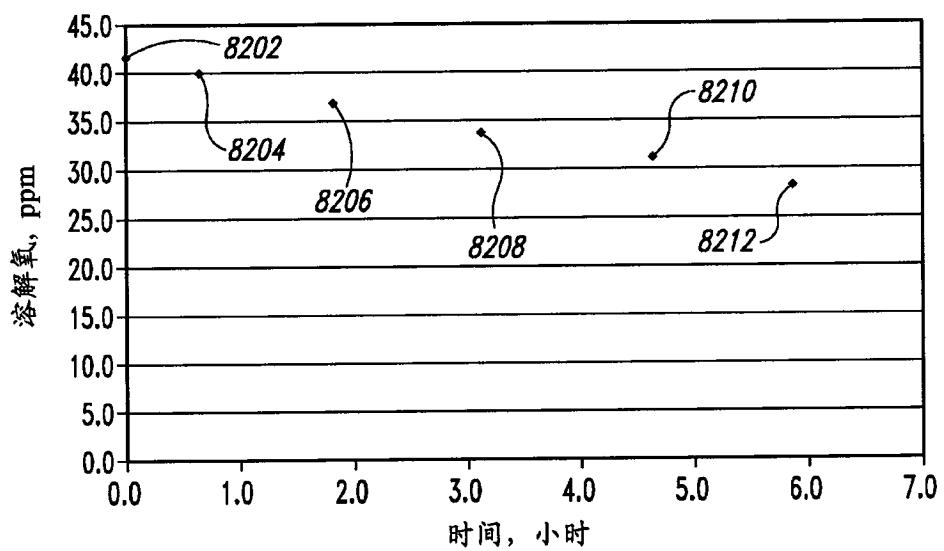


图 33

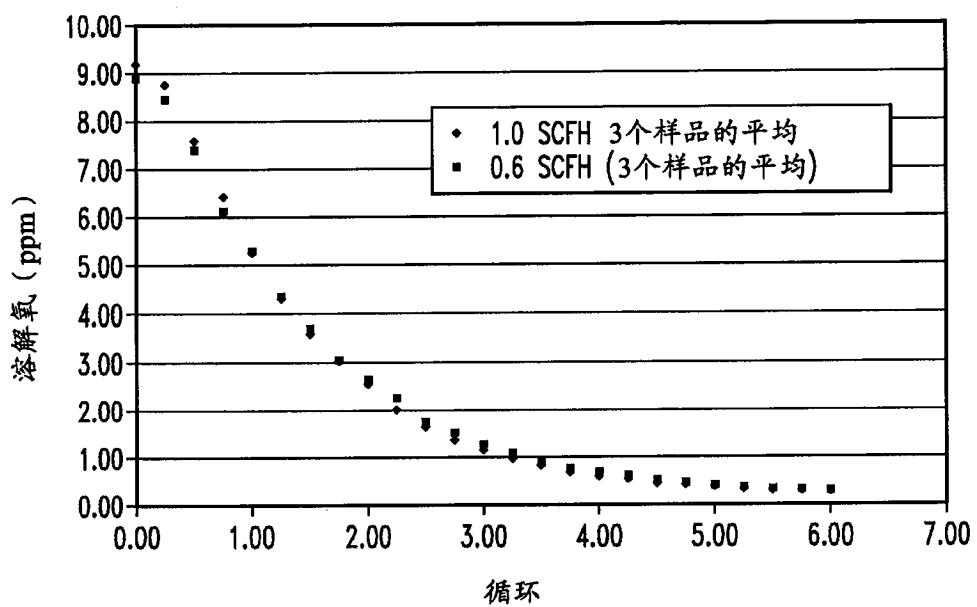


图 34

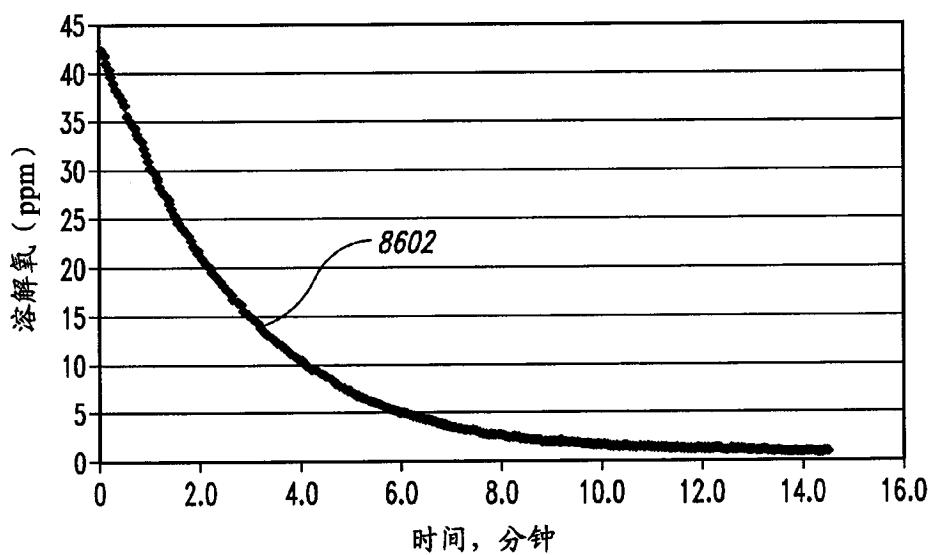


图 35

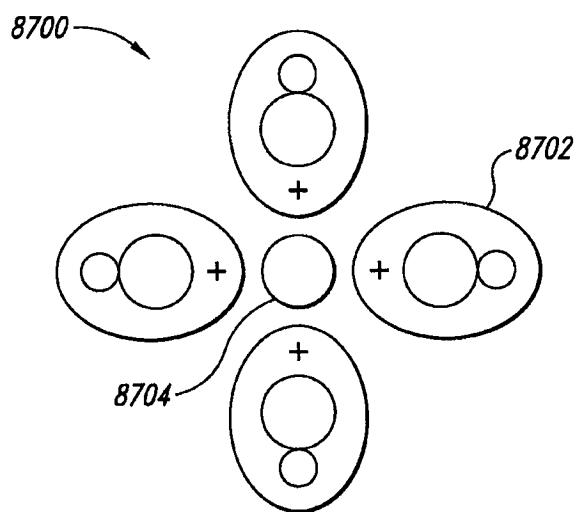


图 36

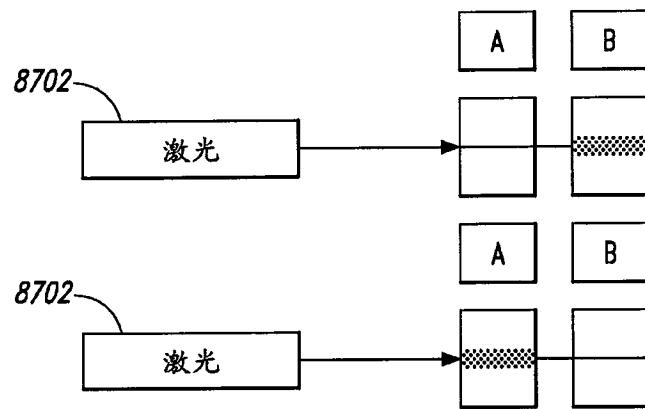


图 37A

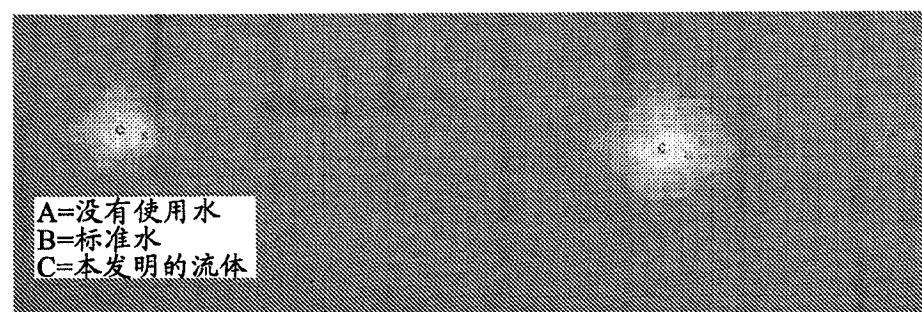
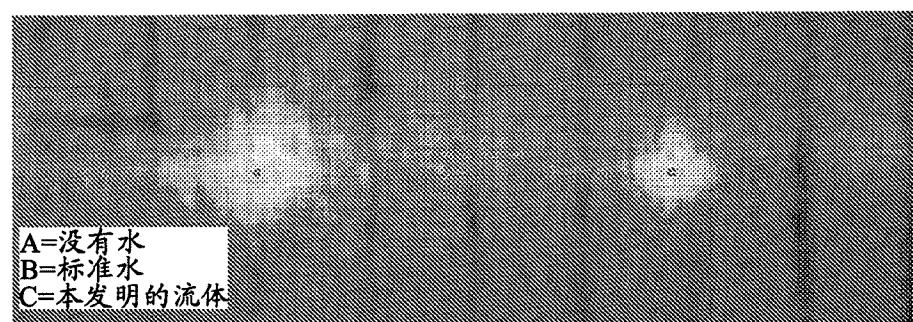
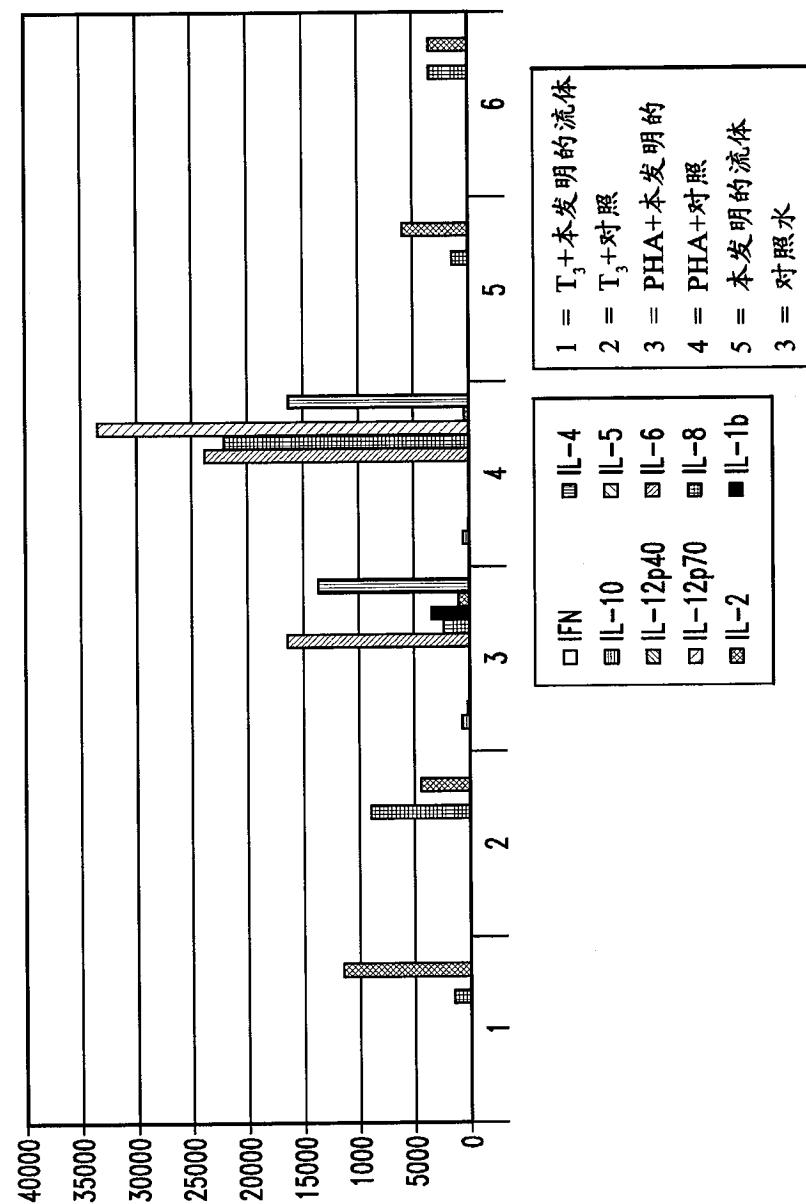


图 37B



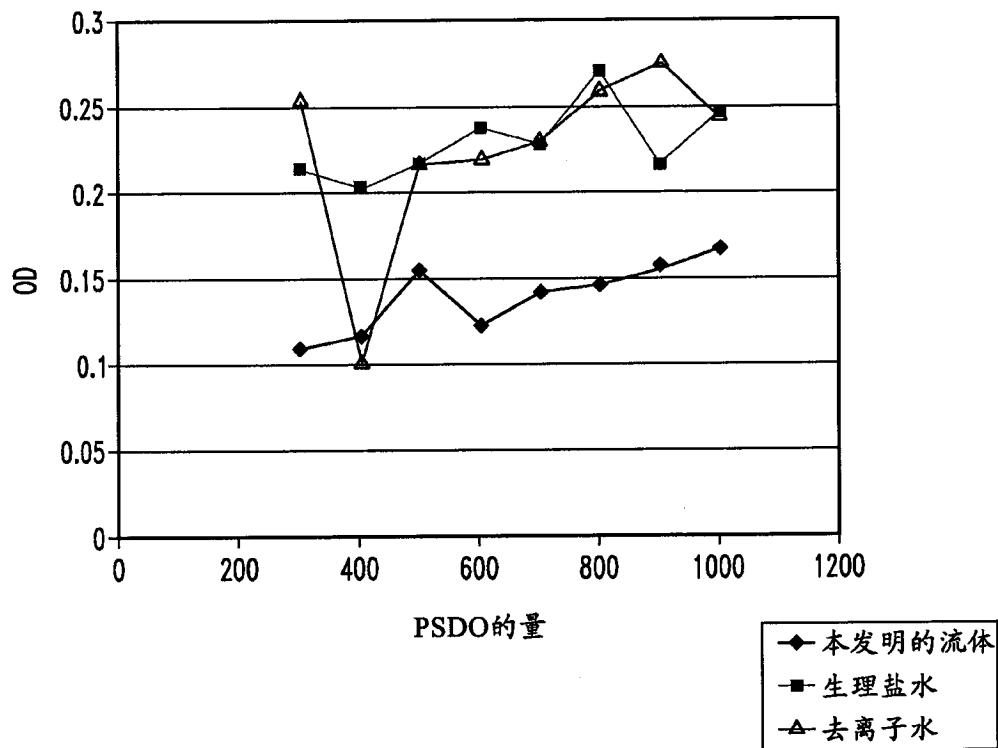


图 39

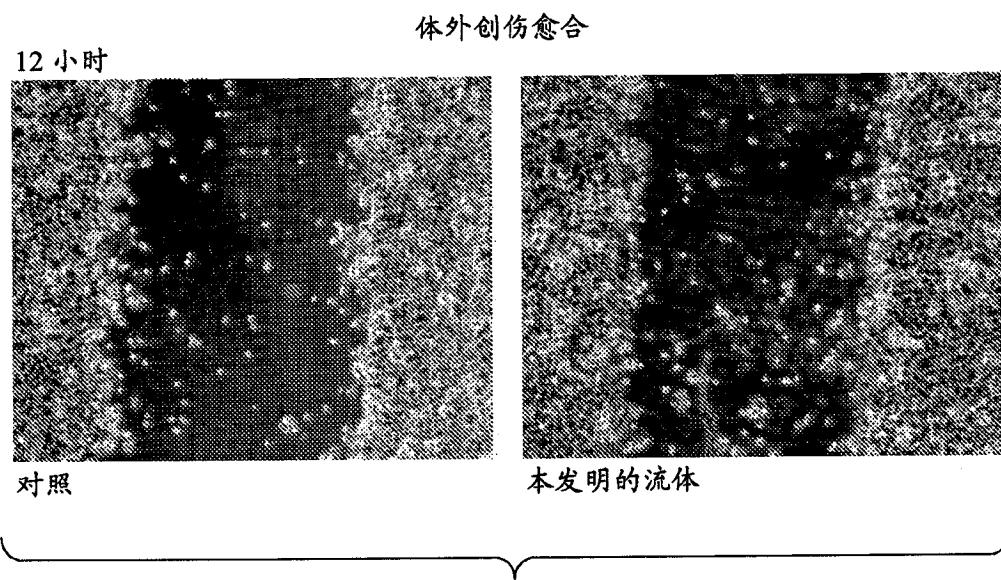


图 40A

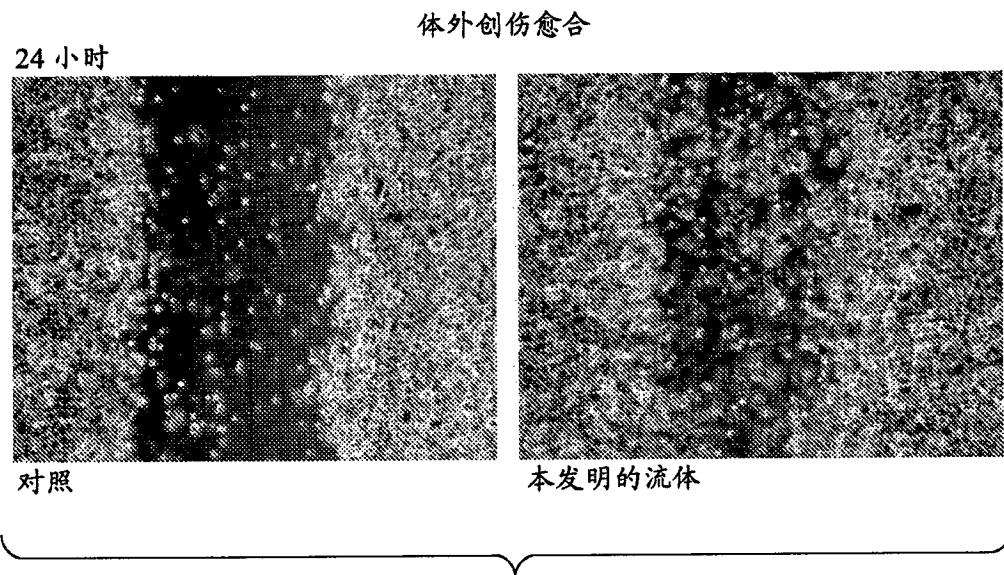


图 40B

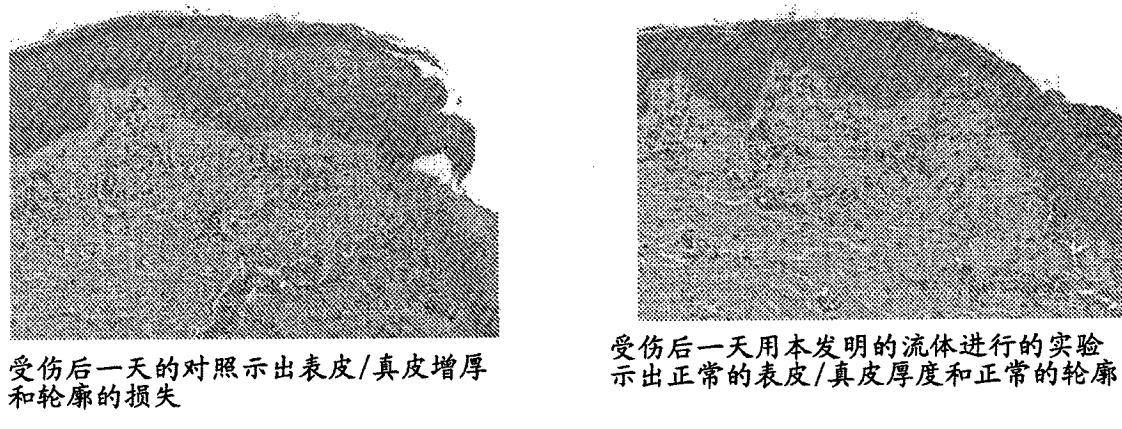
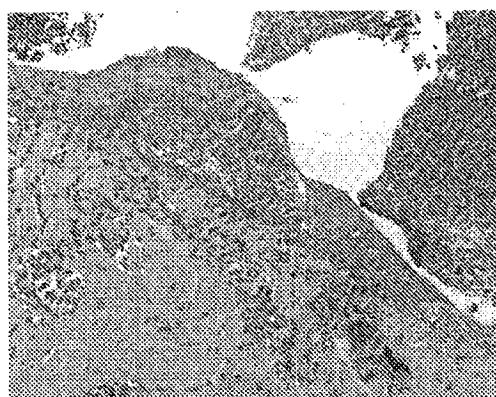


图 41A

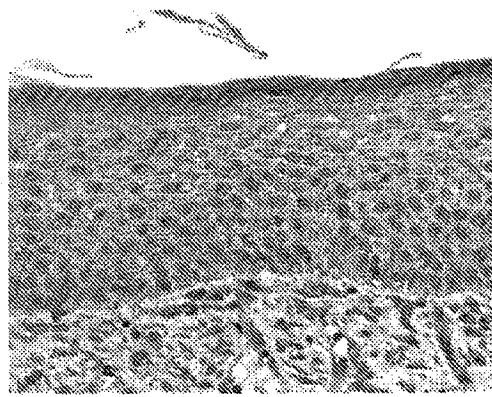
图 41B



图 41C



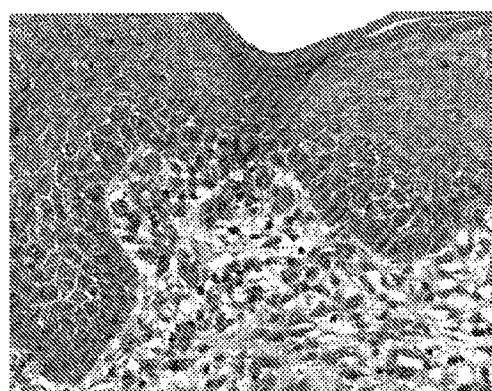
用本发明的流体进行的实验第四天示出
1200微米的表皮突出物



对照第16天示出具有表皮/真皮轮廓
的损失的较少的分化表皮

图 41D

图 41E



用本发明的流体进行的实验第16天示出
具有更为正常的表皮/真皮轮廓的更多
的分化表皮

图 41F

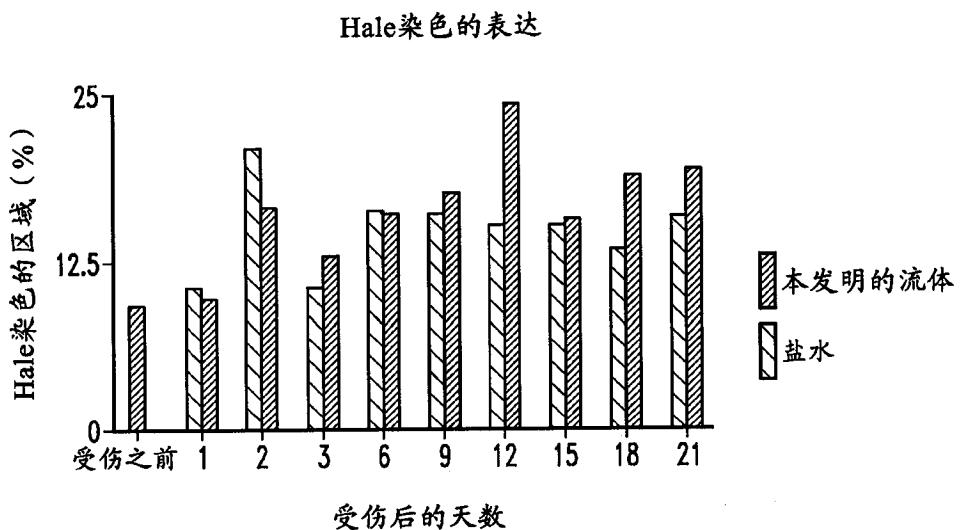


图 42

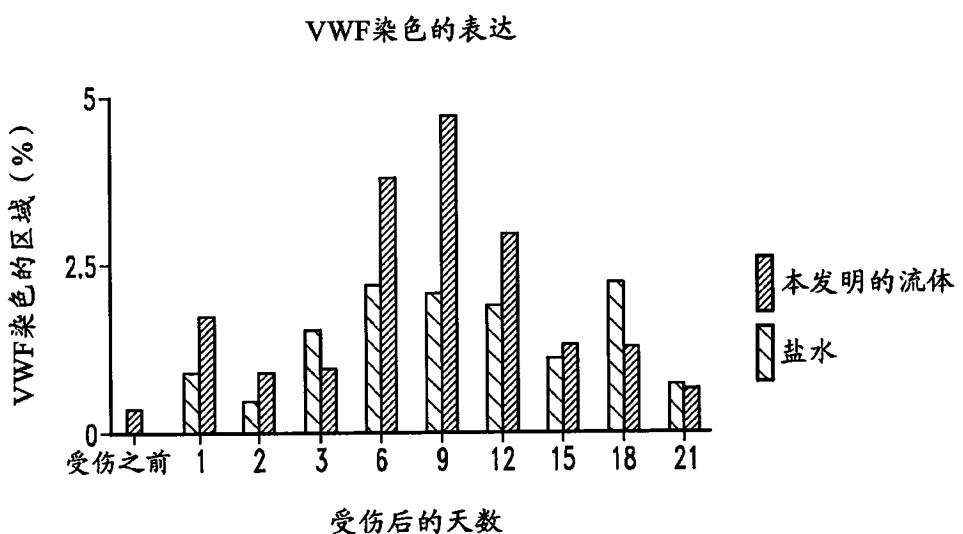


图 43

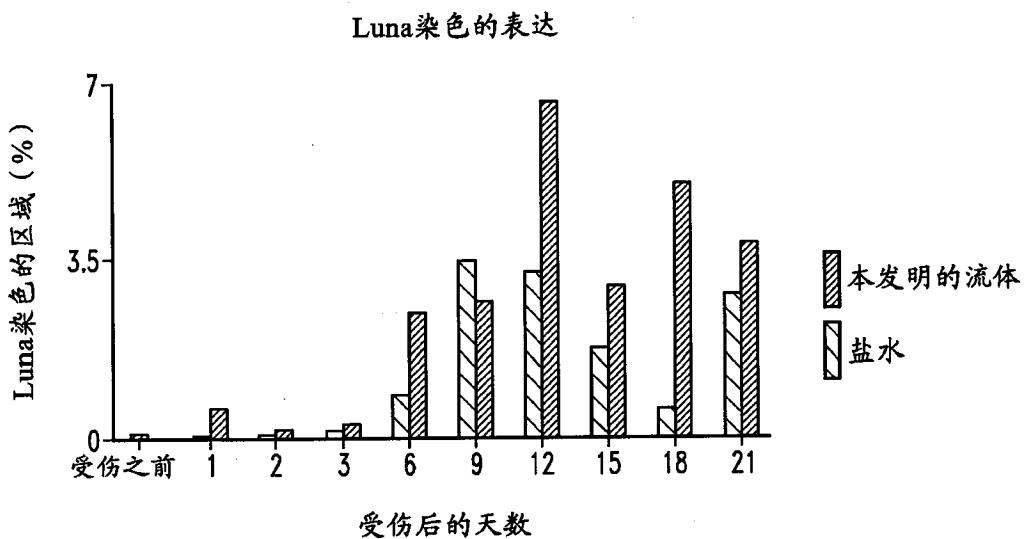


图 44

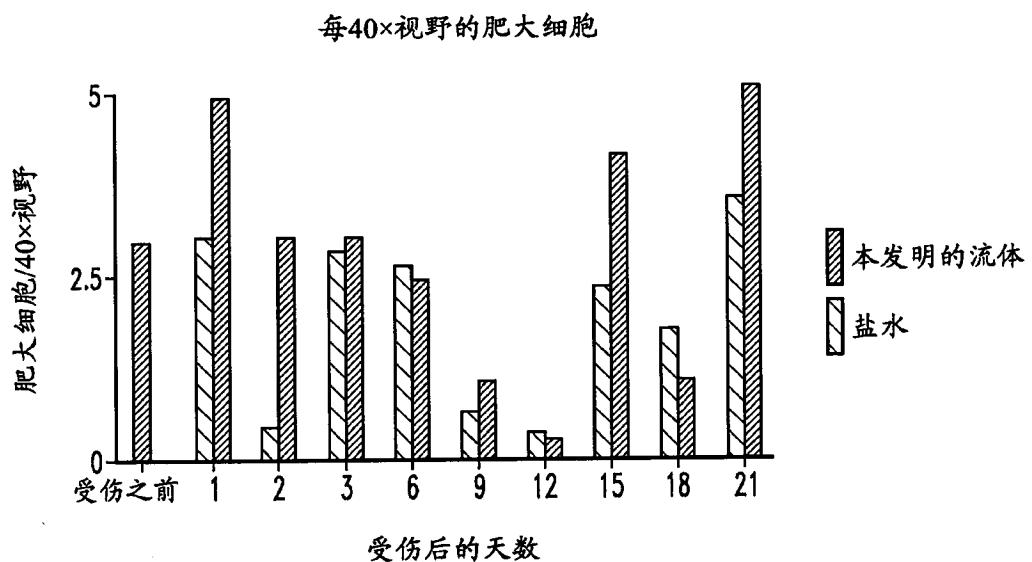


图 45

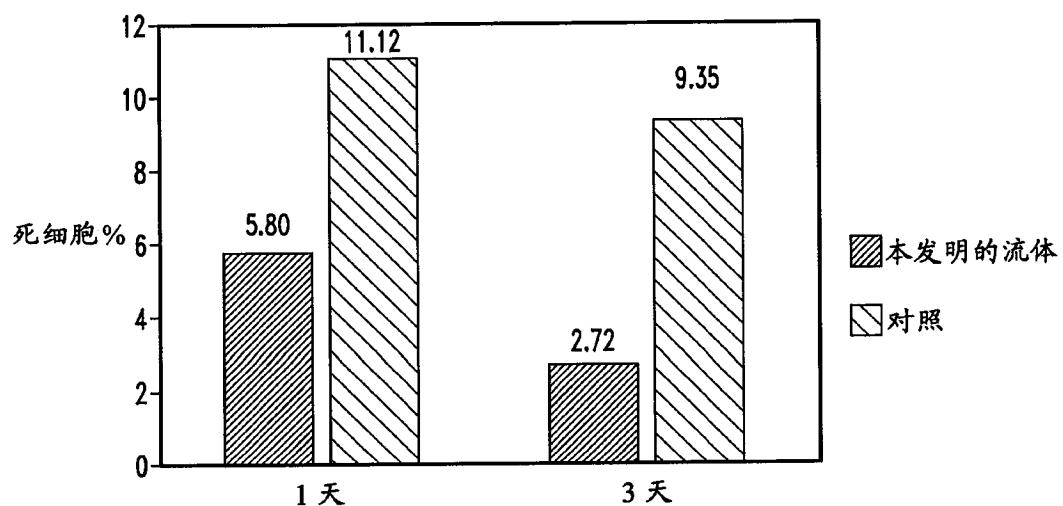


图 46

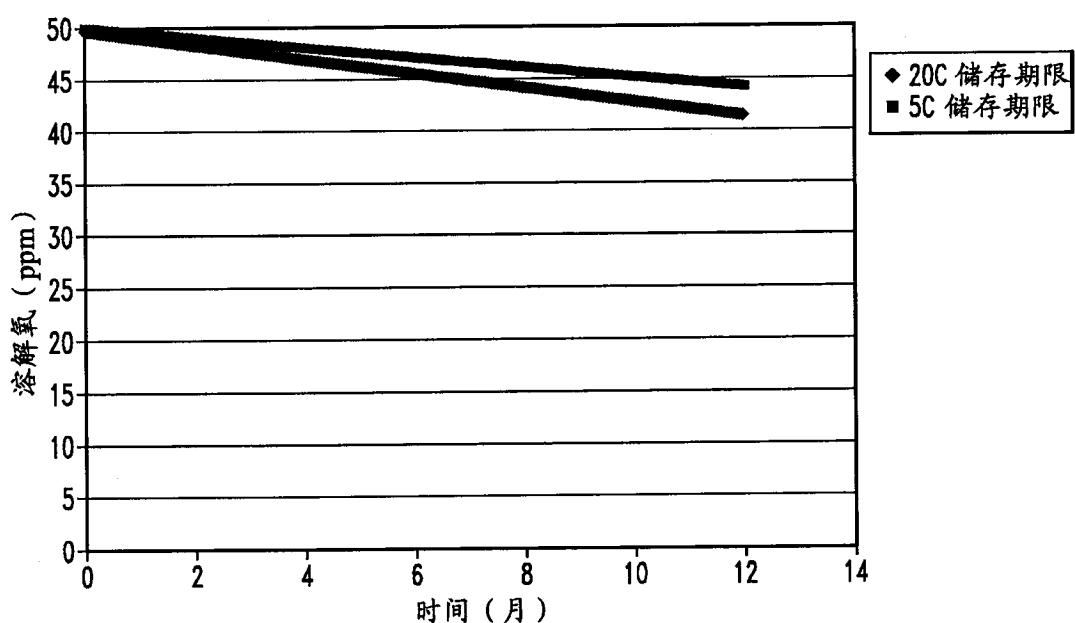


图 47

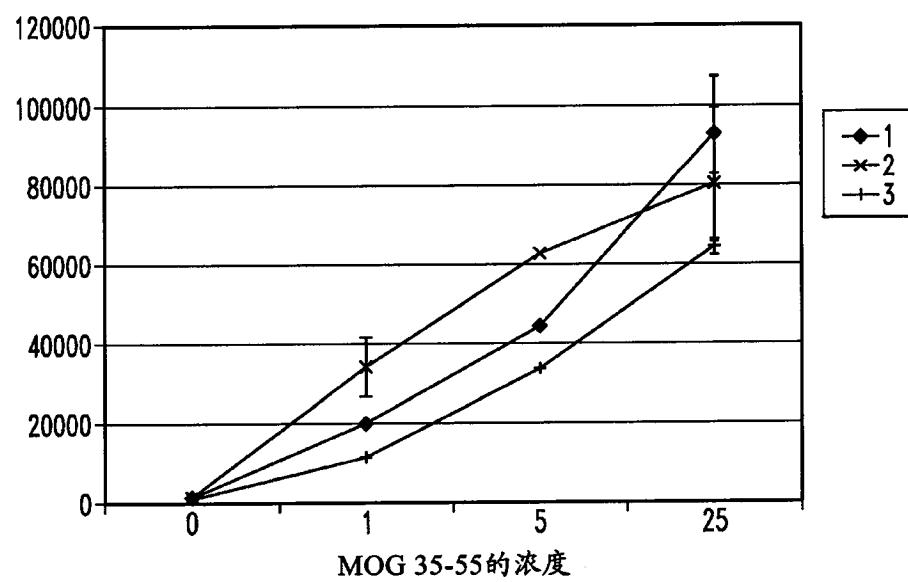


图 48

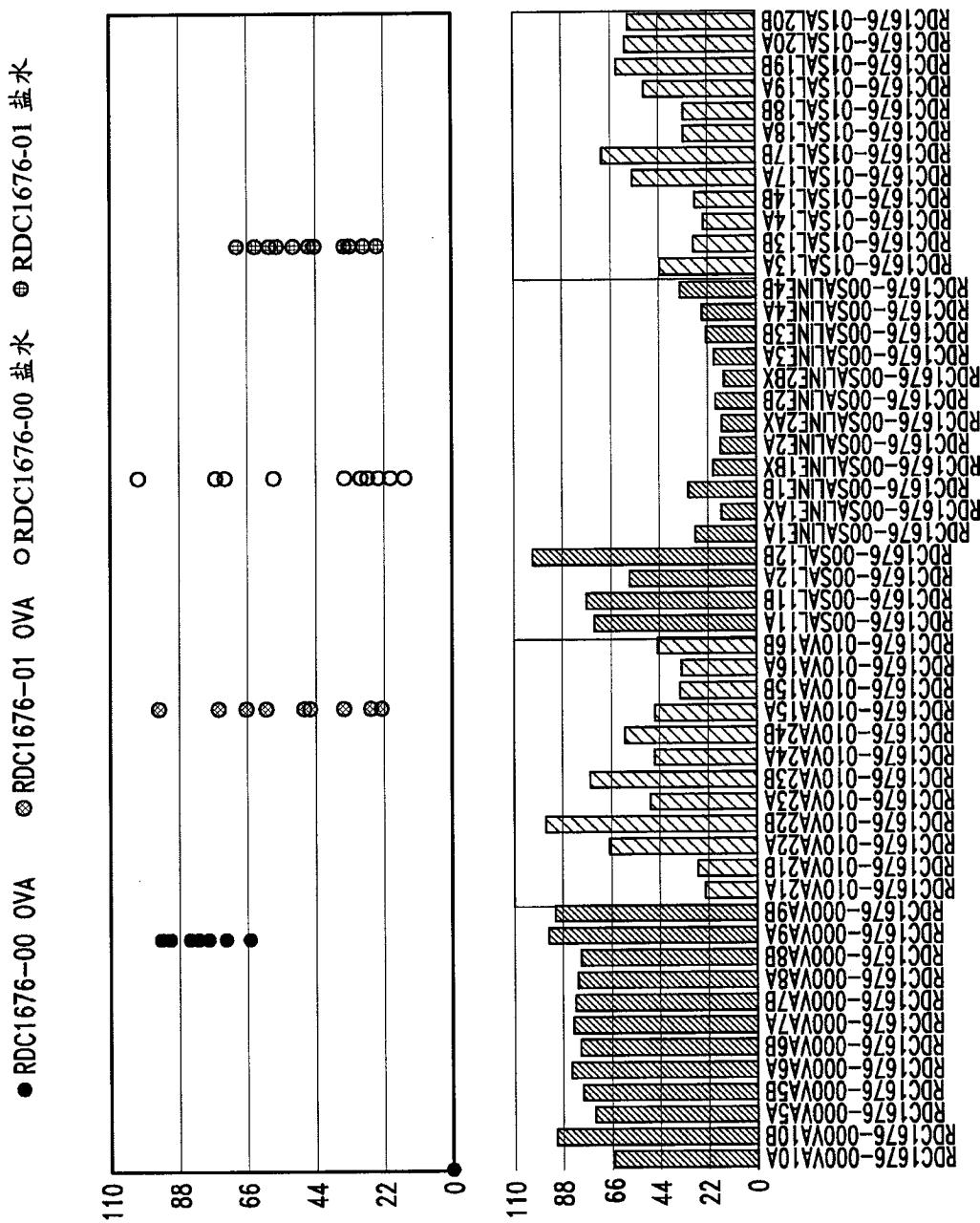
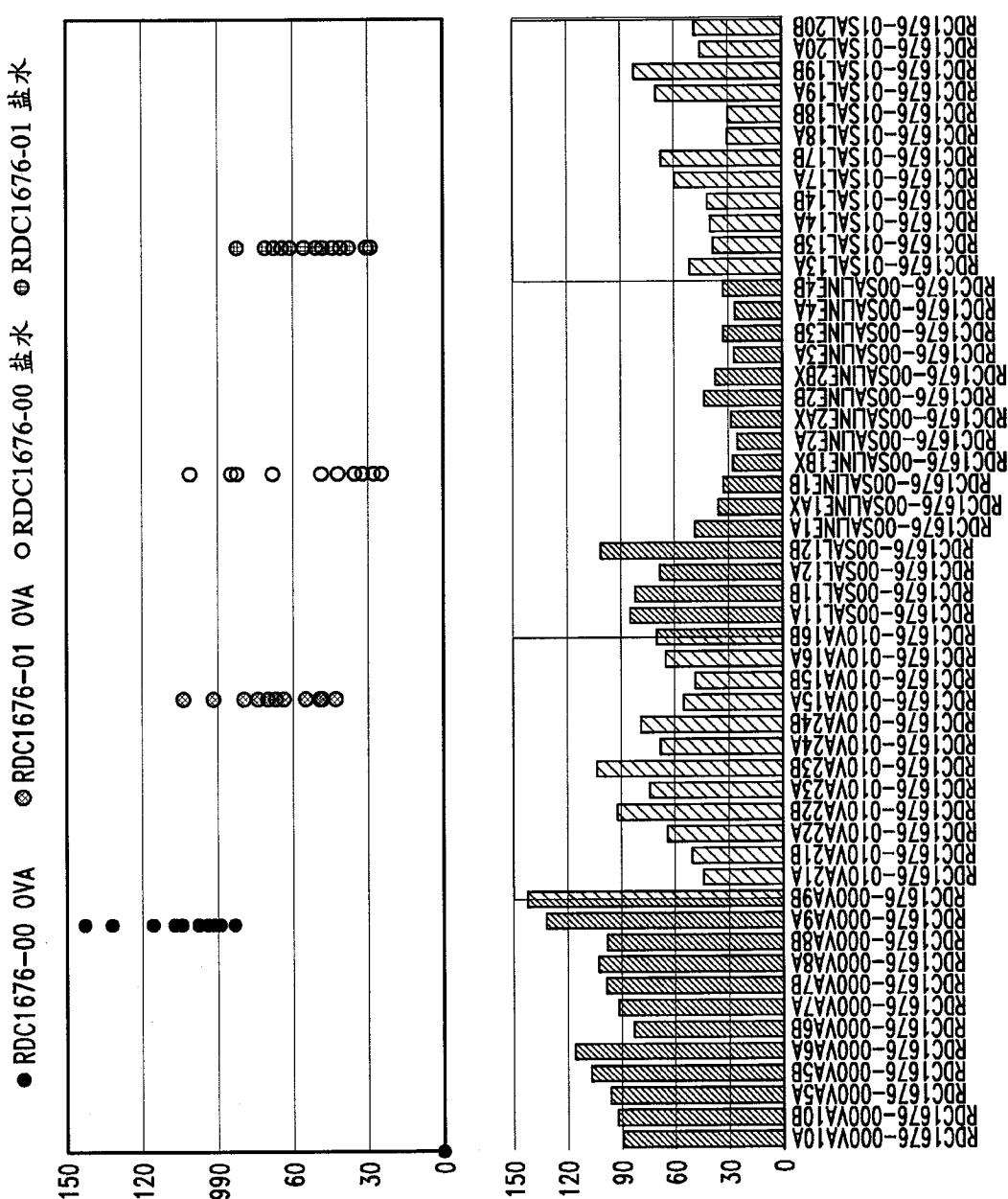


图 49



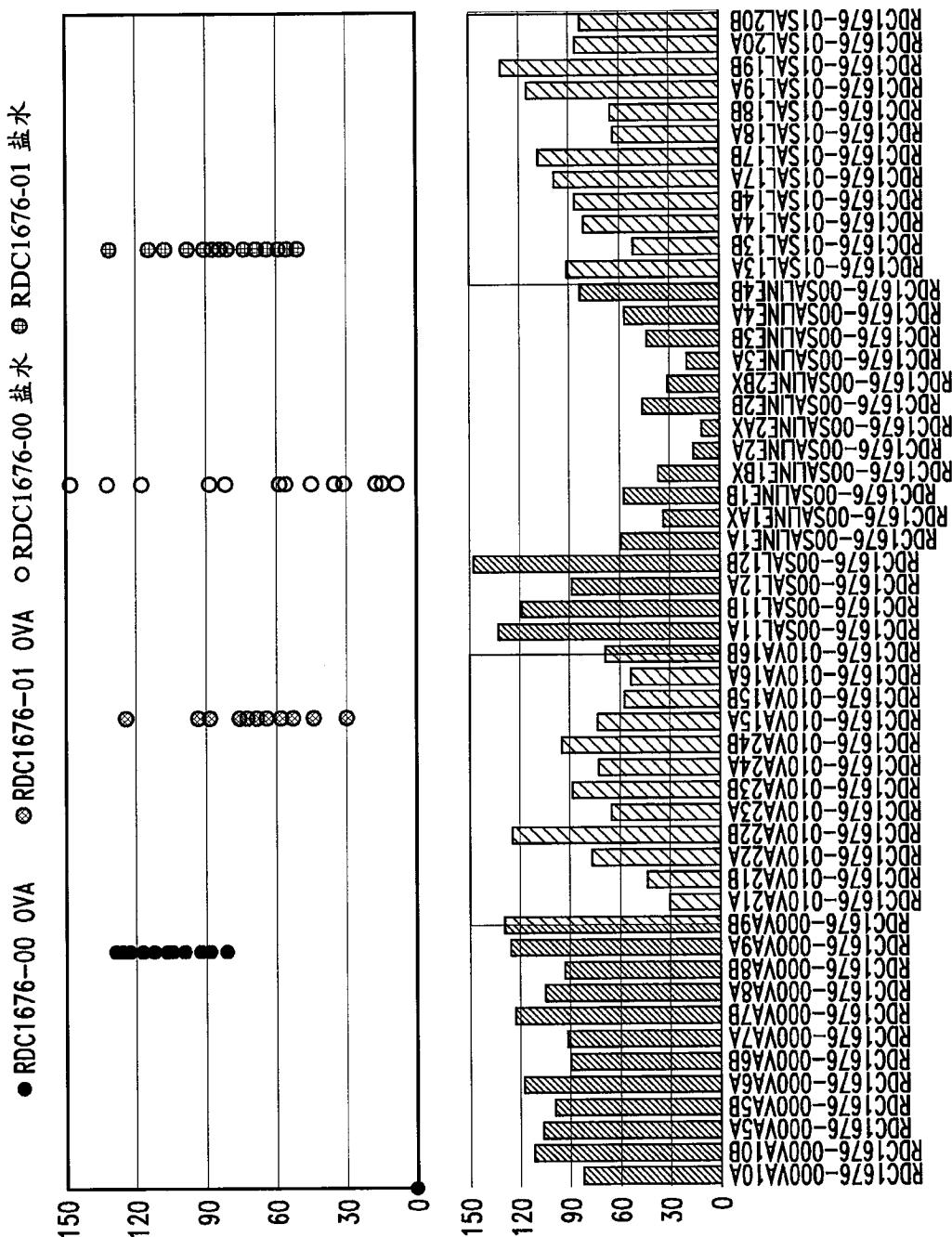


图 51

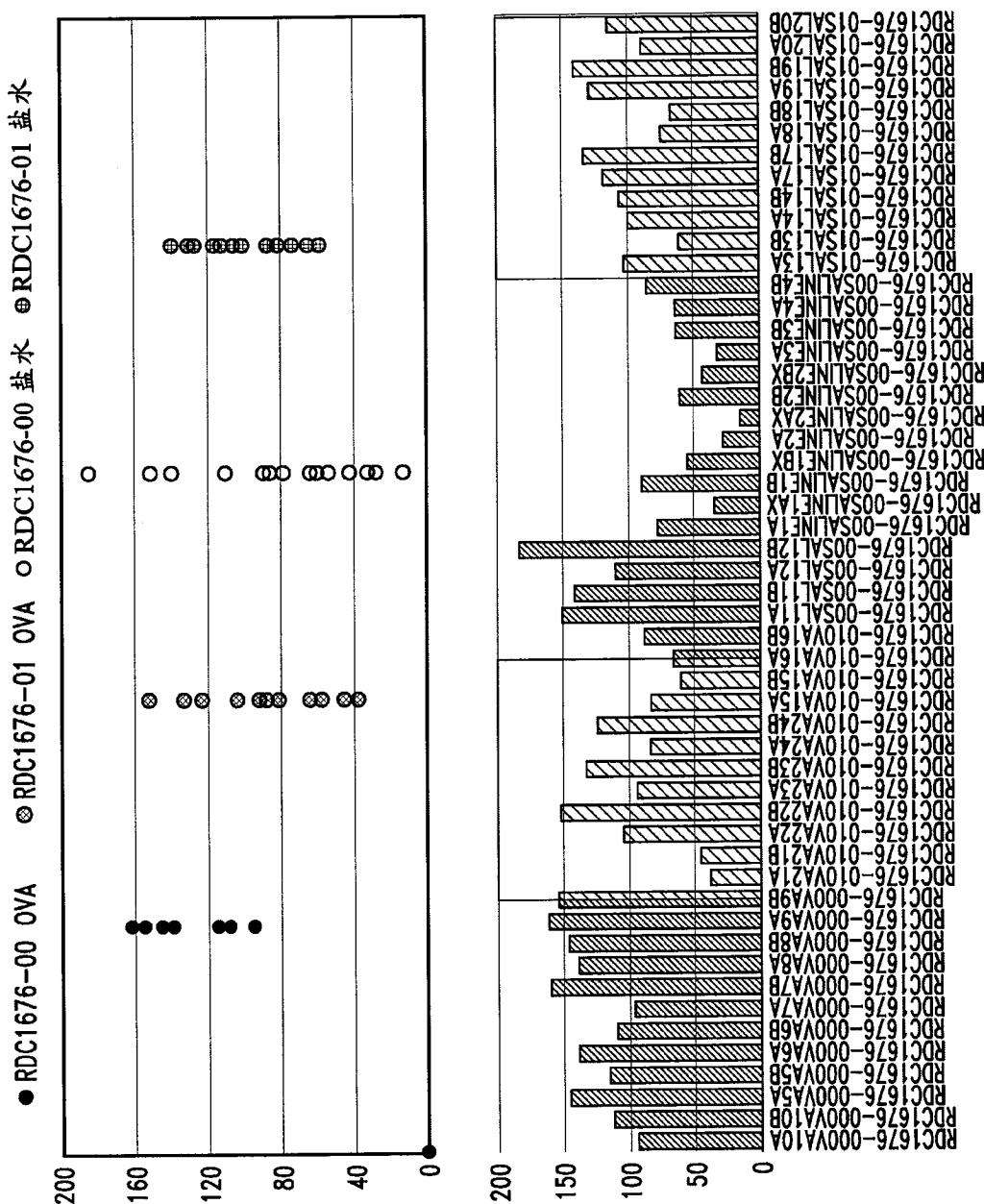
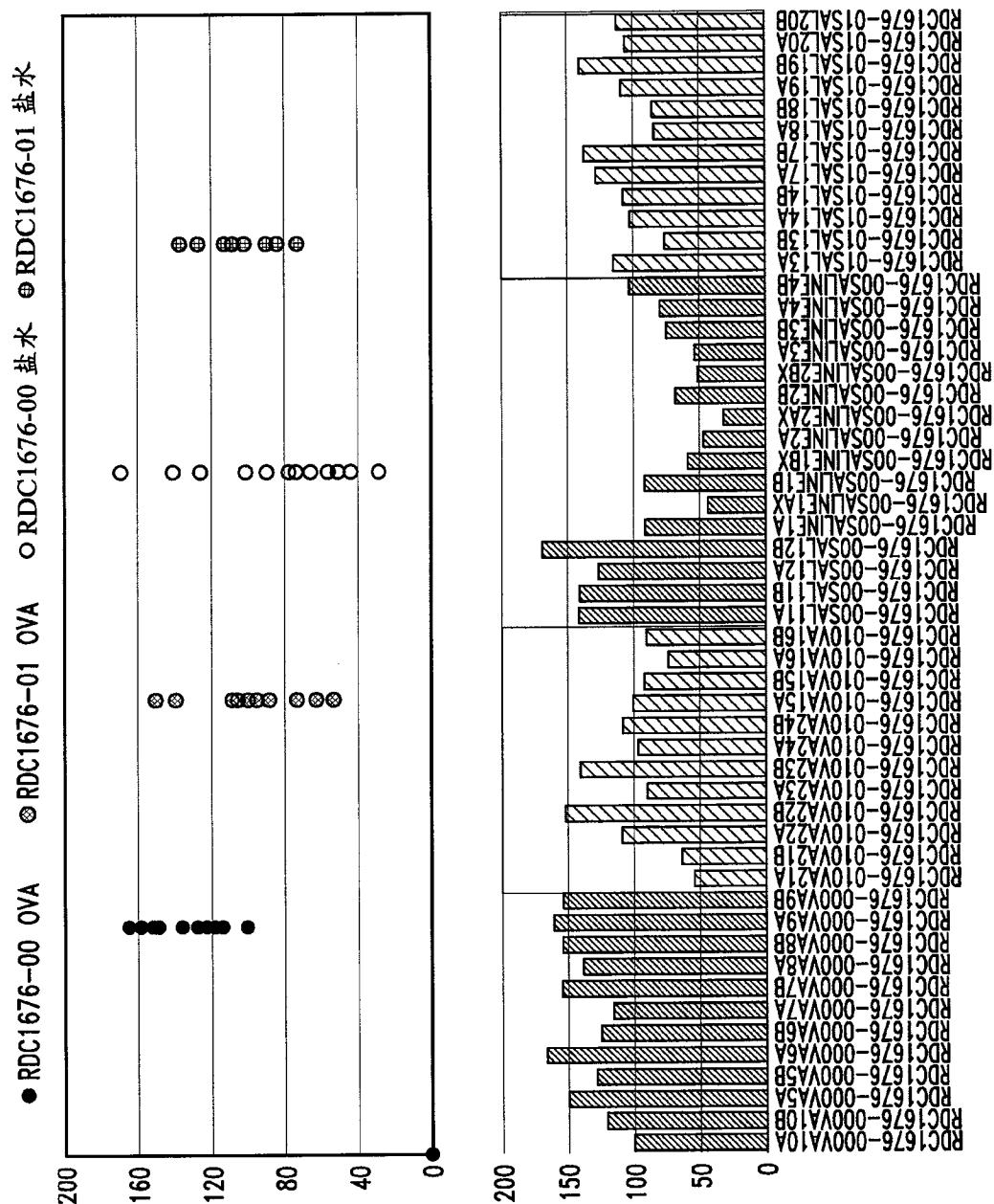


图 52



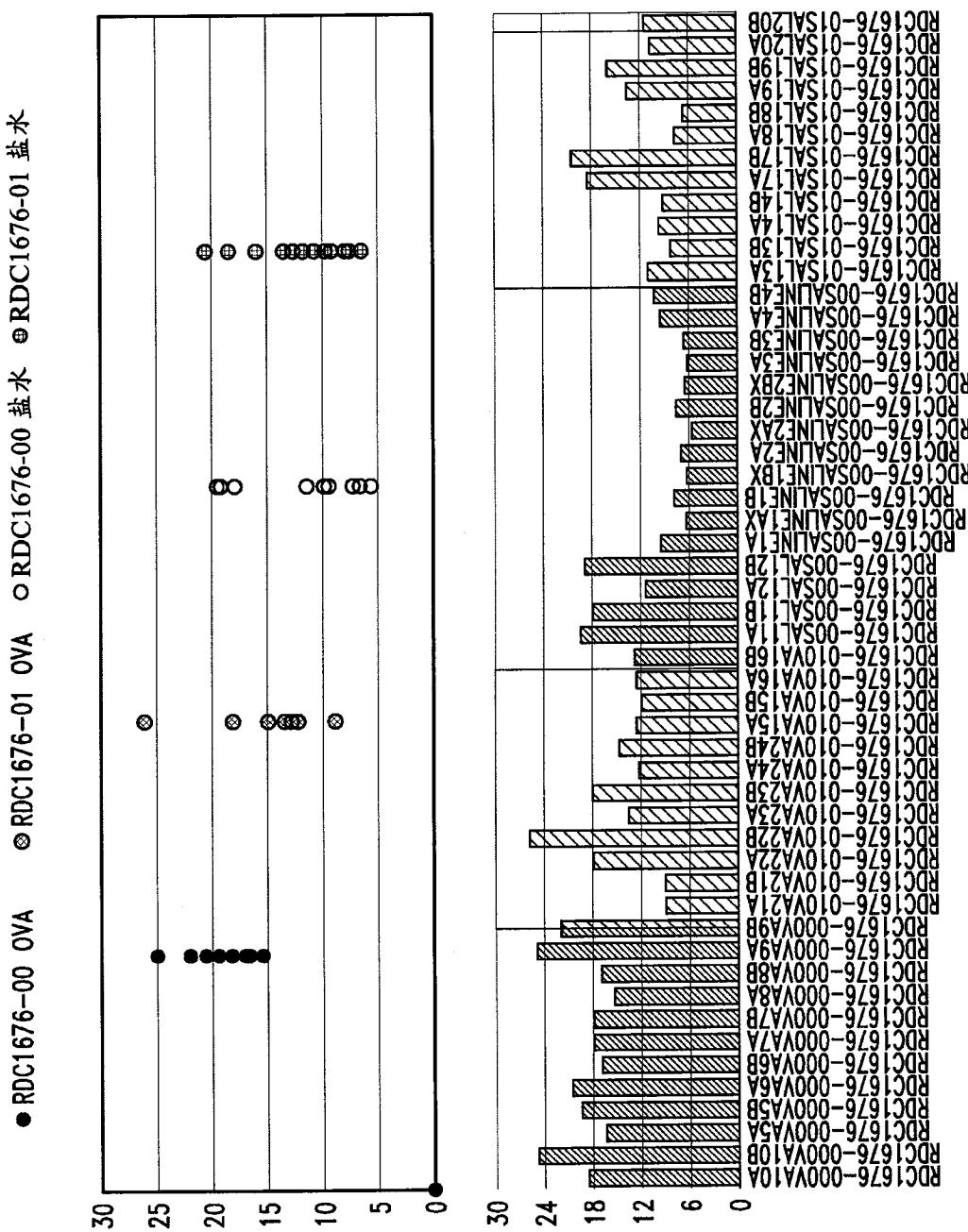


图 54

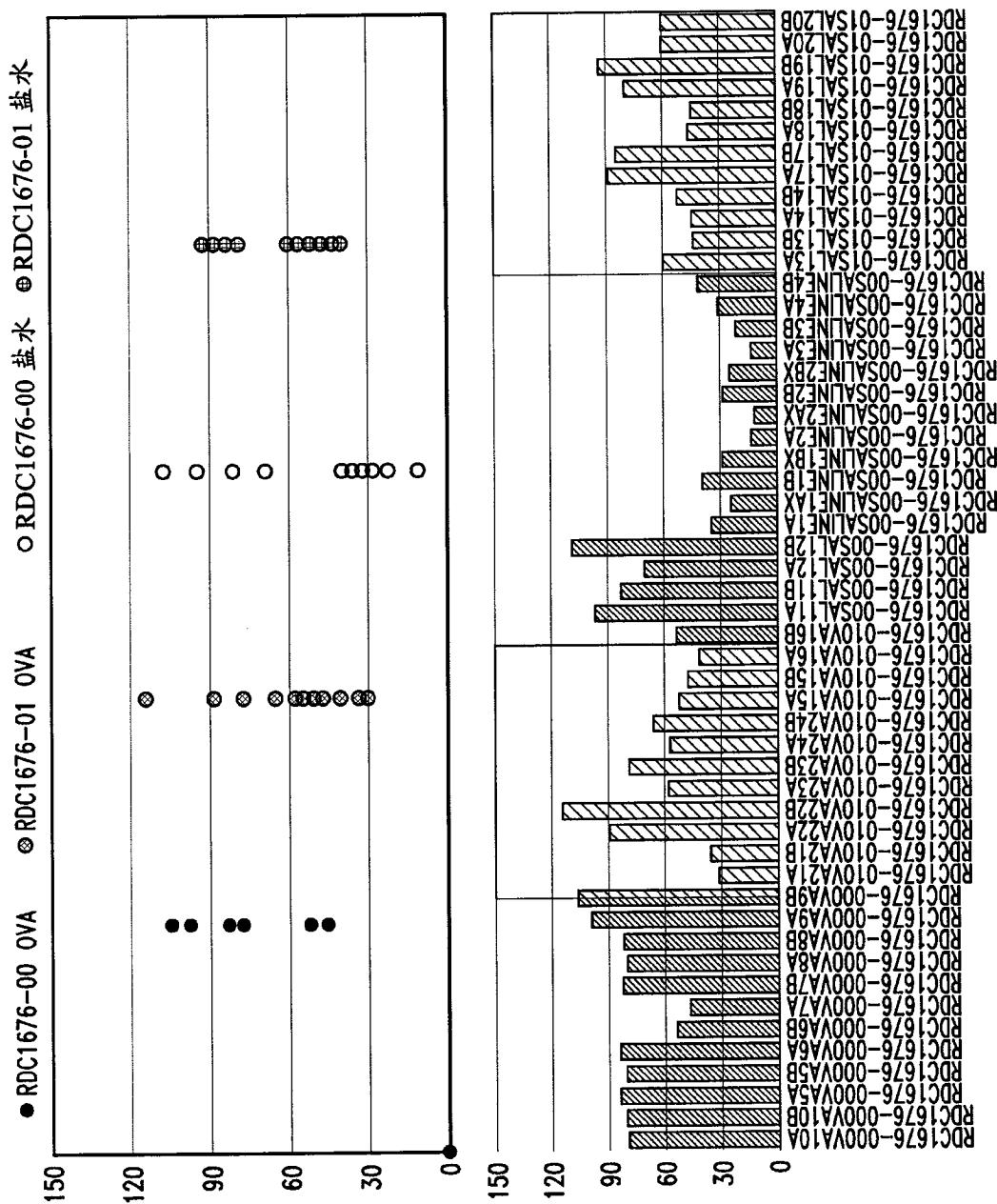


图 55

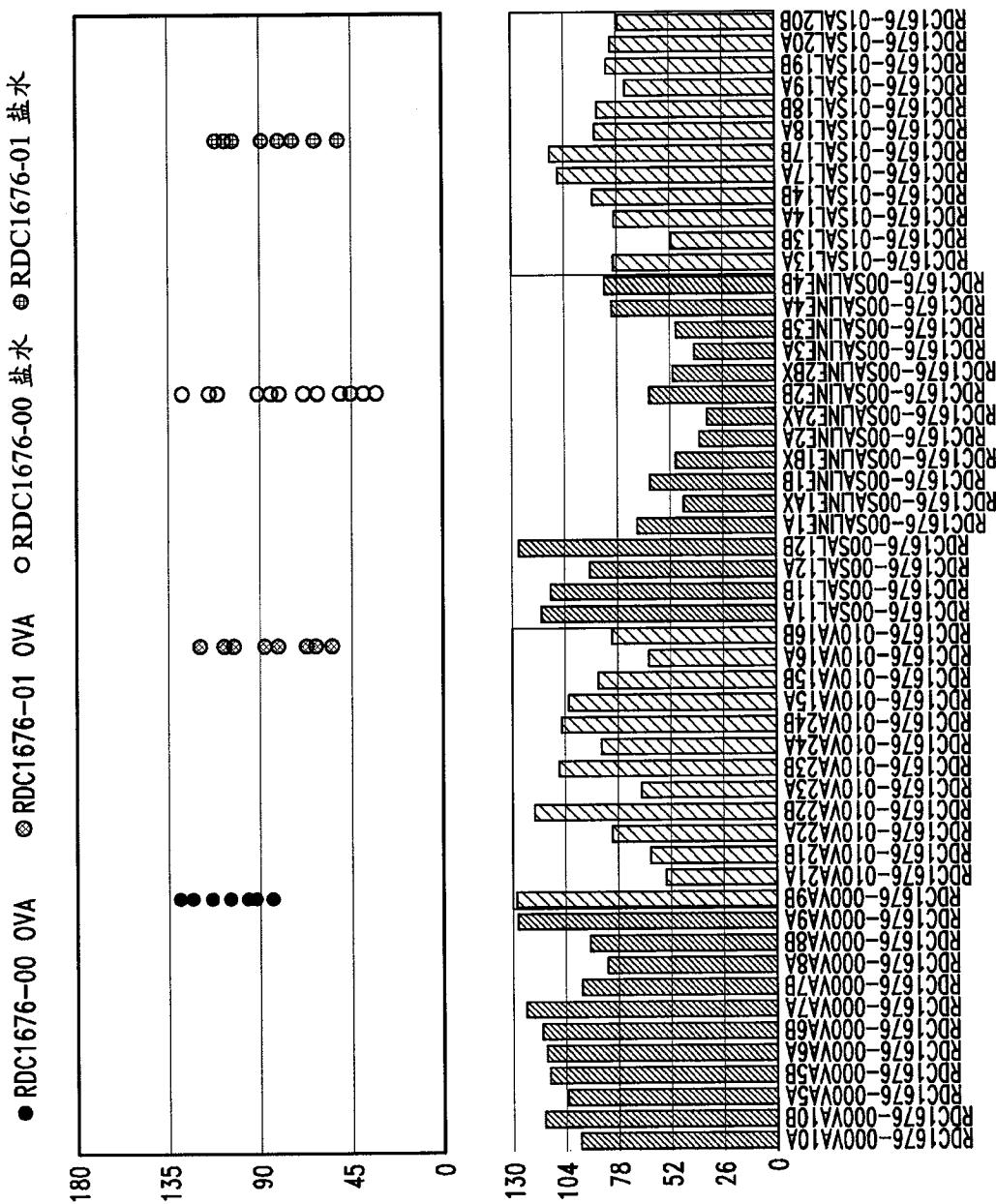


图 56

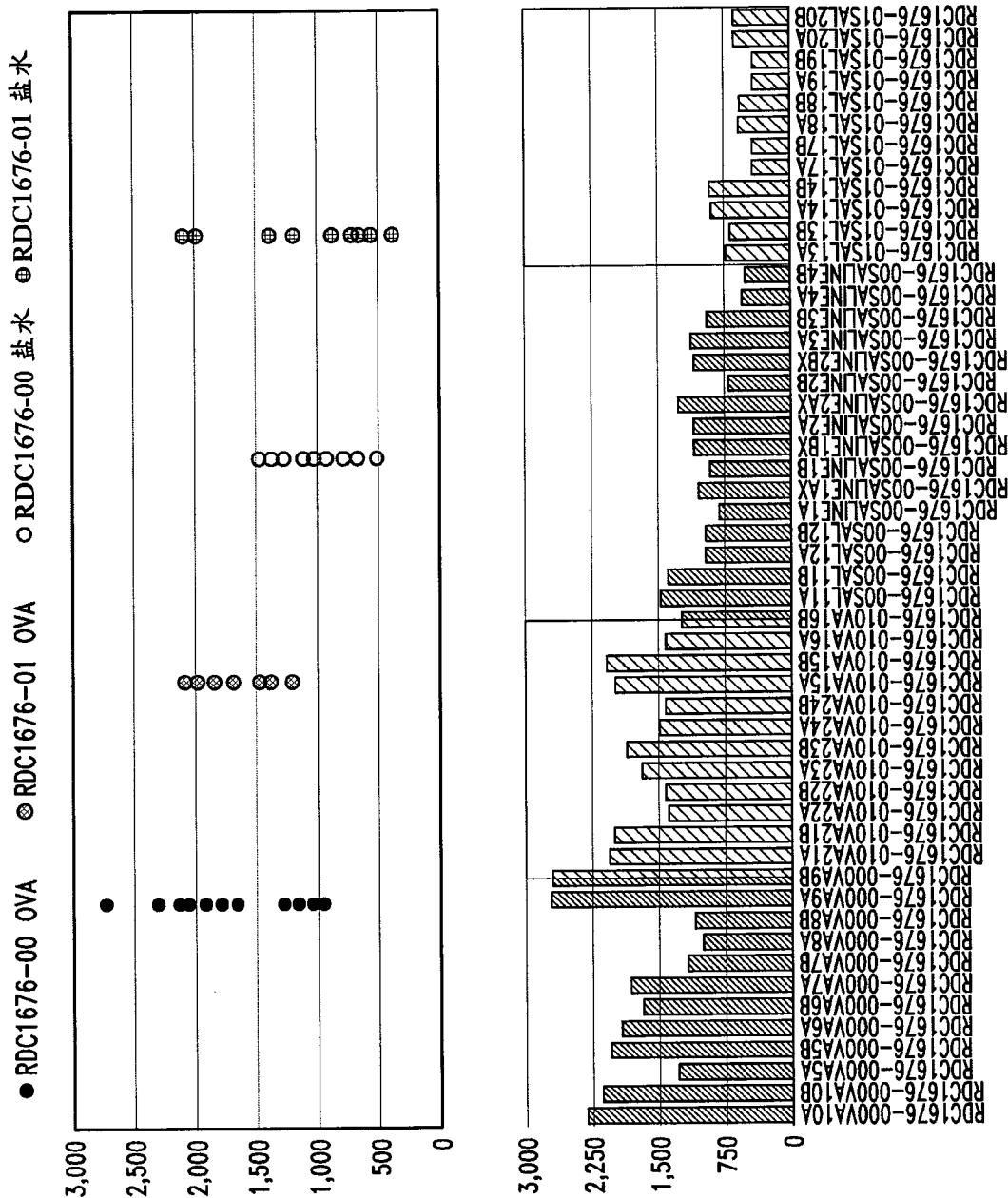
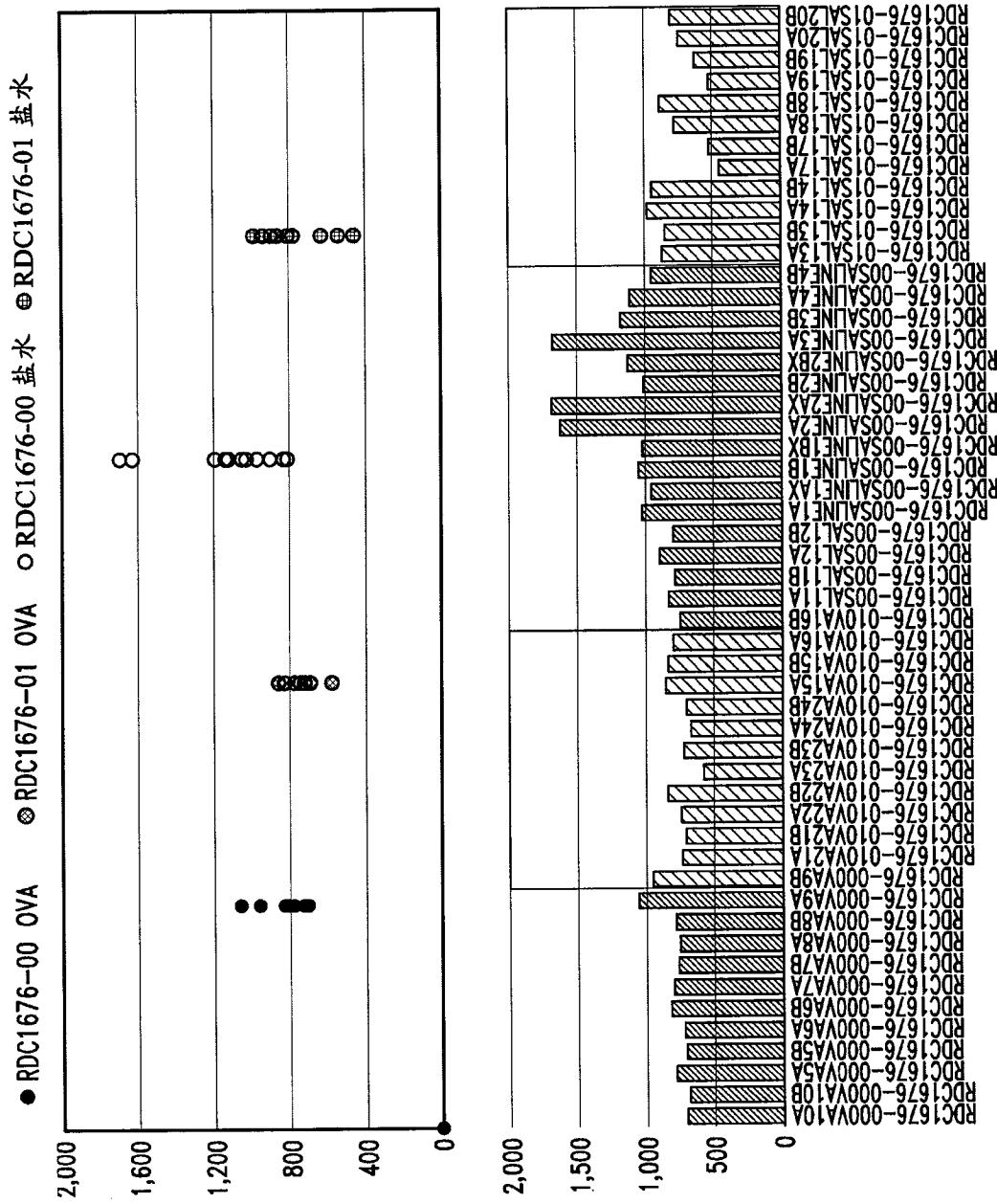


图 57



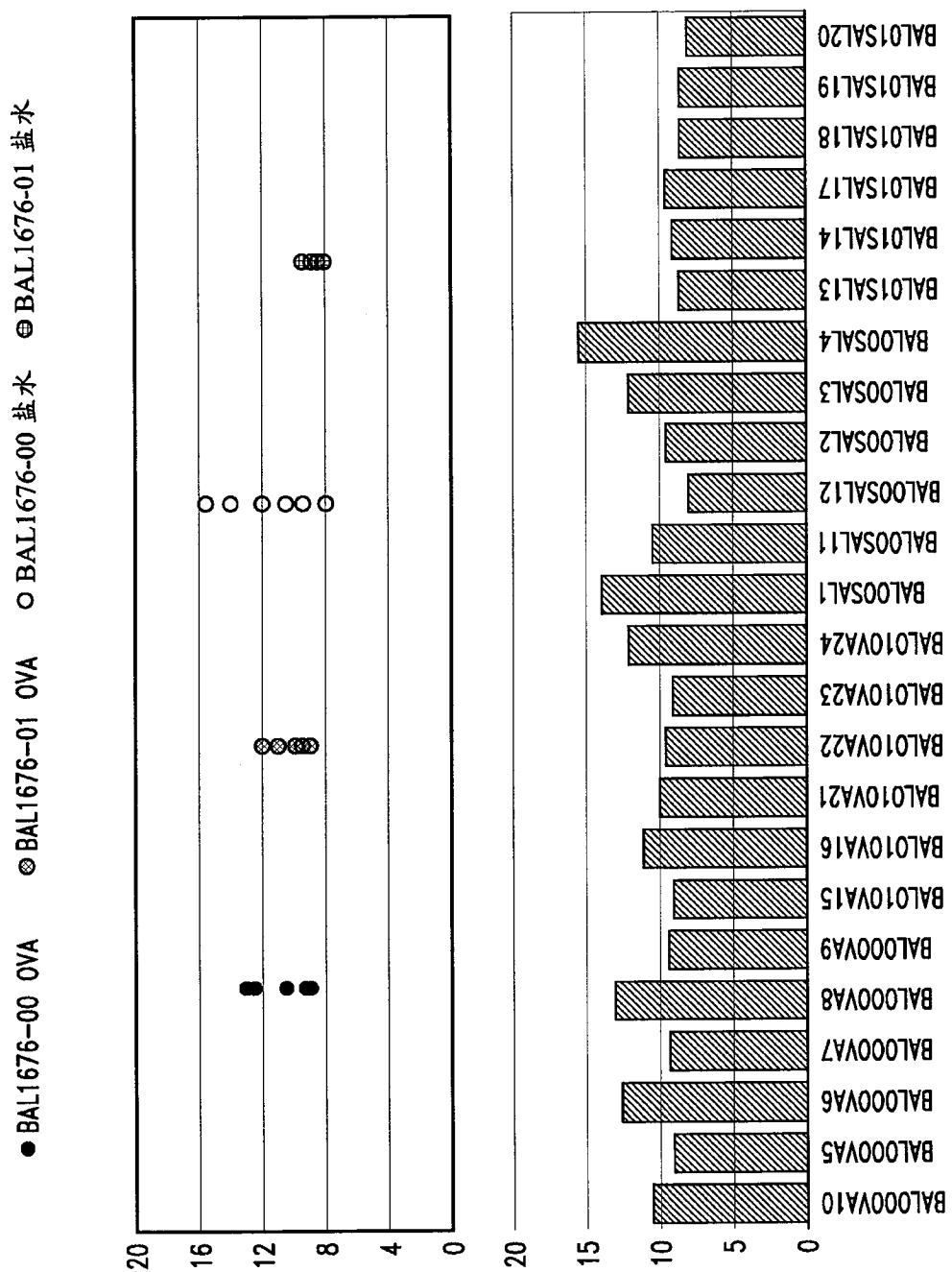


图 59

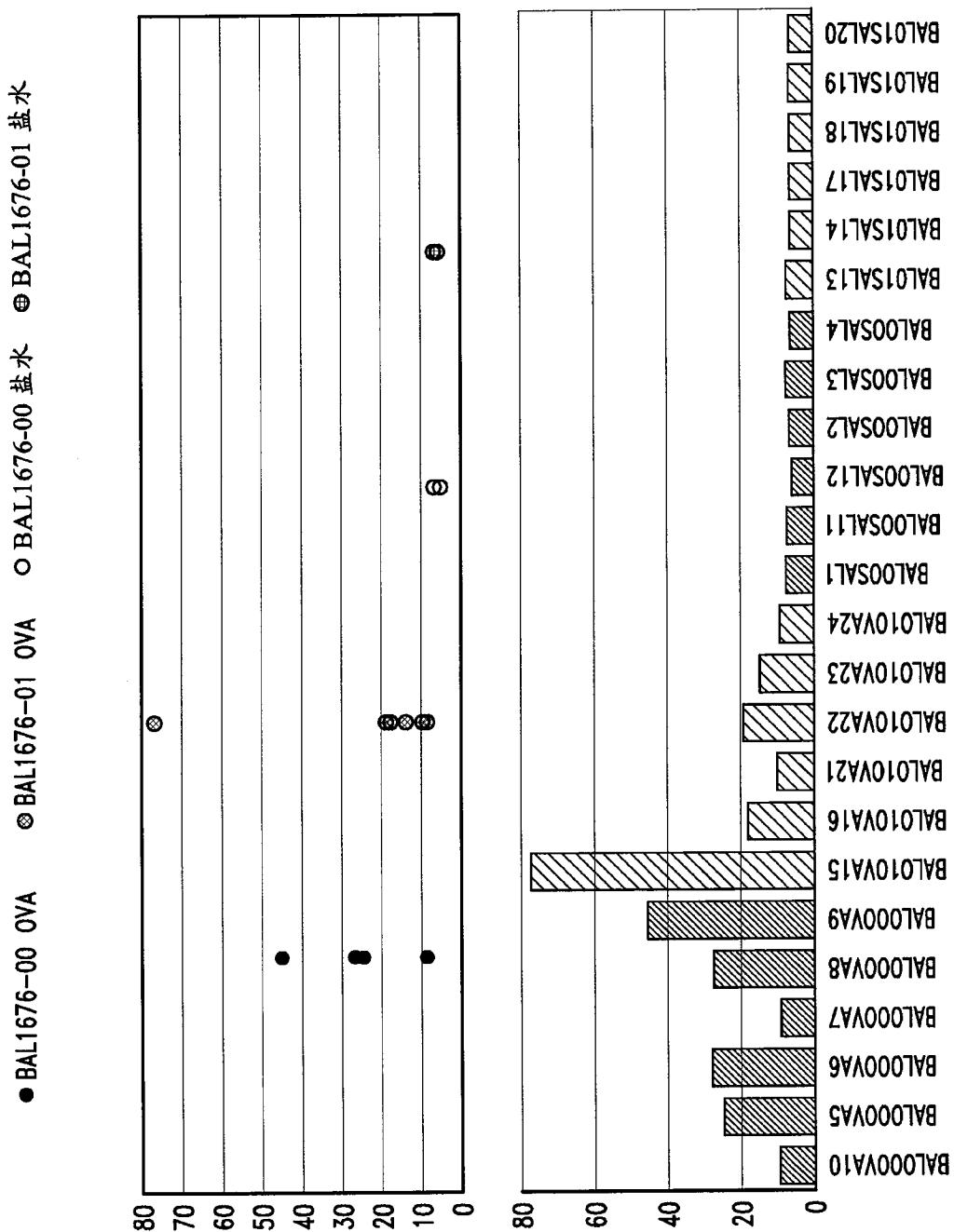


图 60

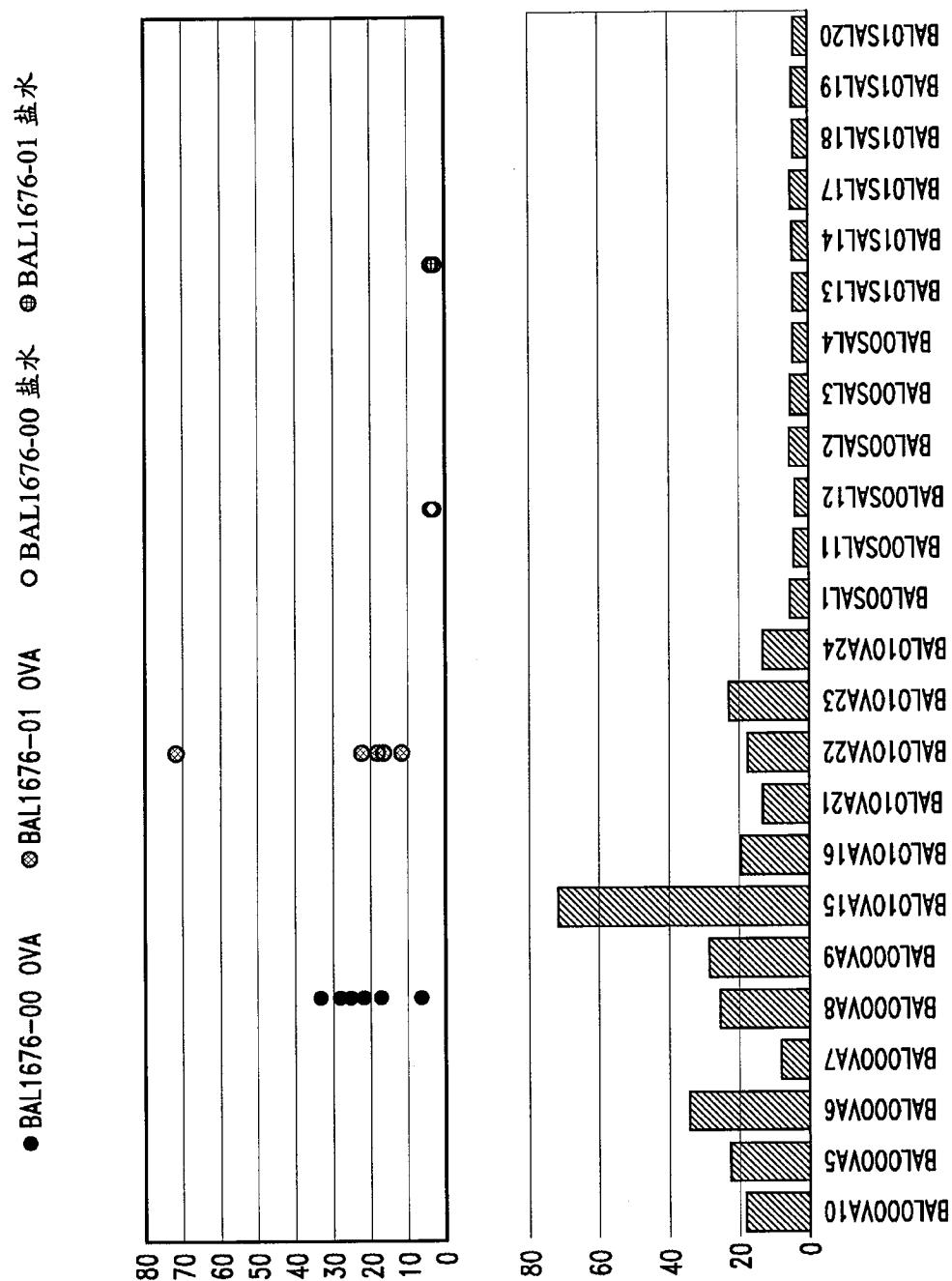


图 61

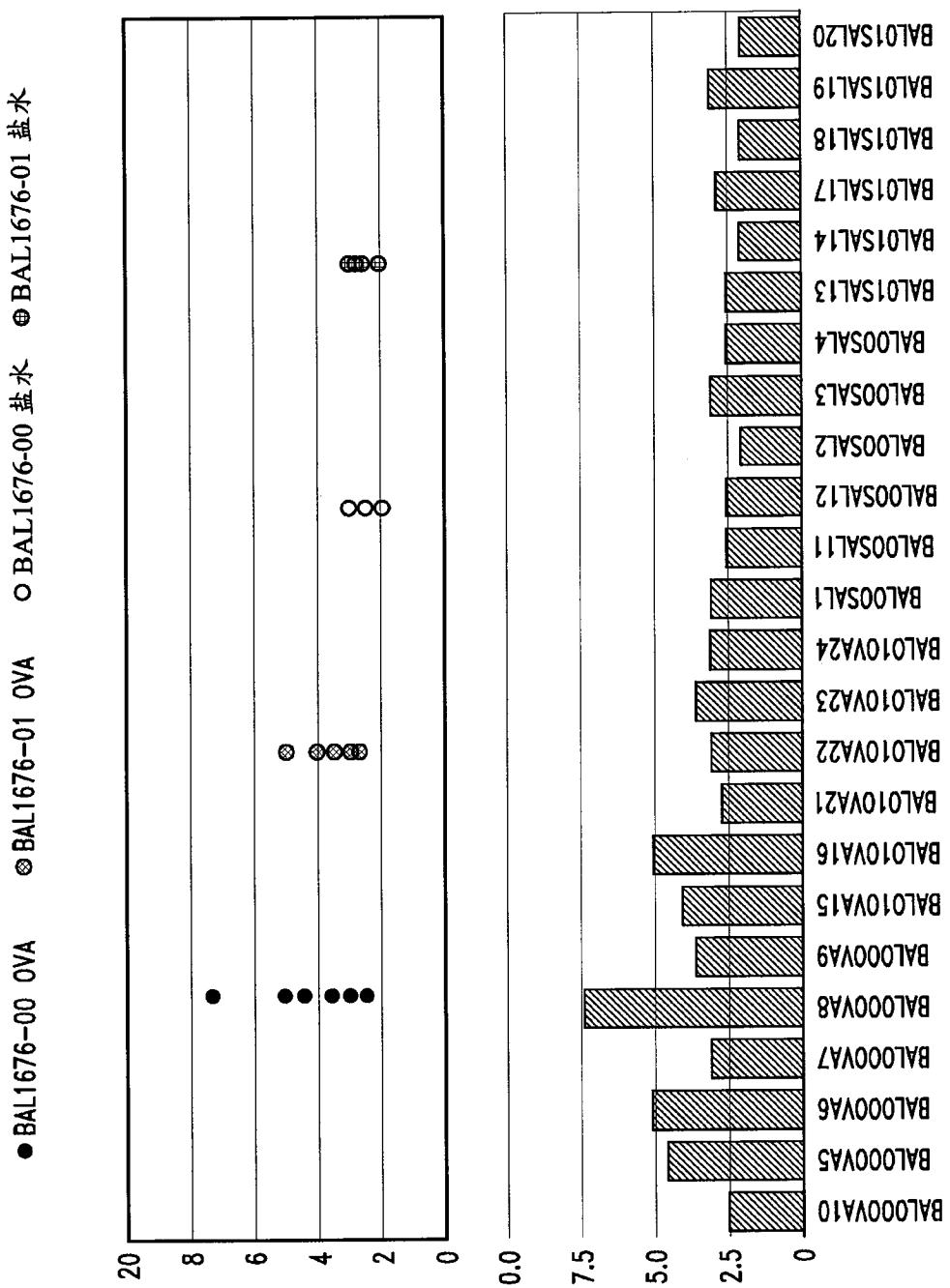


图 62

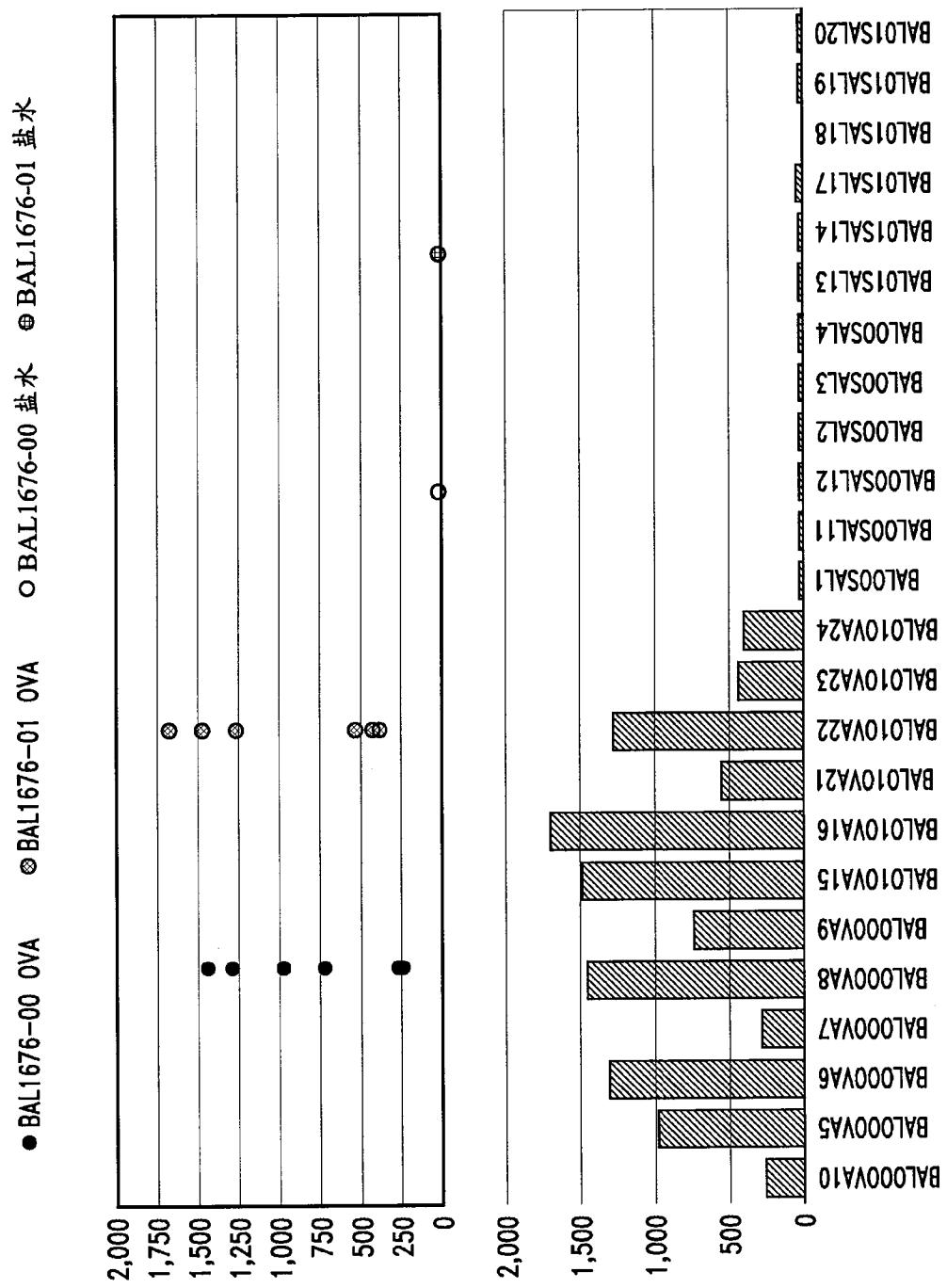


图 63

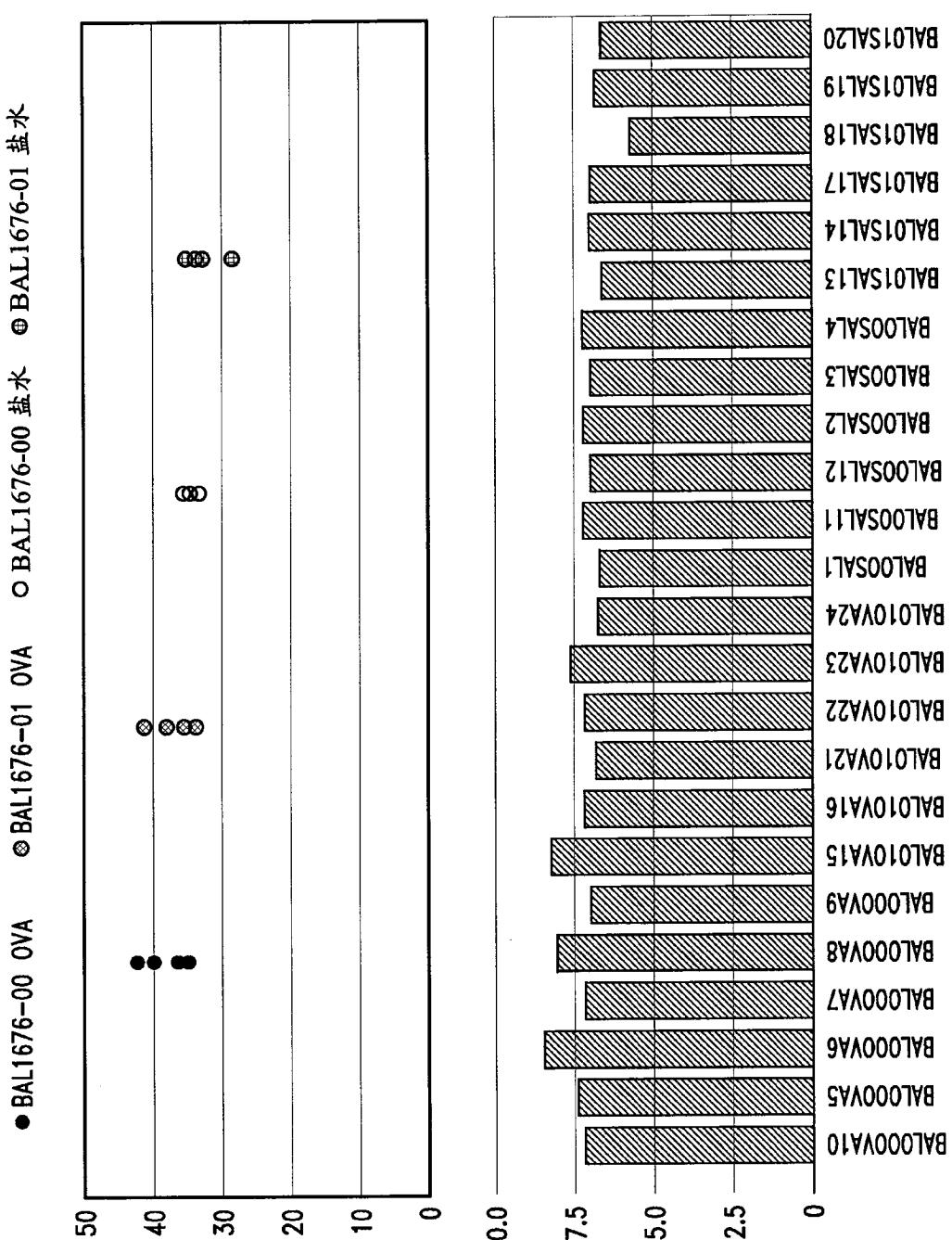


图 64

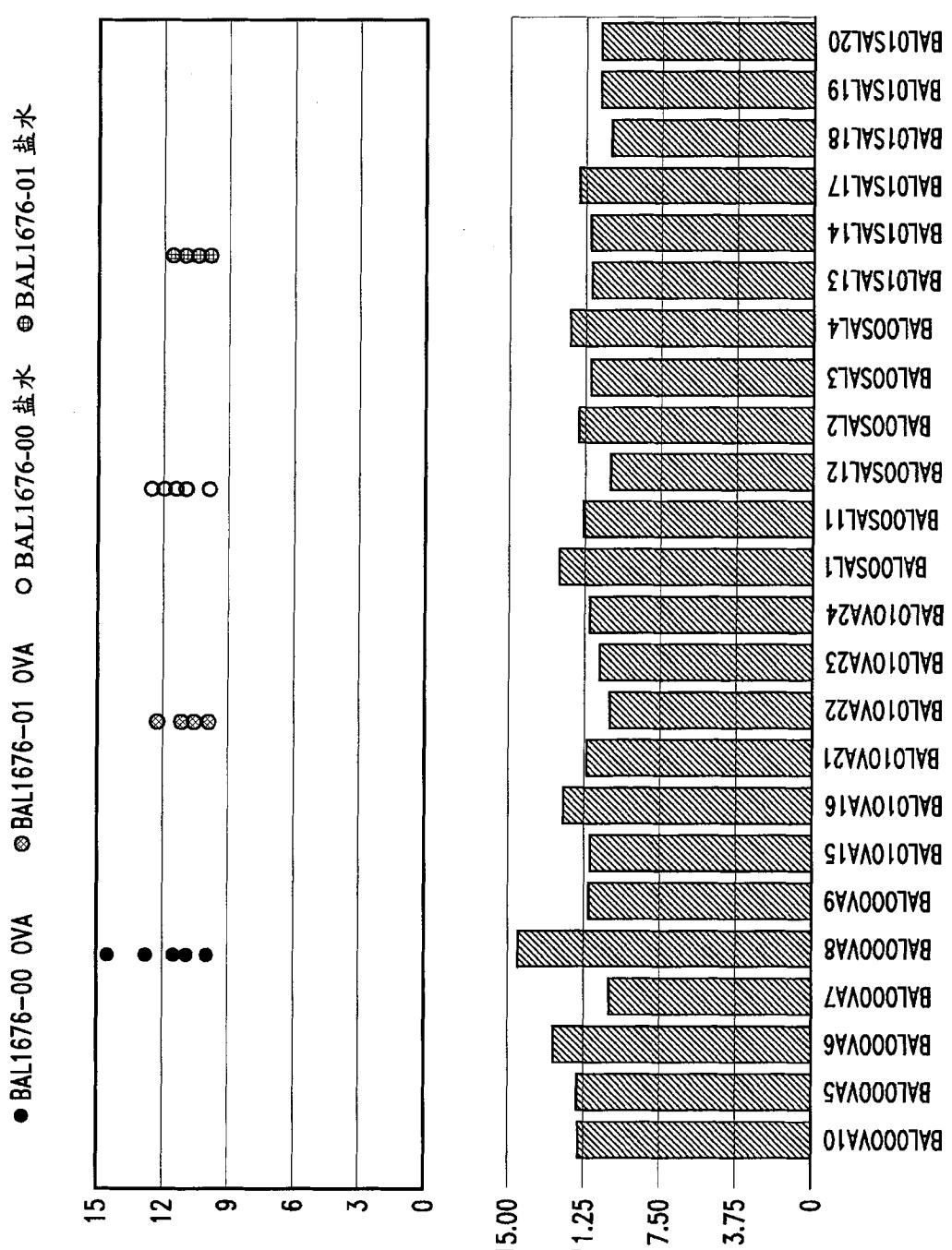


图 65

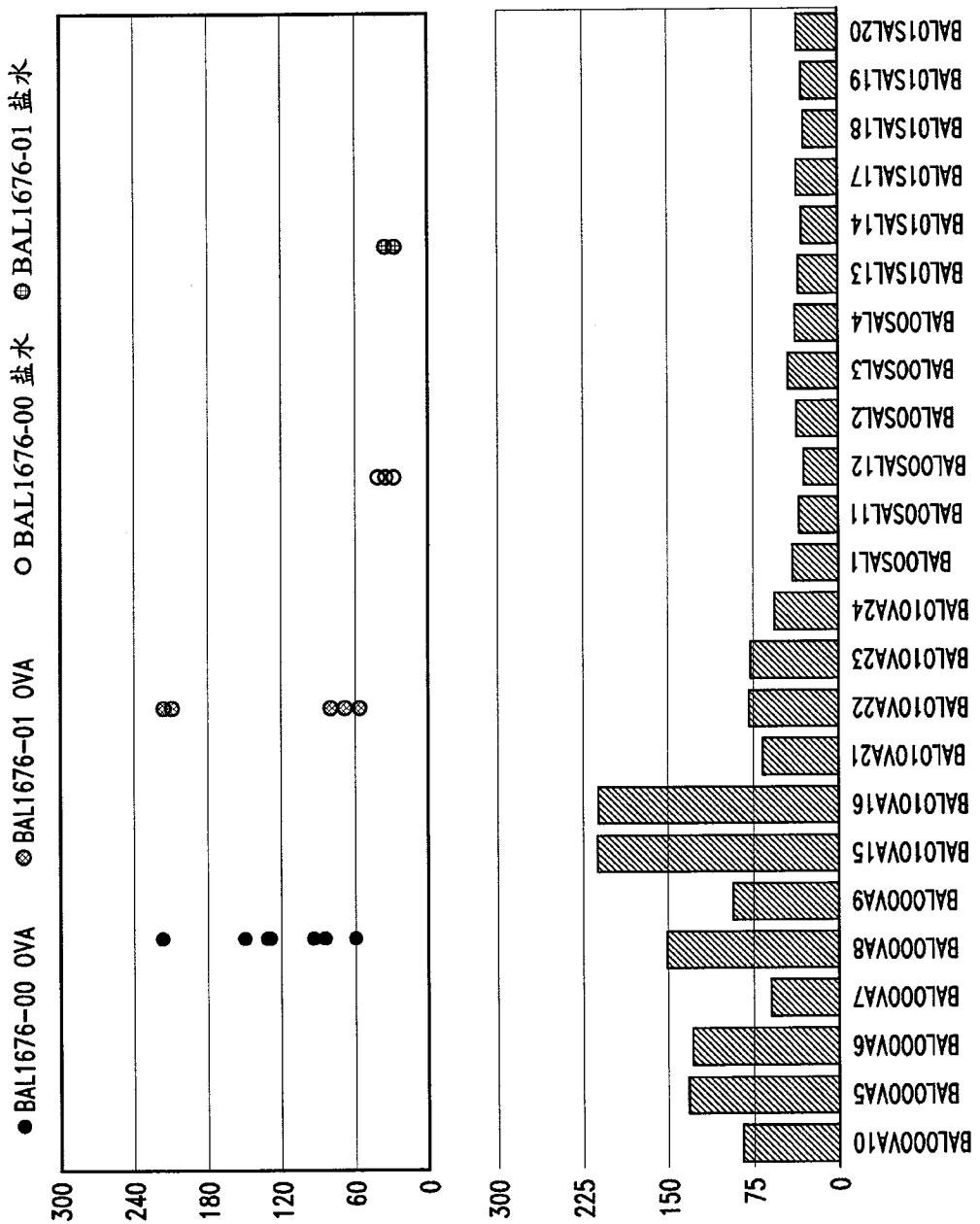


图 66

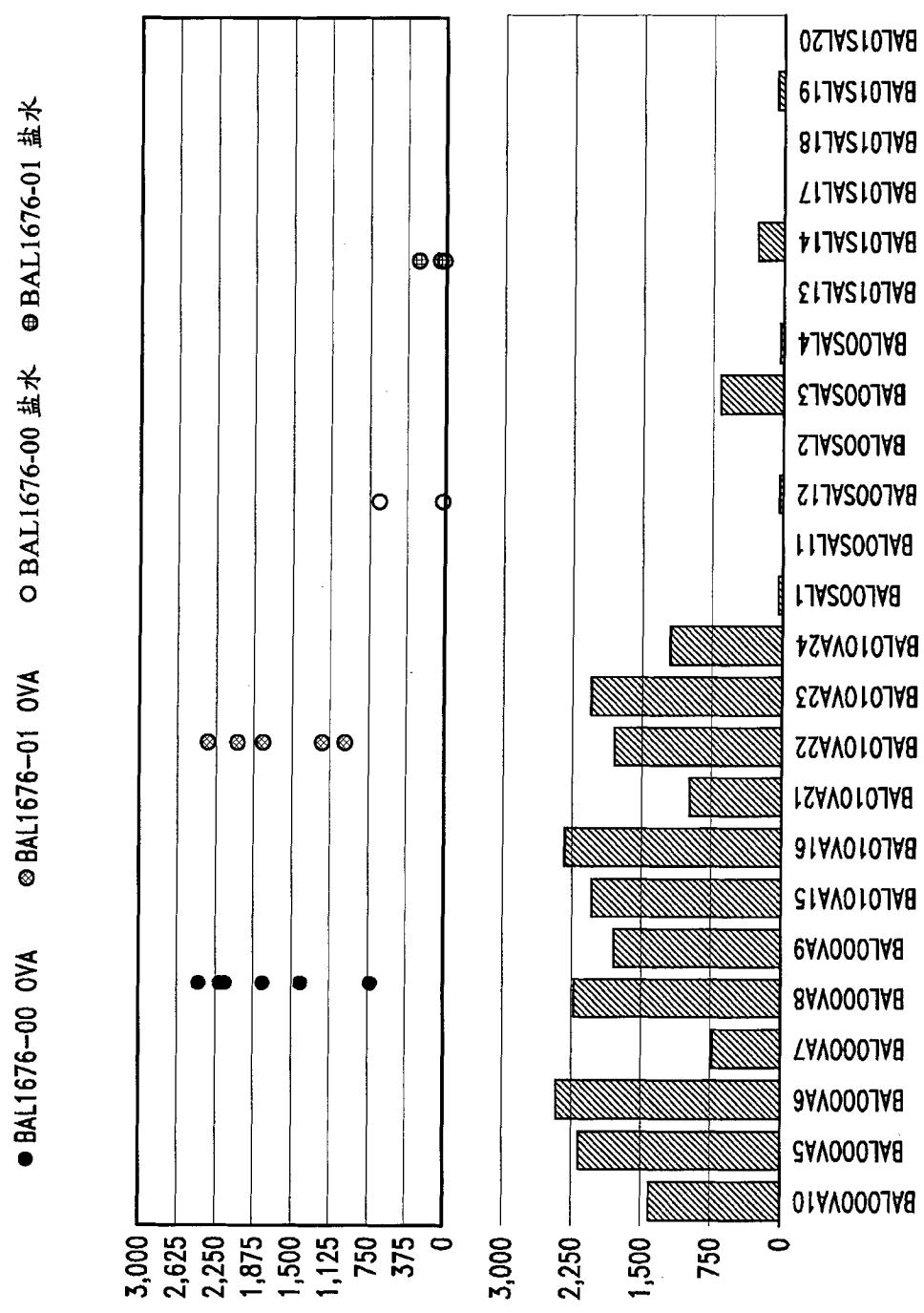


图 67

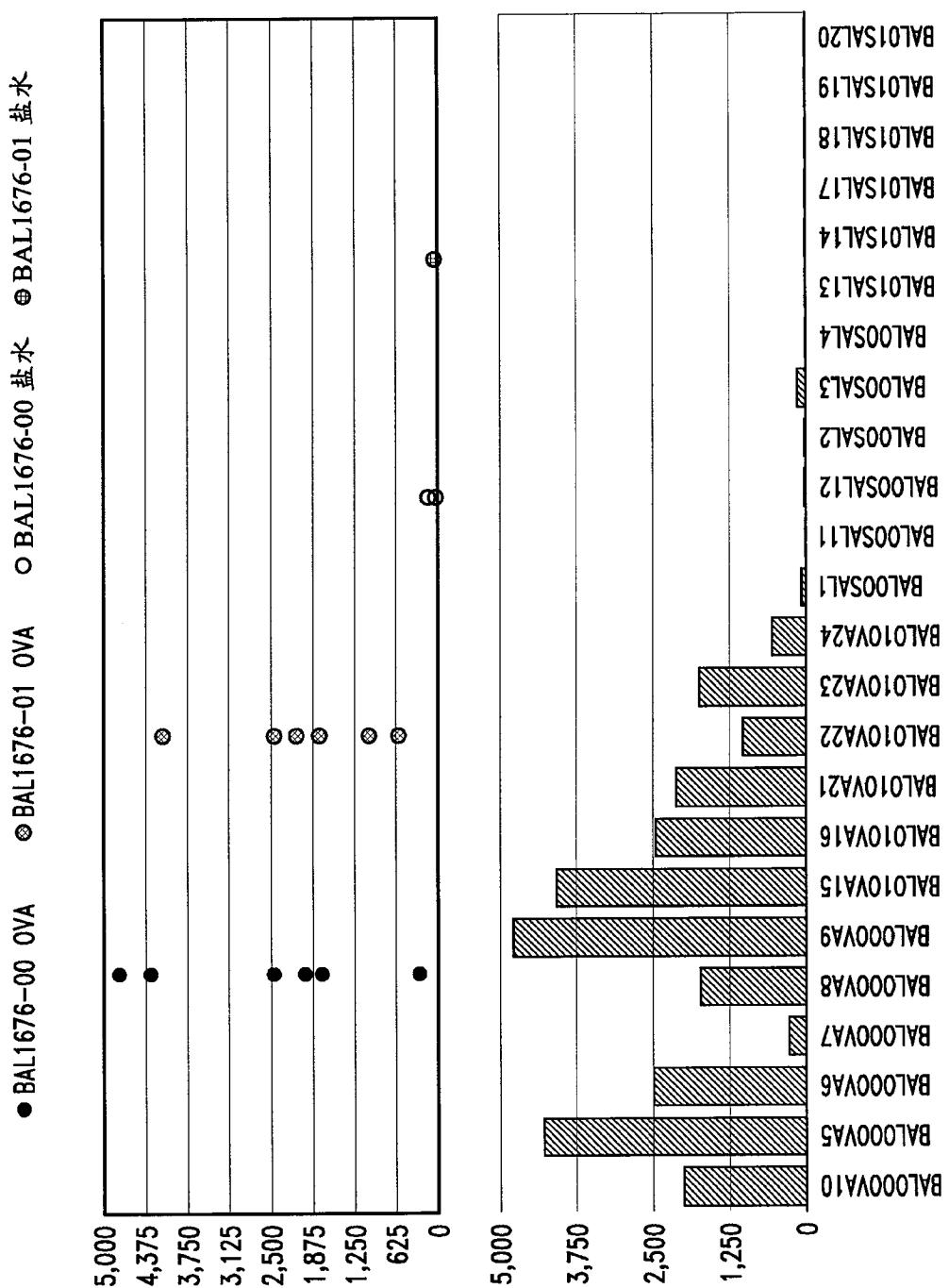


图 68

<p>添加去除的测定步骤</p> <p>传感器板</p>	<p>样品板</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr> <tr><td>A</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>B</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>D</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>F</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>G</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>H</td><td>X</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table> <p>样品：A12</p>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	X											B	X											C	X											D	X											E	X											F	X											G	X											H	X										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																		
A	X																																																																																																												
B	X																																																																																																												
C	X																																																																																																												
D	X																																																																																																												
E	X																																																																																																												
F	X																																																																																																												
G	X																																																																																																												
H	X																																																																																																												
<p>步骤数据设置</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>数据名称</td><td>测定时间</td><td>流速</td><td>类型</td></tr> <tr><td>口 确定的结合</td><td>900</td><td>1000</td><td>结合</td></tr> <tr><td>口 确定的解离</td><td>900</td><td>1000</td><td>解离</td></tr> <tr><td>口 确定的基线没有流动</td><td>600</td><td>0</td><td>基线</td></tr> <tr><td>口 确定的负载没有流动</td><td>900</td><td>0</td><td>负载</td></tr> <tr><td>口 确定的激活</td><td>600</td><td>1000</td><td>激活</td></tr> <tr><td>口 确定的猝灭</td><td>600</td><td>1000</td><td>猝灭</td></tr> <tr><td>口 确定的再生</td><td>30</td><td>1000</td><td>再生</td></tr> <tr><td>口 基线 1</td><td>30</td><td>1000</td><td>基线</td></tr> <tr><td>口 负载</td><td>400</td><td>1000</td><td>负载</td></tr> <tr><td>口 基线 2</td><td>60</td><td>1000</td><td>基线</td></tr> <tr><td>口 缓激肽</td><td>600</td><td>1000</td><td>结合</td></tr> <tr><td>口 解离</td><td>900</td><td>1000</td><td>解离</td></tr> </table>	数据名称	测定时间	流速	类型	口 确定的结合	900	1000	结合	口 确定的解离	900	1000	解离	口 确定的基线没有流动	600	0	基线	口 确定的负载没有流动	900	0	负载	口 确定的激活	600	1000	激活	口 确定的猝灭	600	1000	猝灭	口 确定的再生	30	1000	再生	口 基线 1	30	1000	基线	口 负载	400	1000	负载	口 基线 2	60	1000	基线	口 缓激肽	600	1000	结合	口 解离	900	1000	解离	<p>测定步骤清单</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr><th>测定</th><th>传感器</th><th>样品</th><th>步骤数据</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>第1列</td><td>第1列</td><td>口 确定的再生</td></tr> <tr><td></td><td>第1列</td><td>第1列</td><td>口 基线 1</td></tr> <tr><td></td><td>第1列</td><td>第2列</td><td>口 负载</td></tr> <tr><td></td><td>第1列</td><td>第3列</td><td>口 基线 2</td></tr> <tr><td></td><td>第1列</td><td>第4列</td><td>口 缓激肽</td></tr> <tr><td></td><td>第1列</td><td>第3列</td><td>口 解离</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>样品板设置</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>第1列： 盐水</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>第2列： 在盐水中的受体B2 (50 ug/mL)</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>第3列： A-D rev盐水； E-H 盐水</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>第4列： A-D 在rev盐水中的125 mM、12.5 uM的缓激肽</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>E-H 在盐水中的1.25 mM、125 uM、12.5 uM的缓激肽</td></tr> </tbody> </table> <p>① 移动</p> <p>添加 <input type="checkbox"/> 去除 <input type="checkbox"/> 时间 (秒) , 流速 (rpm)</p>	测定	传感器	样品	步骤数据	1	第1列	第1列	口 确定的再生		第1列	第1列	口 基线 1		第1列	第2列	口 负载		第1列	第3列	口 基线 2		第1列	第4列	口 缓激肽		第1列	第3列	口 解离				样品板设置				第1列： 盐水				第2列： 在盐水中的受体B2 (50 ug/mL)				第3列： A-D rev盐水； E-H 盐水				第4列： A-D 在rev盐水中的125 mM、12.5 uM的缓激肽				E-H 在盐水中的1.25 mM、125 uM、12.5 uM的缓激肽				
数据名称	测定时间	流速	类型																																																																																																										
口 确定的结合	900	1000	结合																																																																																																										
口 确定的解离	900	1000	解离																																																																																																										
口 确定的基线没有流动	600	0	基线																																																																																																										
口 确定的负载没有流动	900	0	负载																																																																																																										
口 确定的激活	600	1000	激活																																																																																																										
口 确定的猝灭	600	1000	猝灭																																																																																																										
口 确定的再生	30	1000	再生																																																																																																										
口 基线 1	30	1000	基线																																																																																																										
口 负载	400	1000	负载																																																																																																										
口 基线 2	60	1000	基线																																																																																																										
口 缓激肽	600	1000	结合																																																																																																										
口 解离	900	1000	解离																																																																																																										
测定	传感器	样品	步骤数据																																																																																																										
1	第1列	第1列	口 确定的再生																																																																																																										
	第1列	第1列	口 基线 1																																																																																																										
	第1列	第2列	口 负载																																																																																																										
	第1列	第3列	口 基线 2																																																																																																										
	第1列	第4列	口 缓激肽																																																																																																										
	第1列	第3列	口 解离																																																																																																										
			样品板设置																																																																																																										
			第1列： 盐水																																																																																																										
			第2列： 在盐水中的受体B2 (50 ug/mL)																																																																																																										
			第3列： A-D rev盐水； E-H 盐水																																																																																																										
			第4列： A-D 在rev盐水中的125 mM、12.5 uM的缓激肽																																																																																																										
			E-H 在盐水中的1.25 mM、125 uM、12.5 uM的缓激肽																																																																																																										

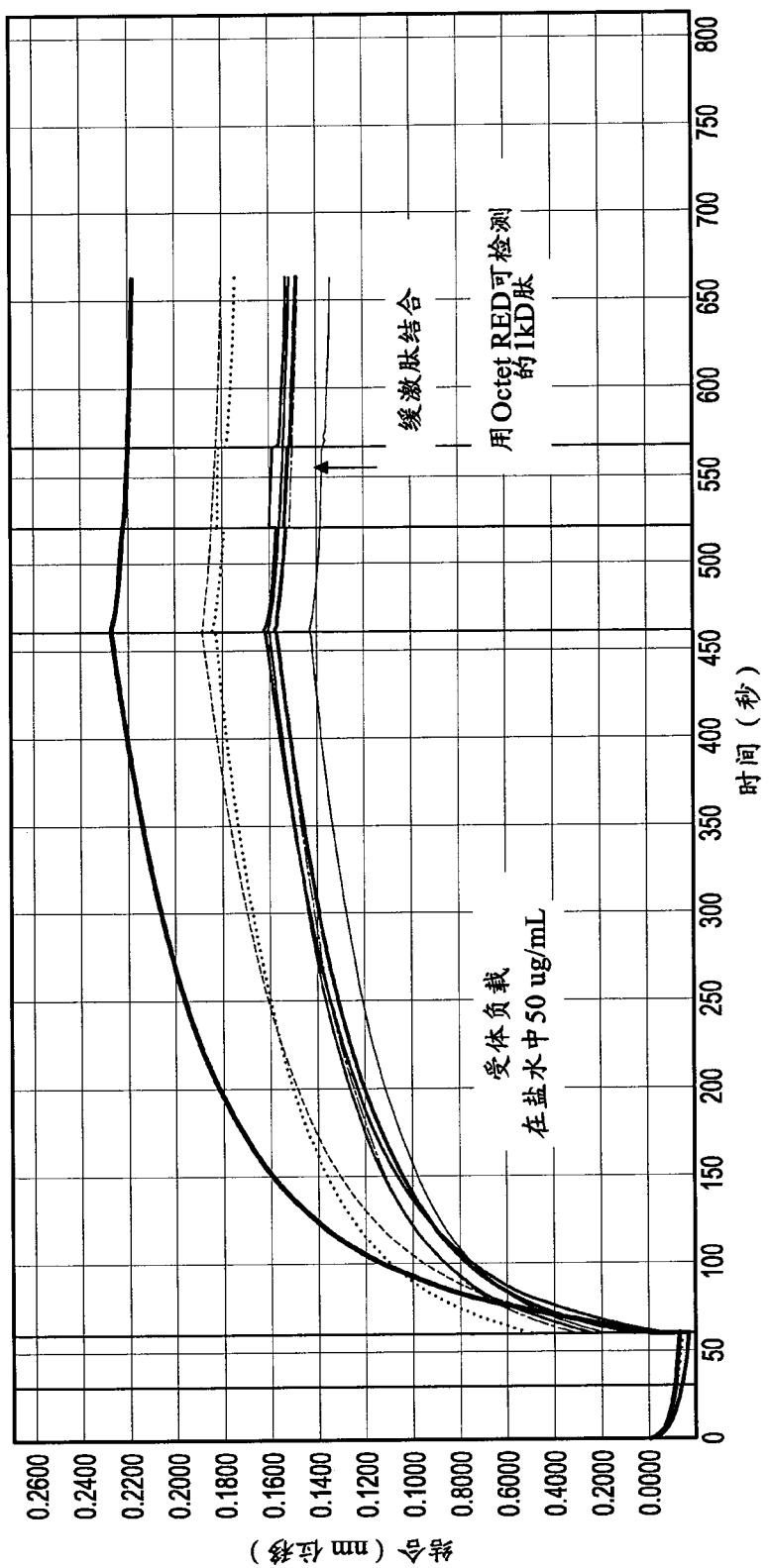


图 70

图 71

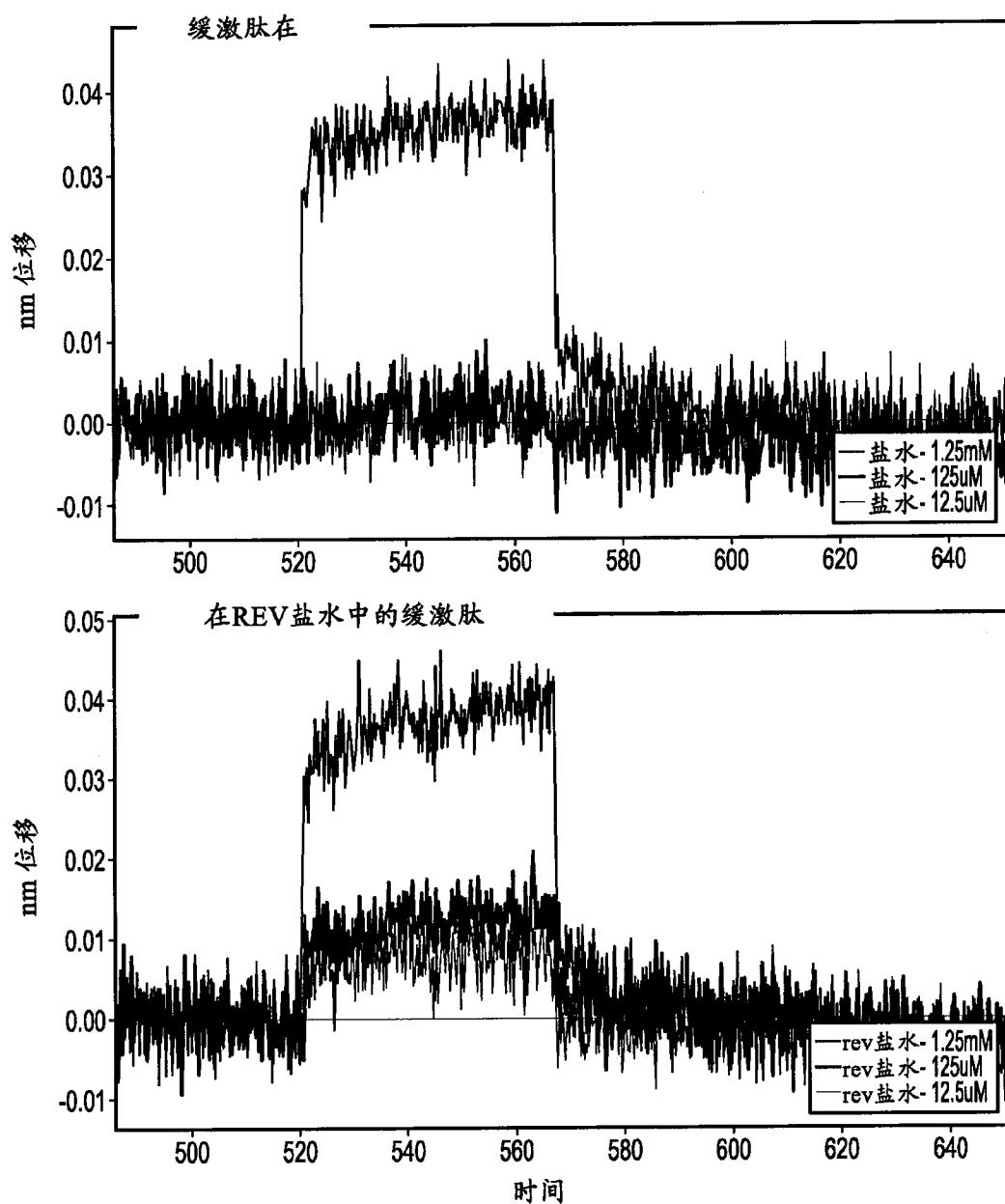


图 72

图 73

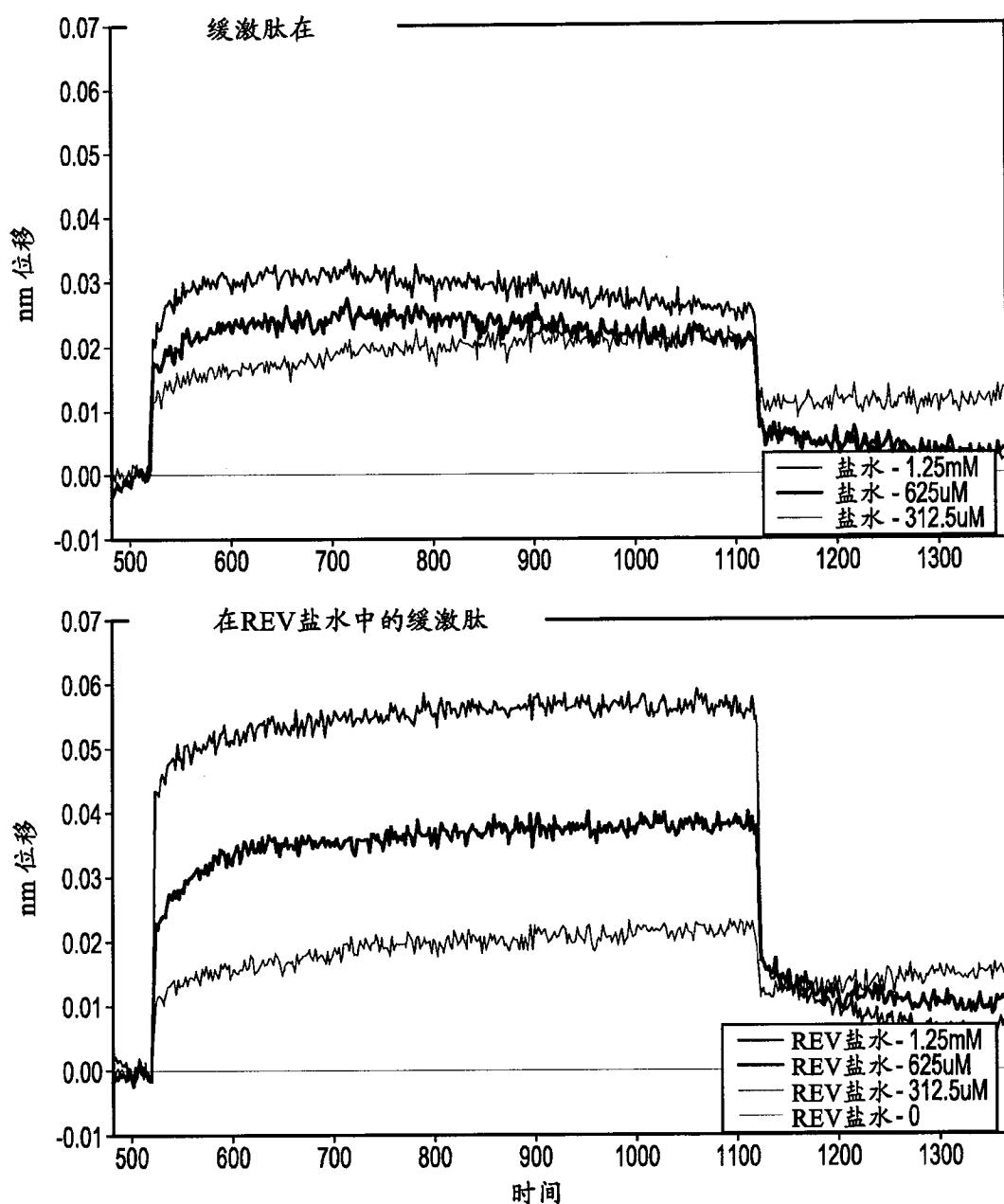
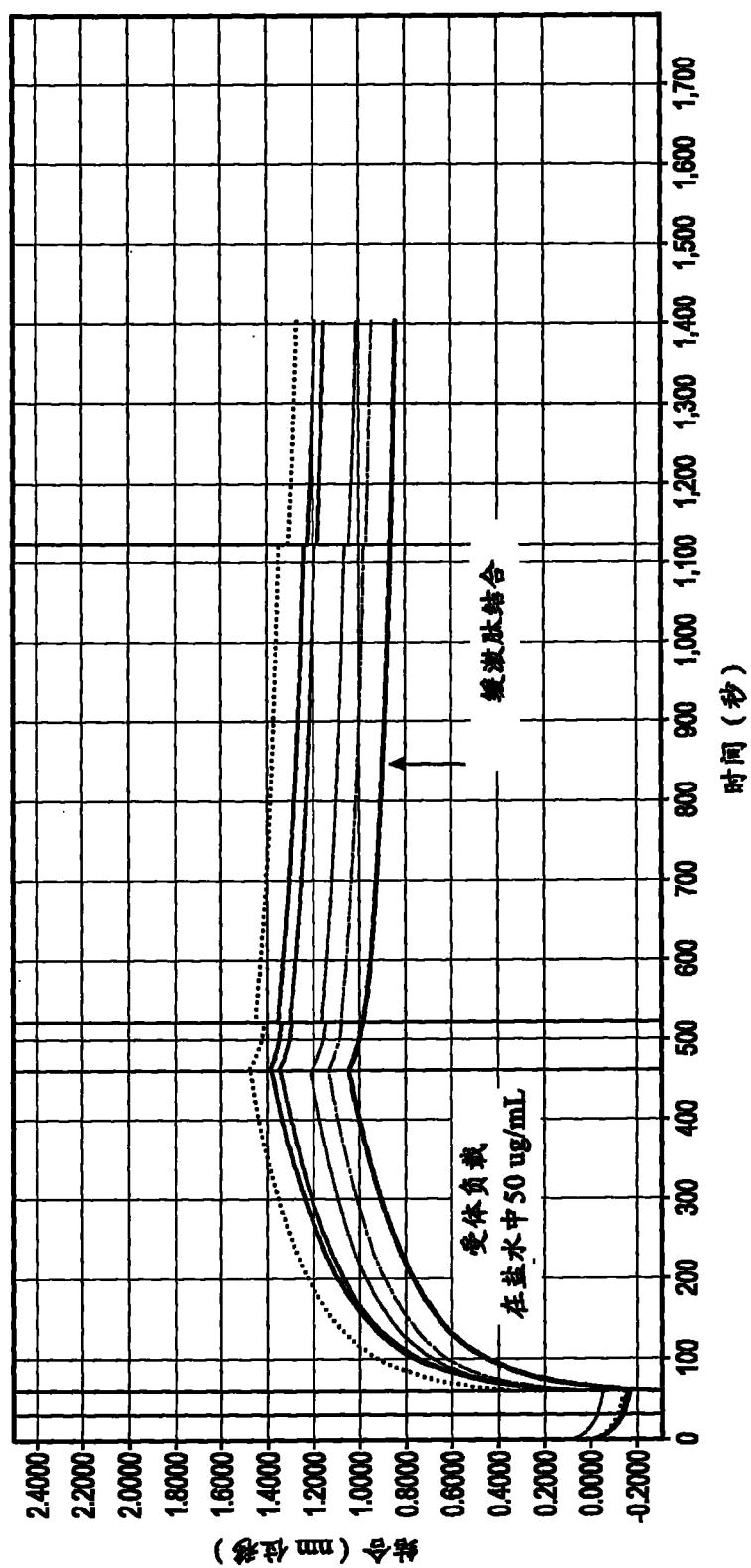


图 74



.....传感器 A —— 传感器 B —— 传感器 C —— 传感器 D —— 传感器 E —— 传感器 F —— 传感器 G —— 传感器 H

图 75

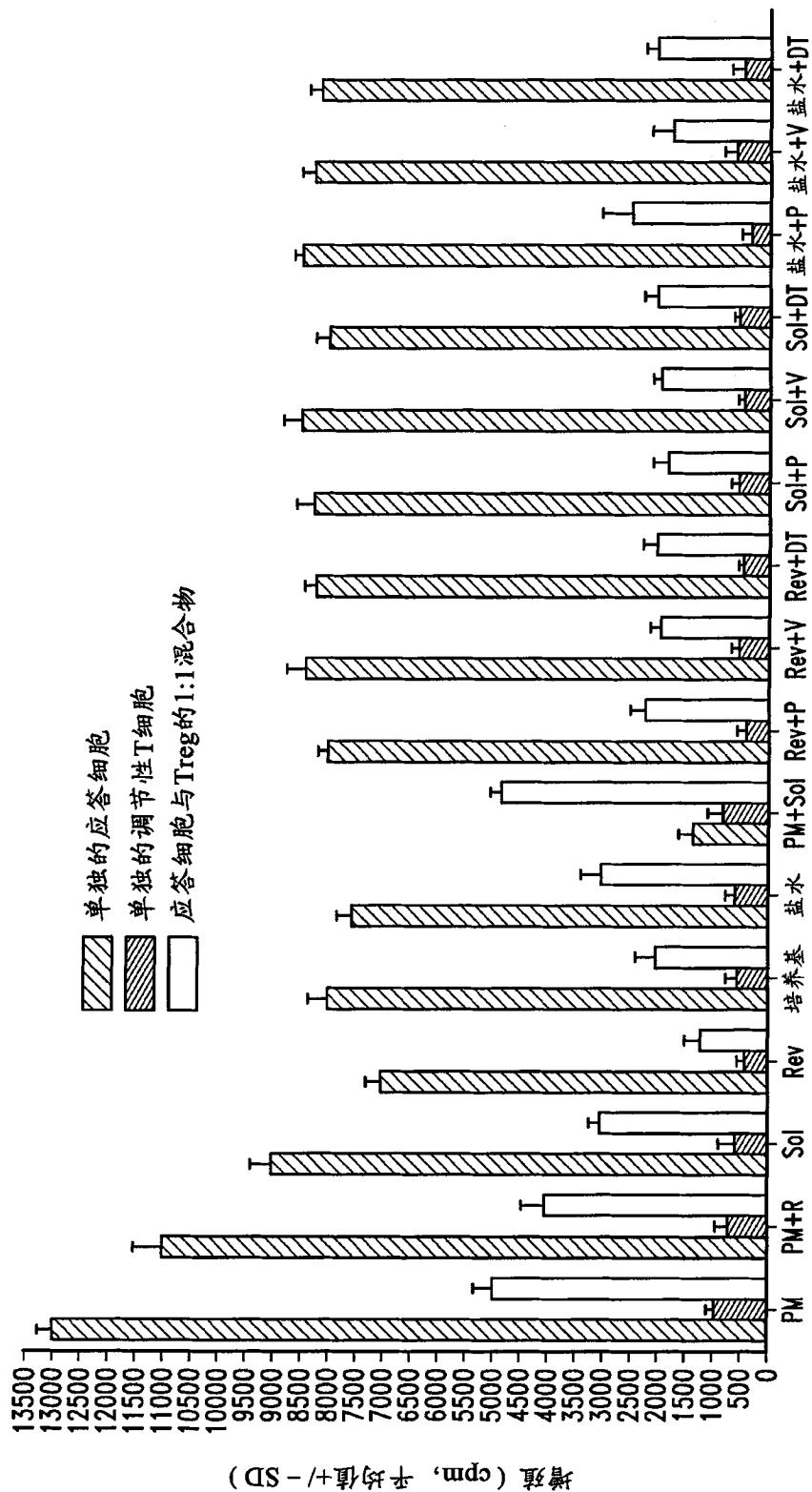


图 76

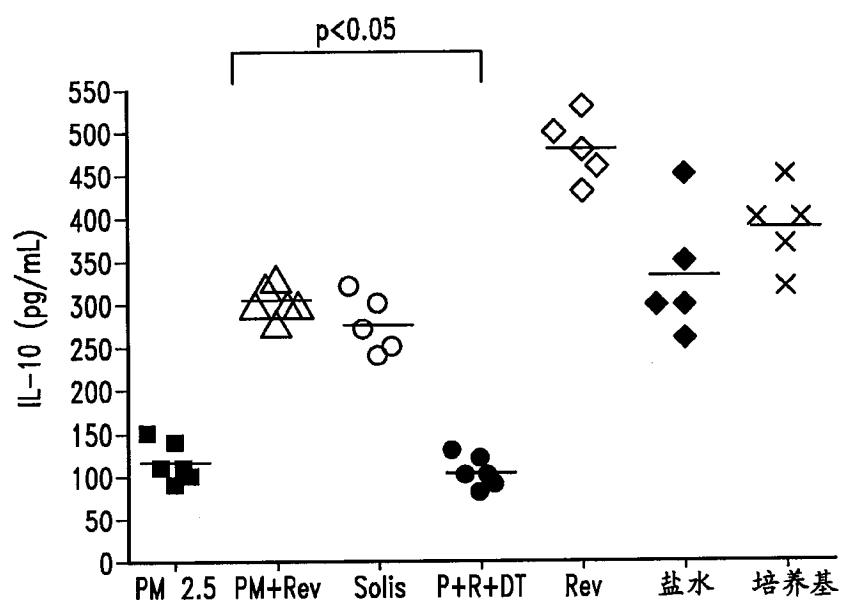


图 77

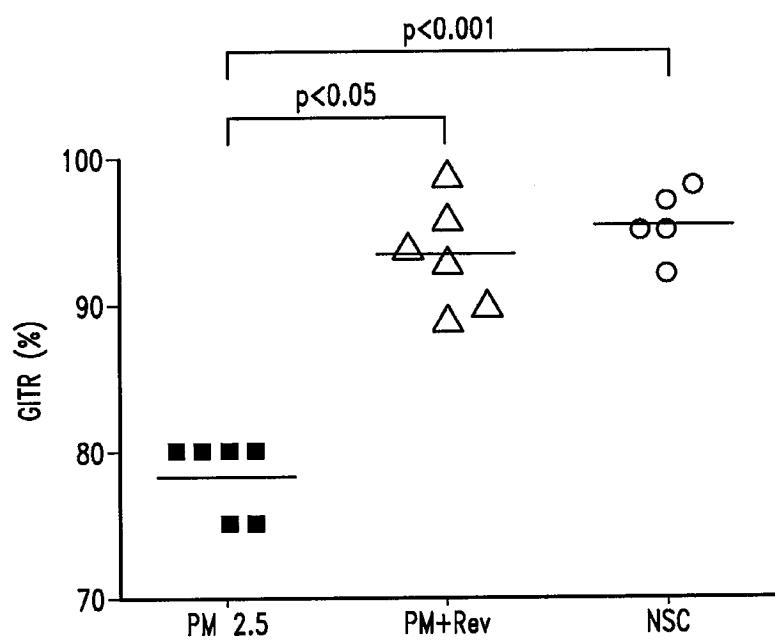


图 78

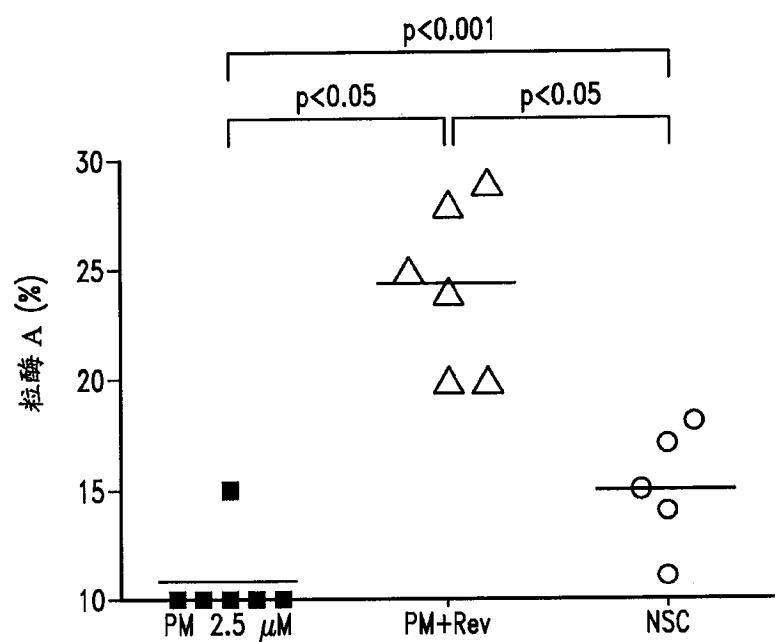


图 79

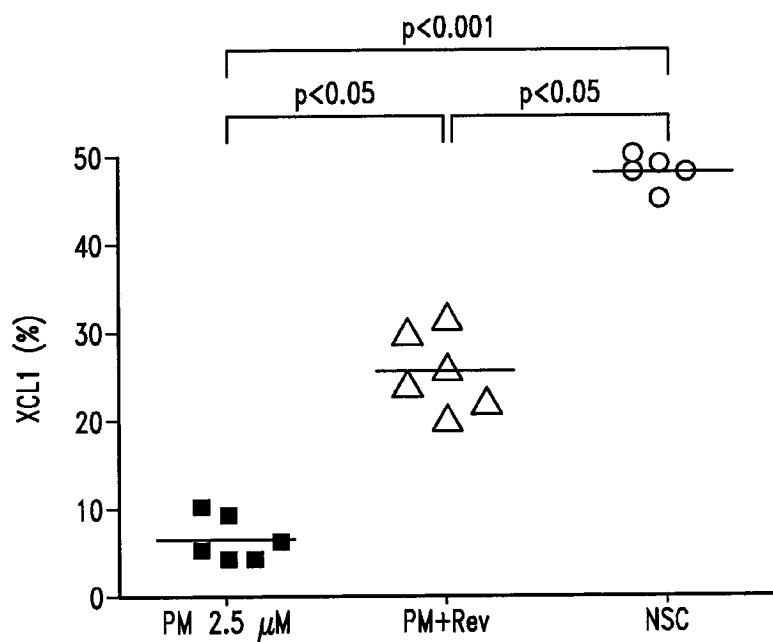


图 80

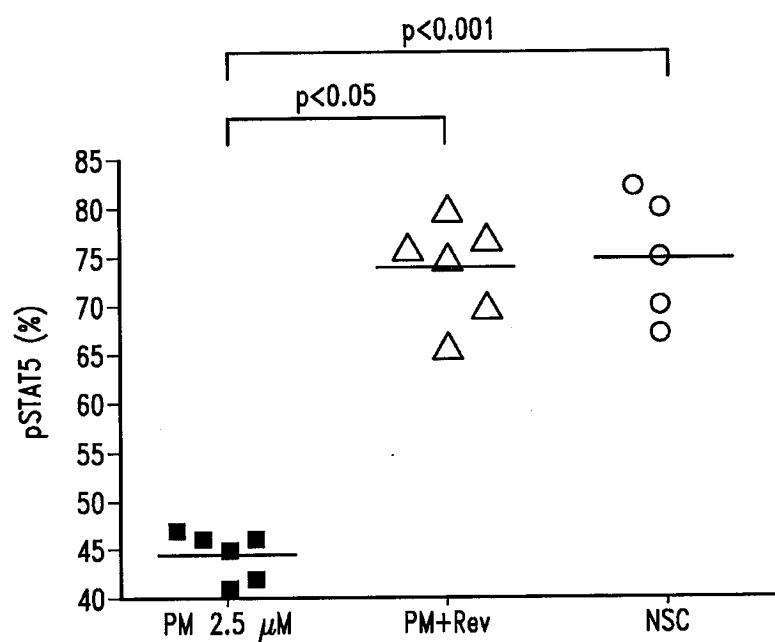


图 81

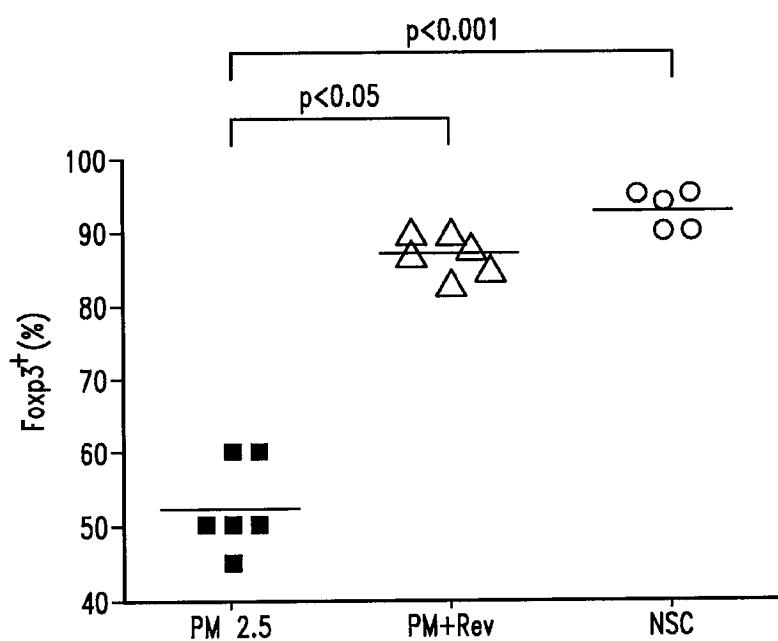


图 82

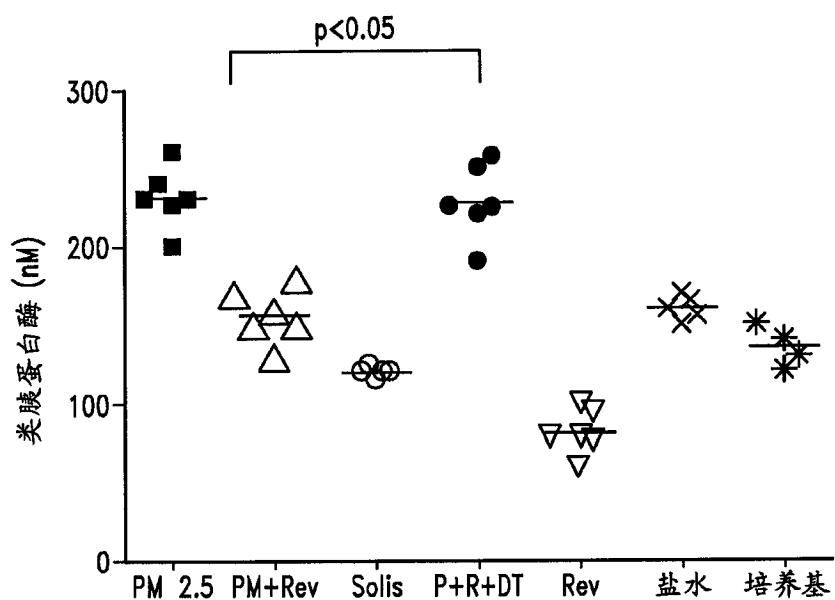


图 83

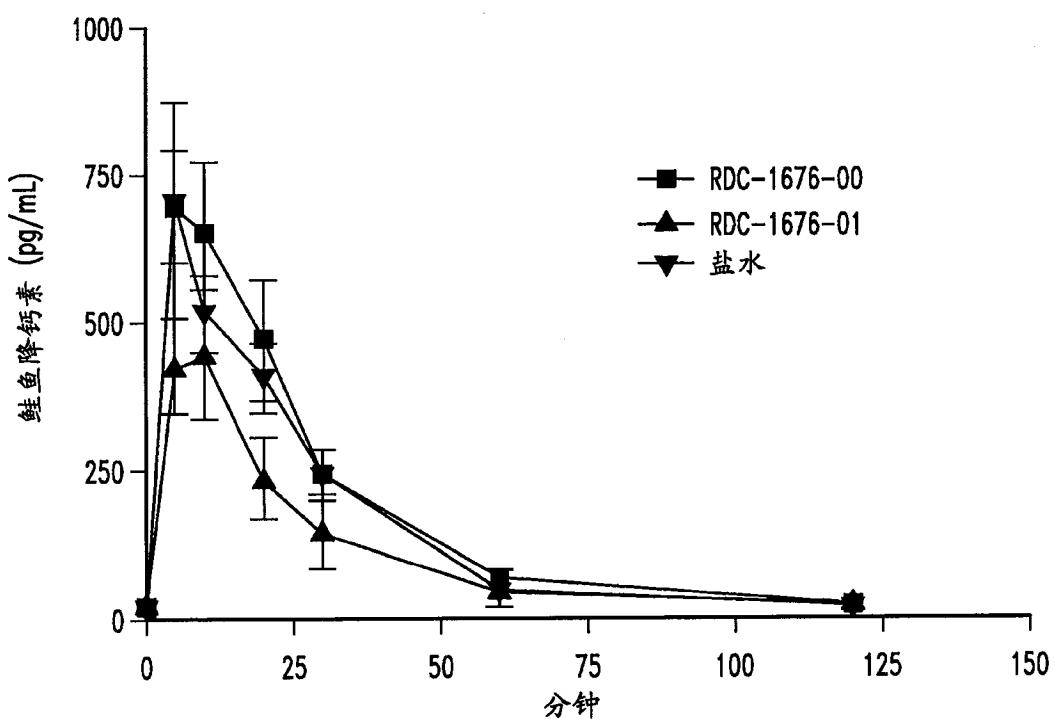


图 84

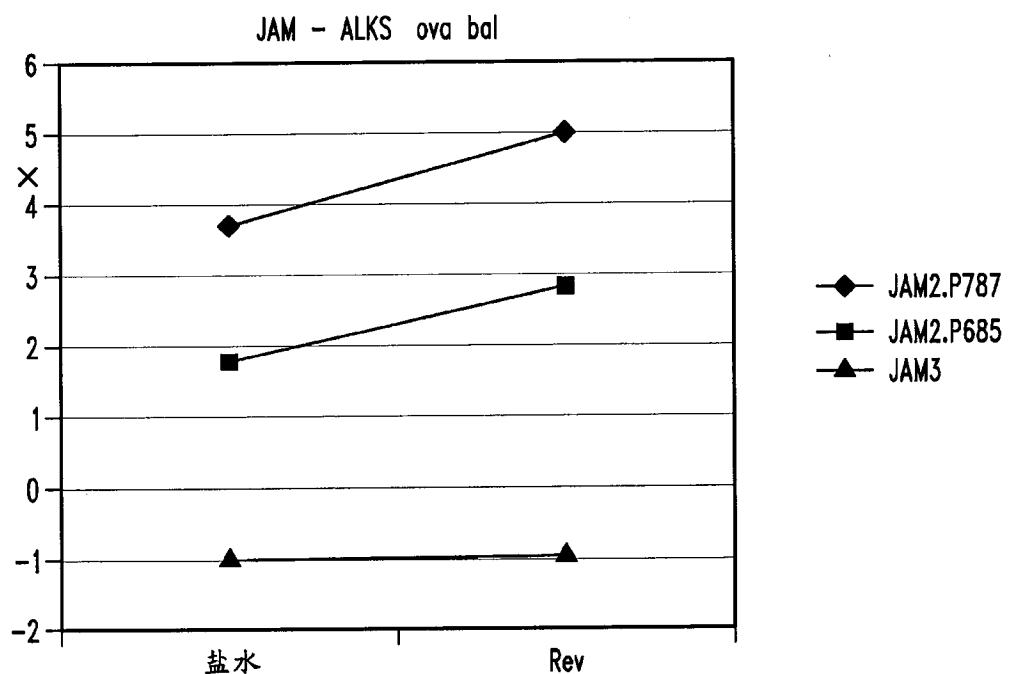


图 85

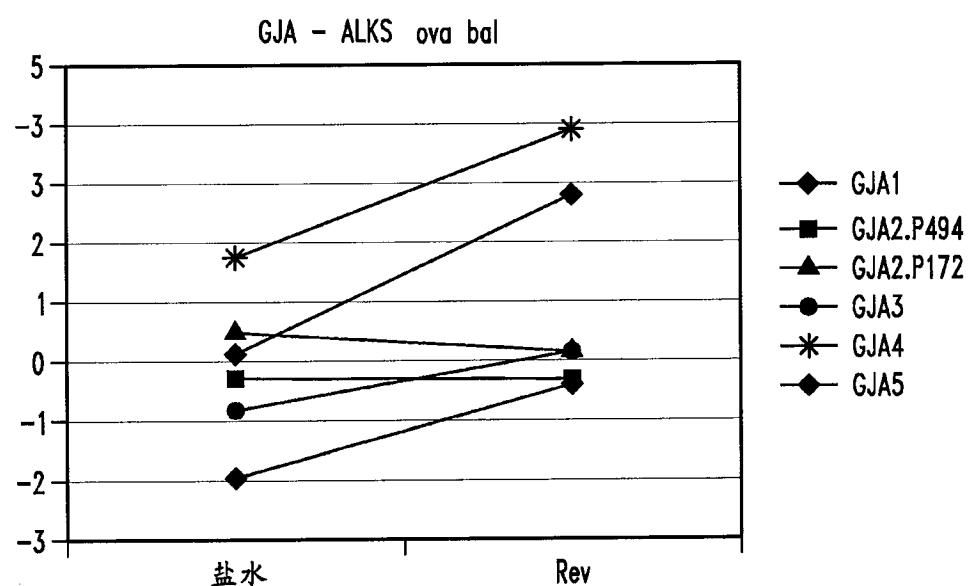


图 86

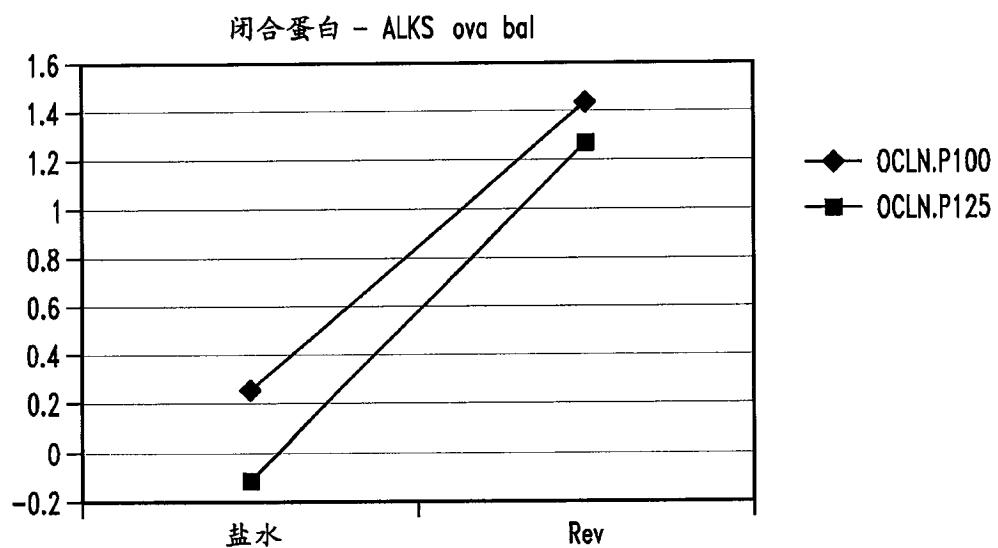


图 87

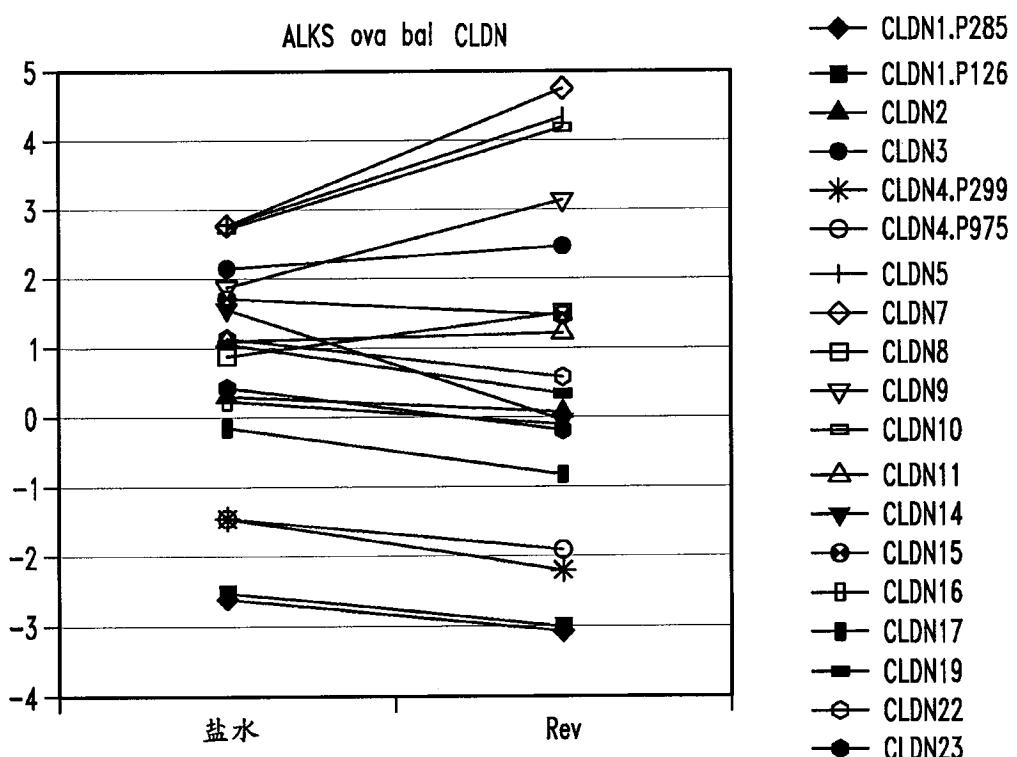


图 88

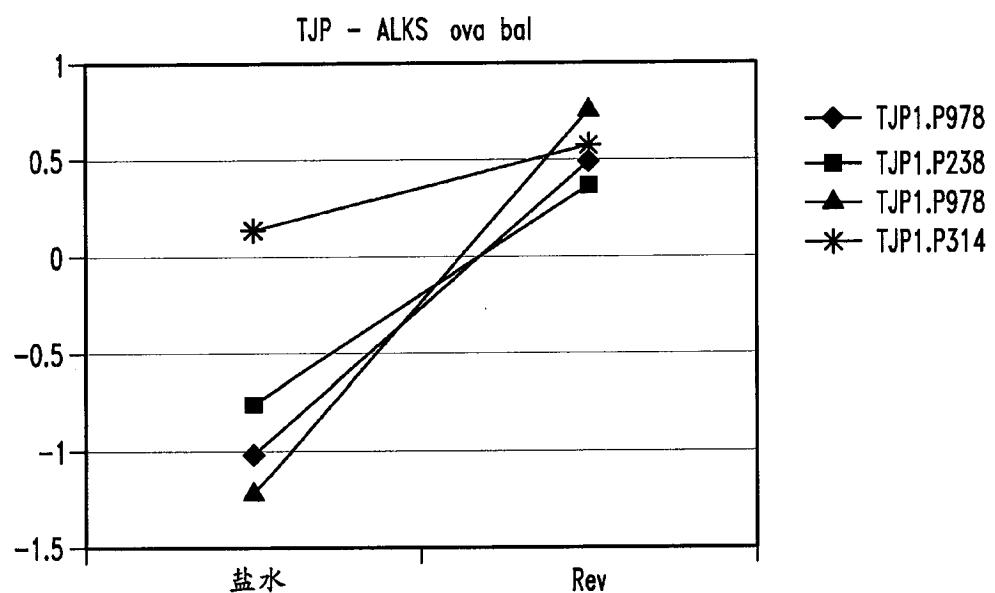


图 89

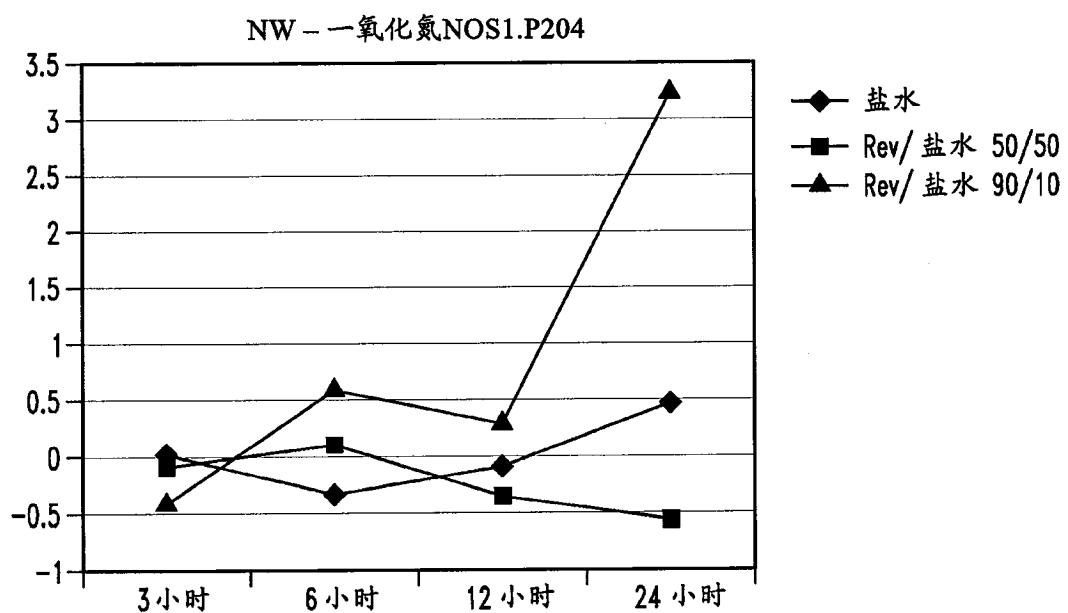


图 90

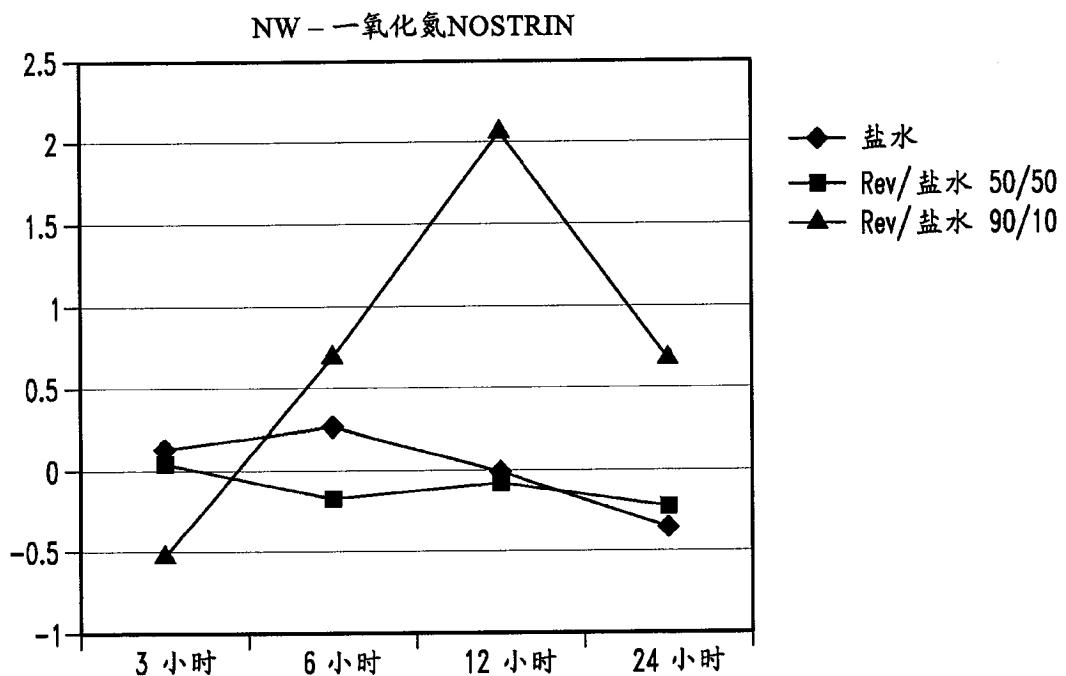


图 91

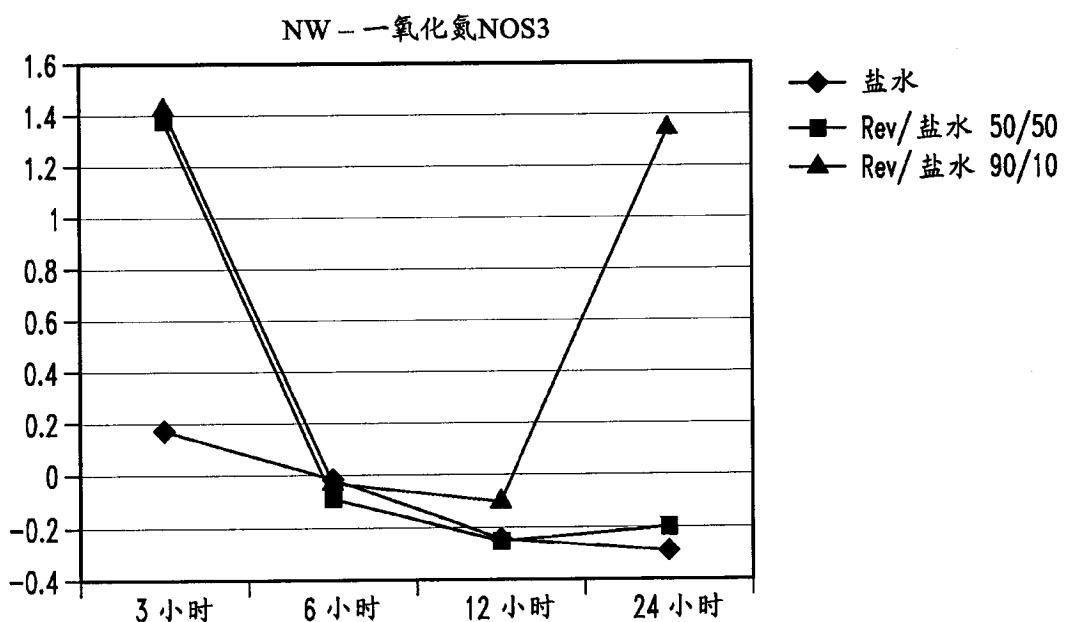


图 92

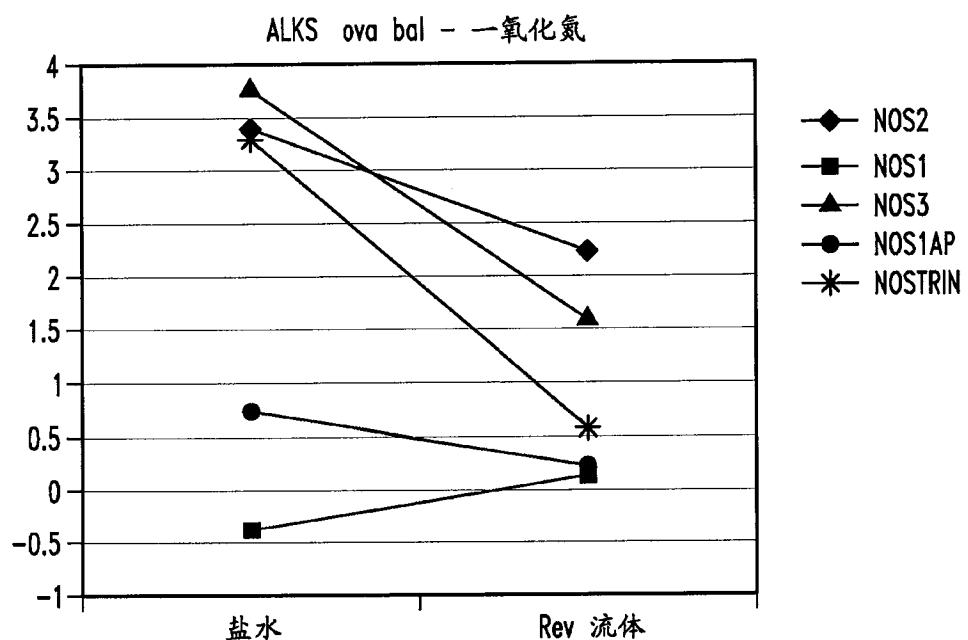


图 93

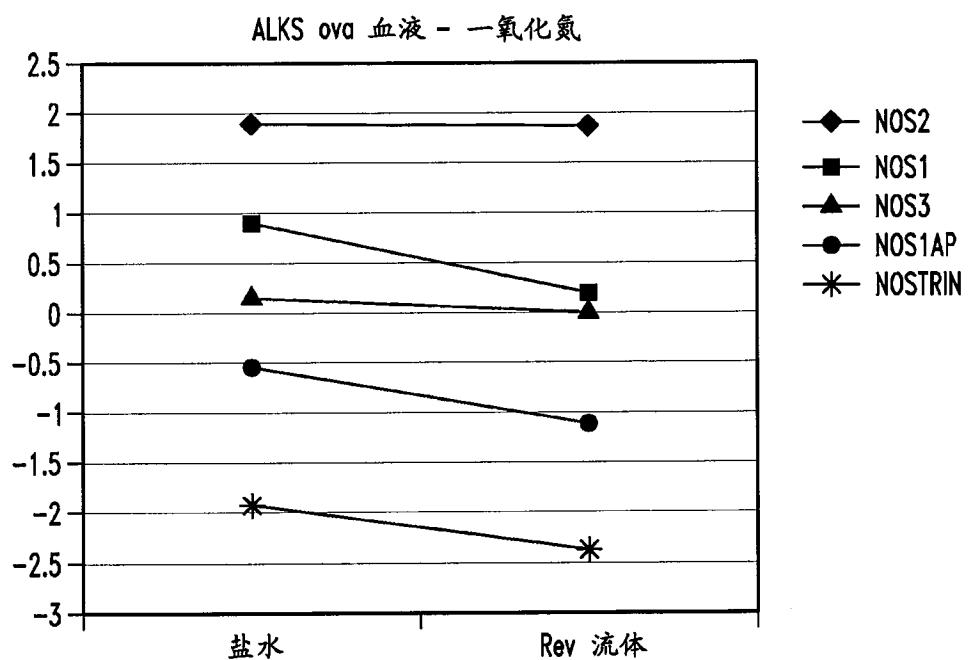


图 94

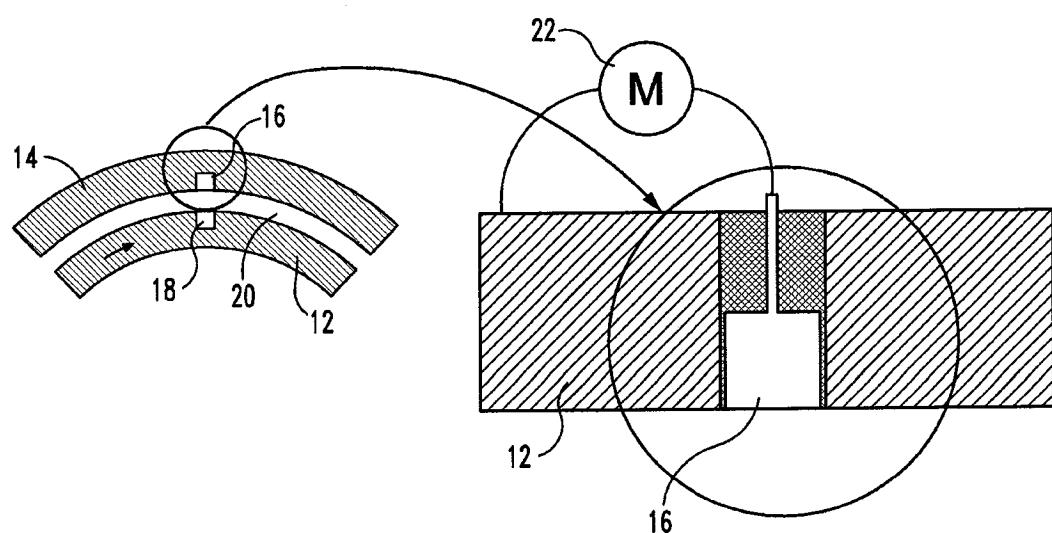


图 95

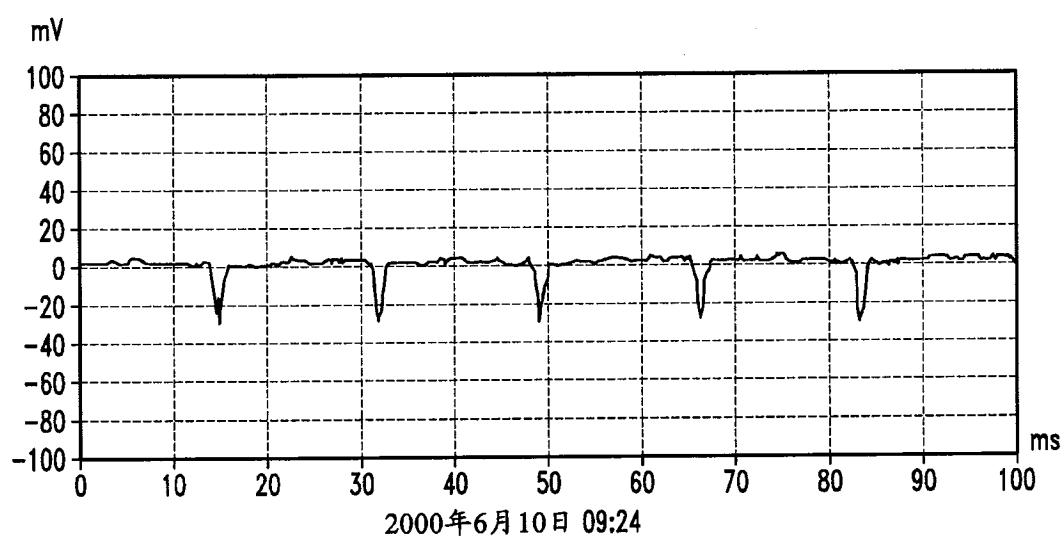


图 96

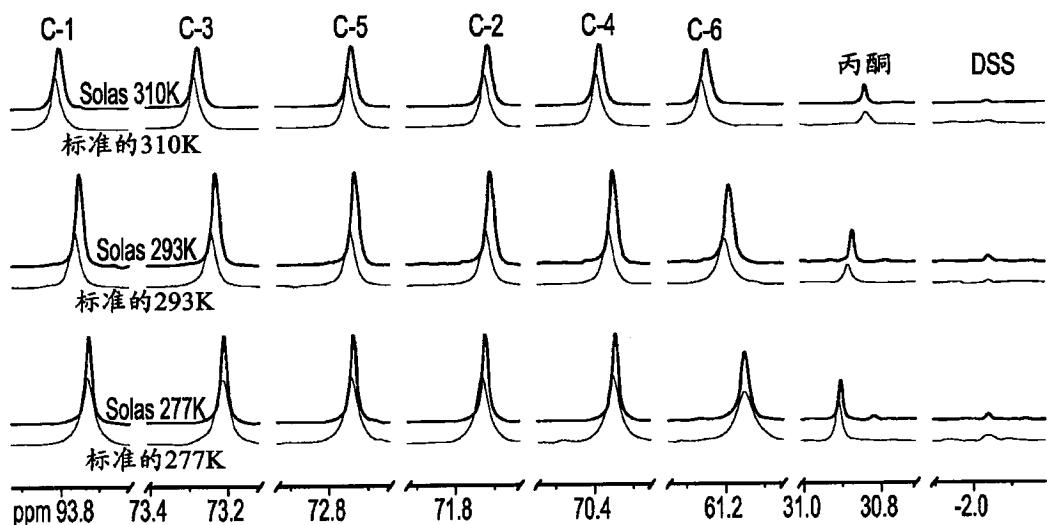


图 97A

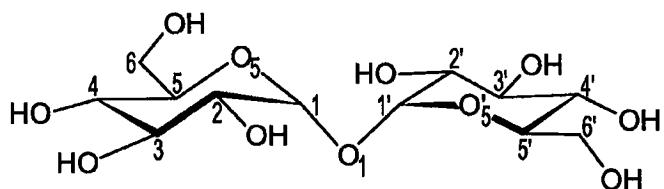


图 97B

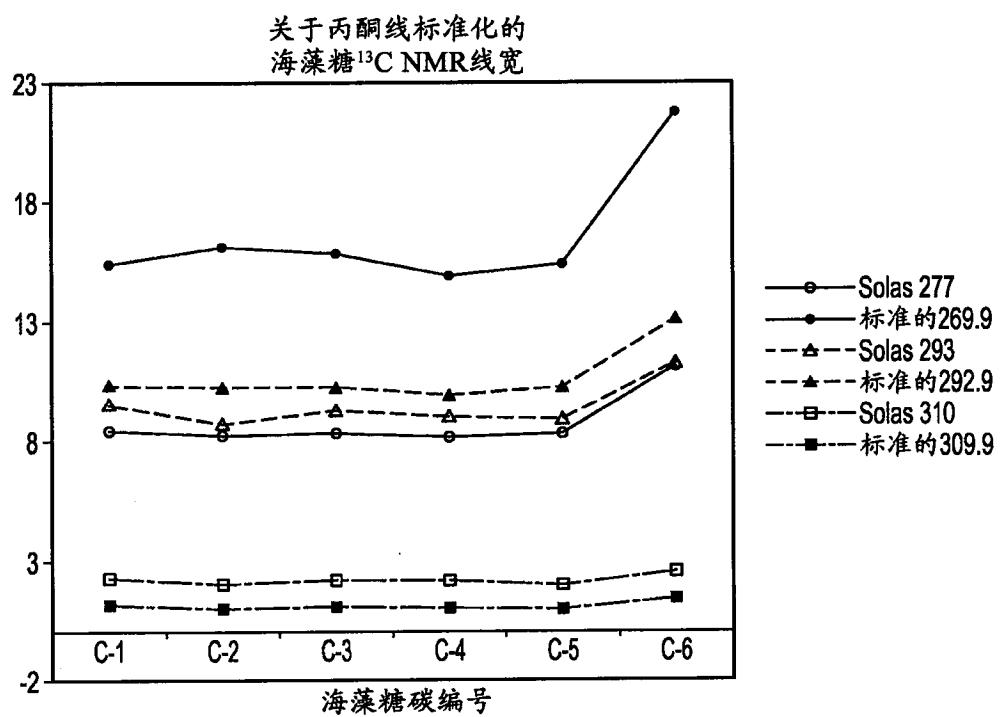


图 97C

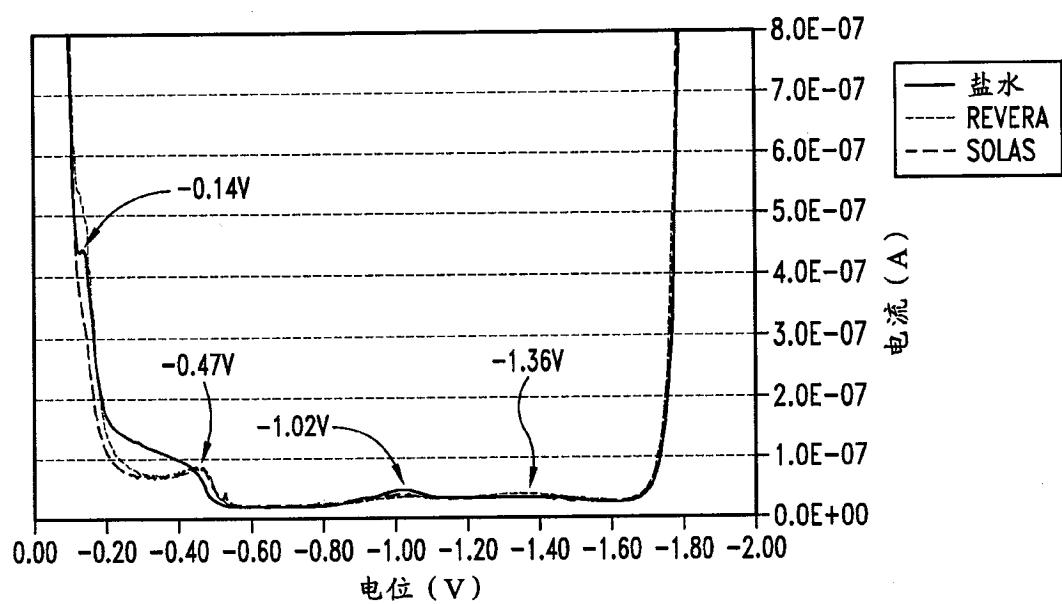


图 98

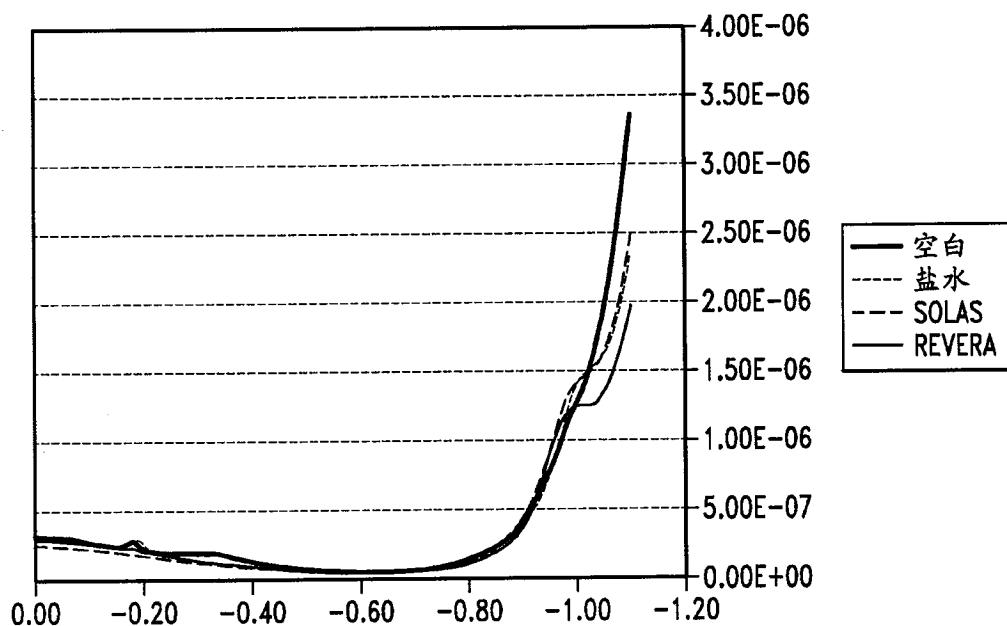


图 99

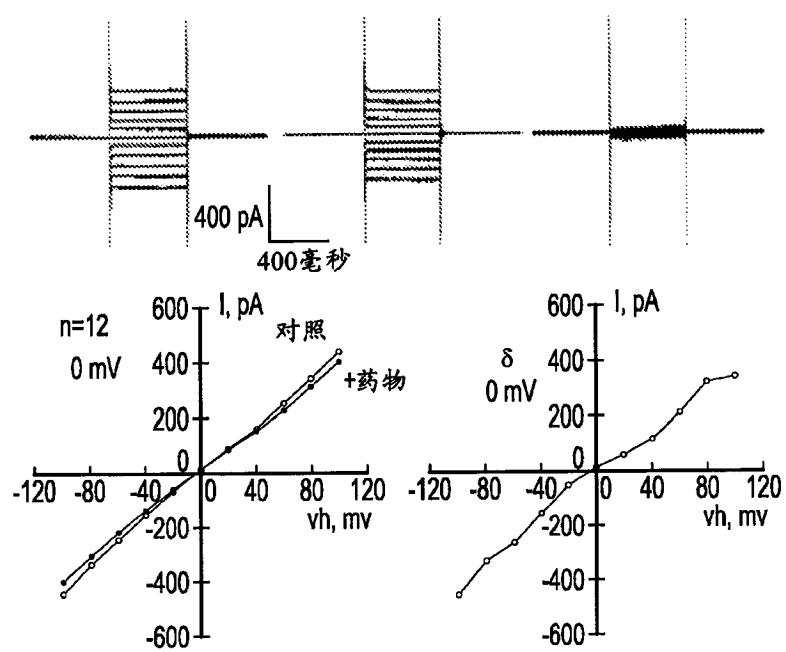


图 100

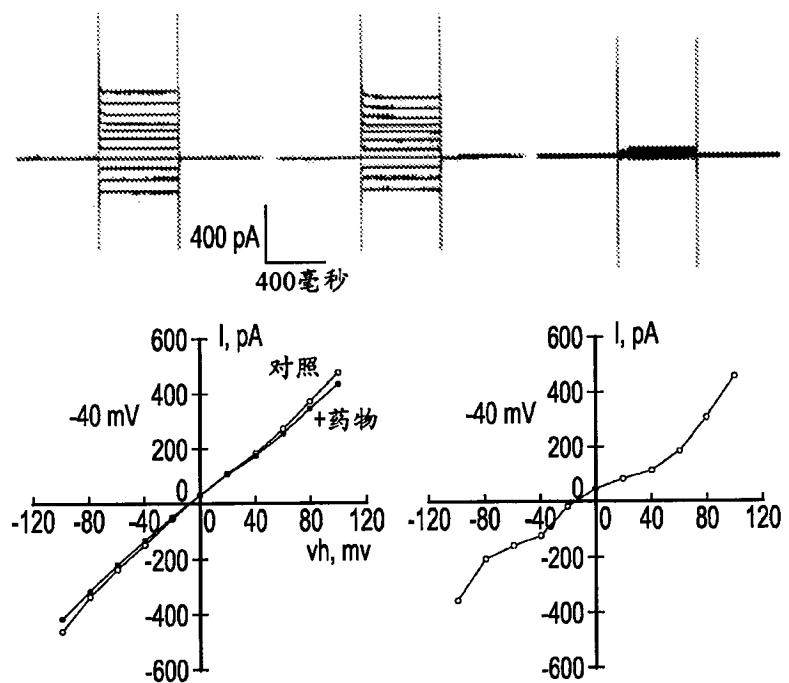


图 101

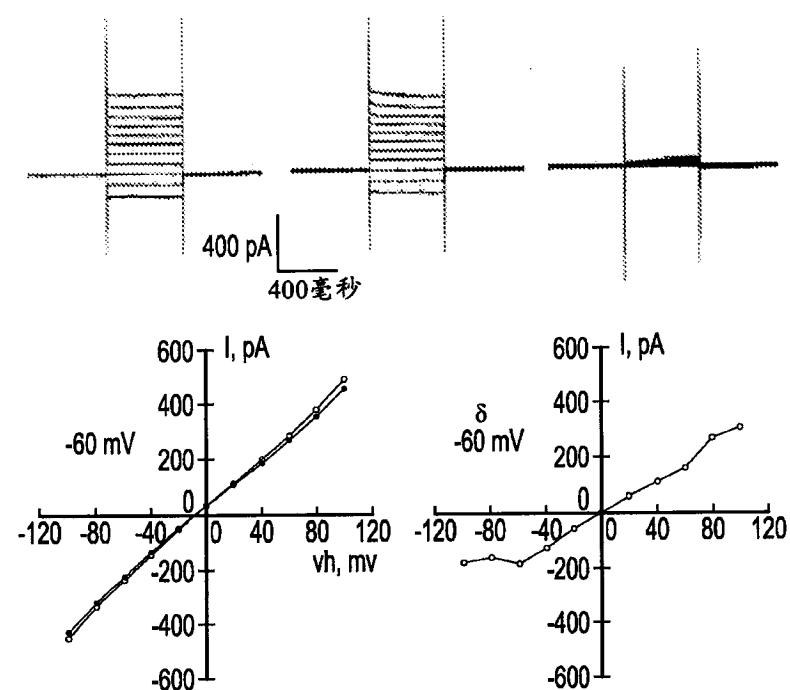


图 102

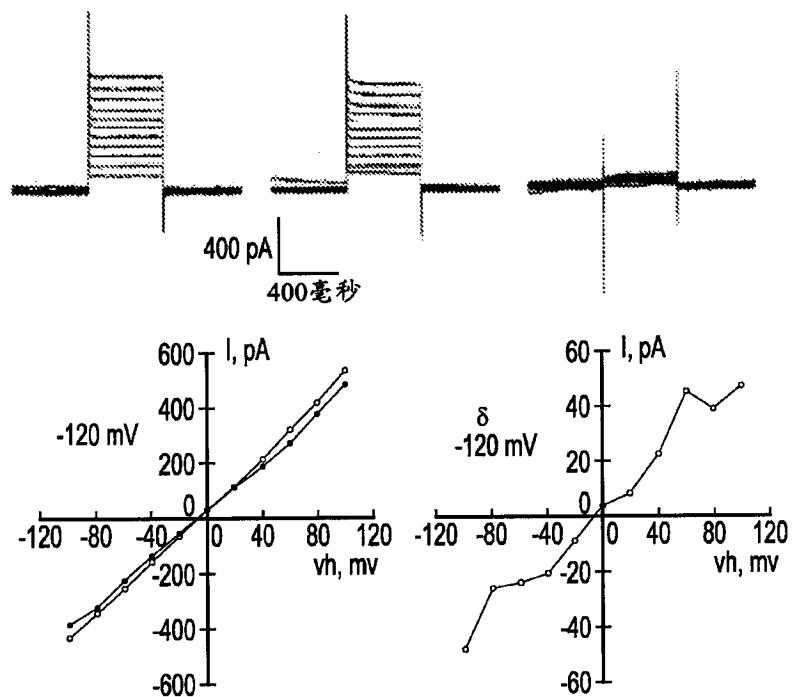


图 103

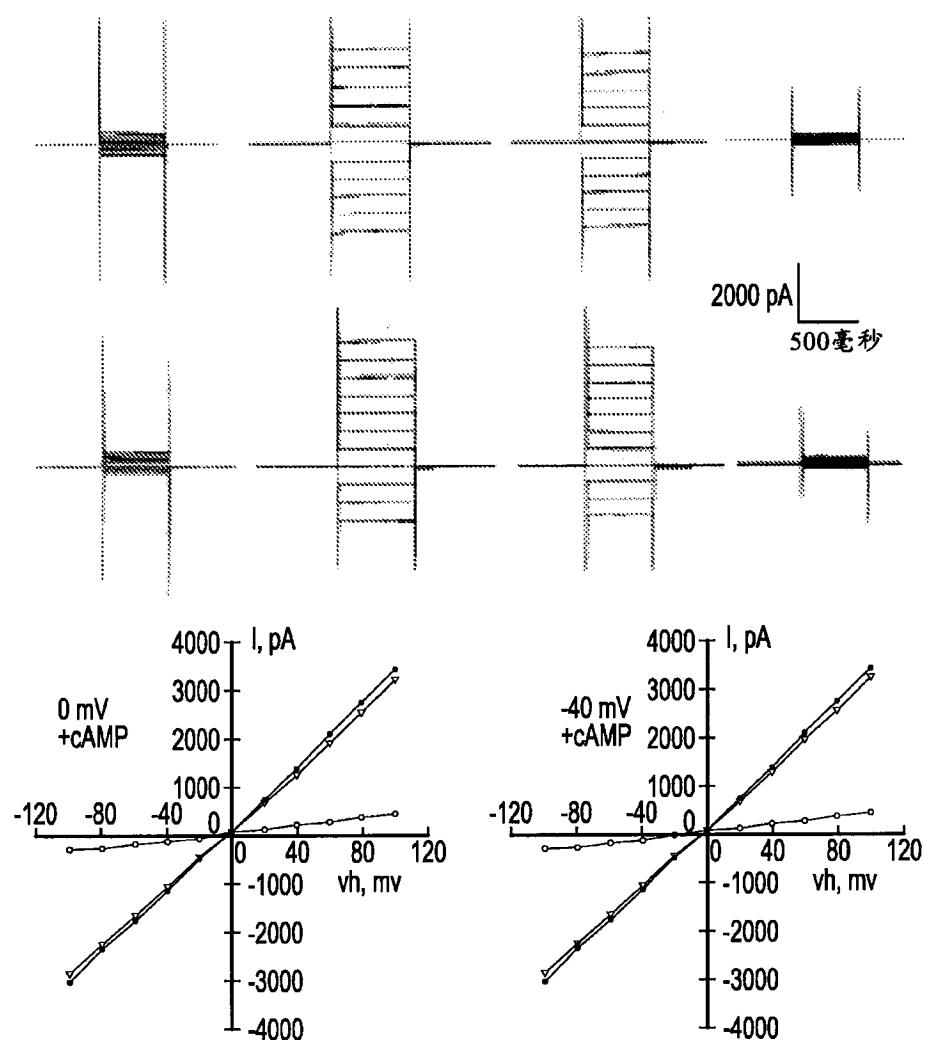


图 104

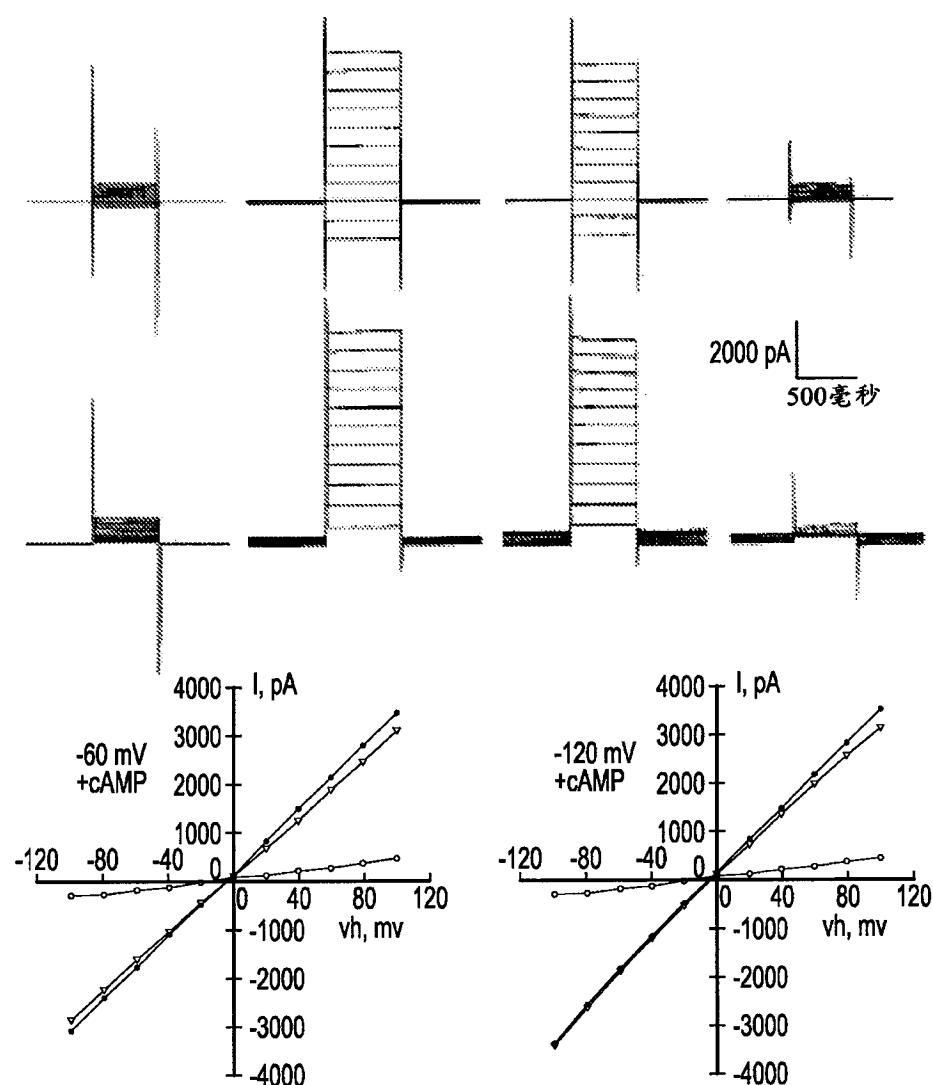


图 105

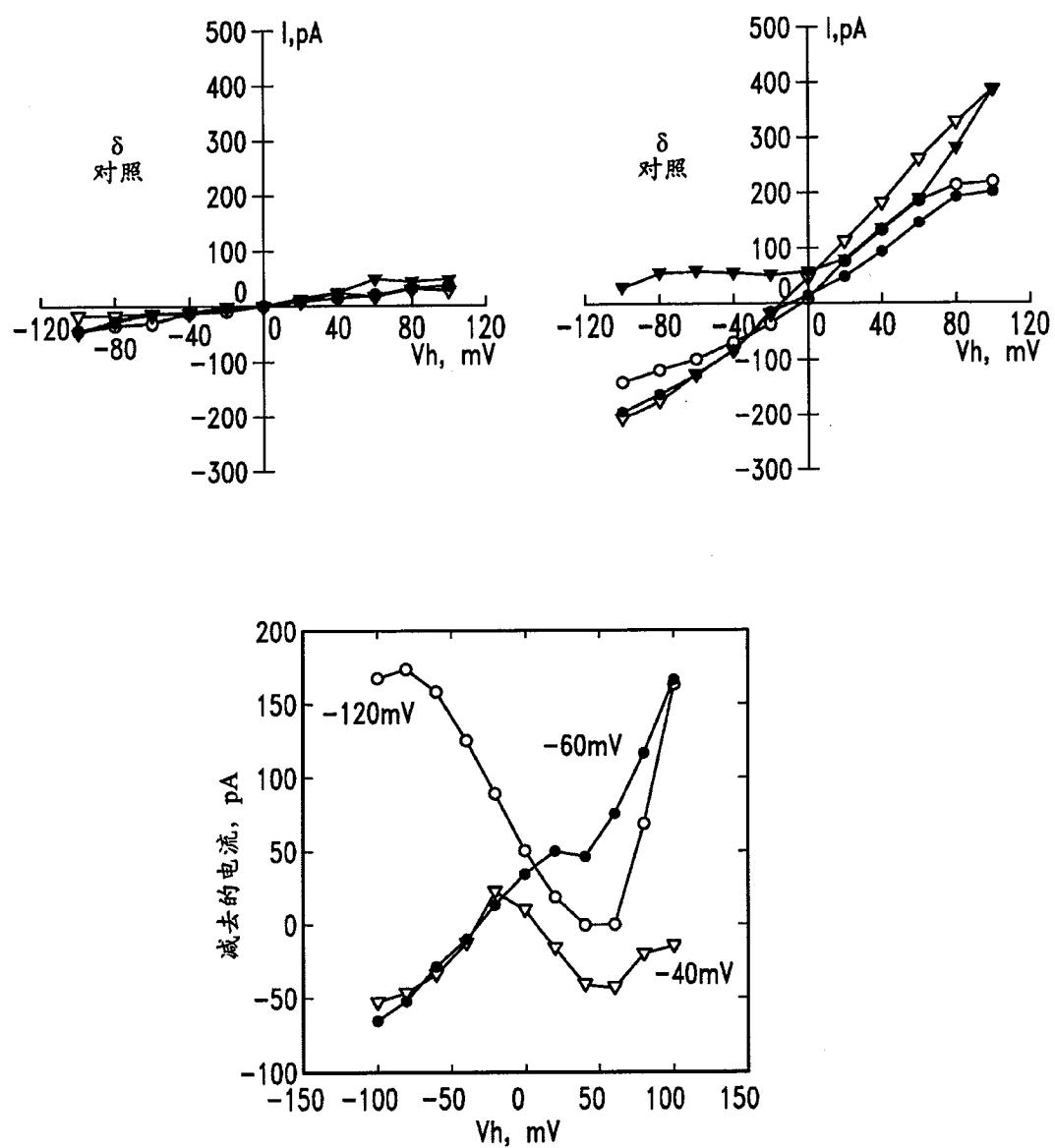


图 106

沙丁胺醇 = 0

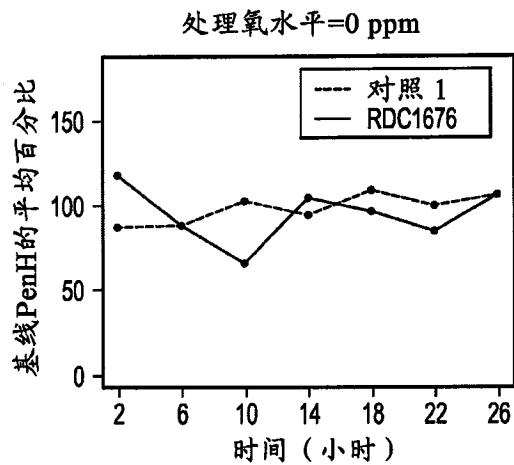


图 107A

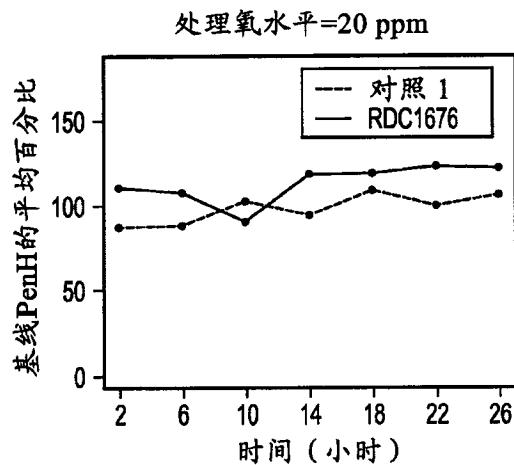


图 107B

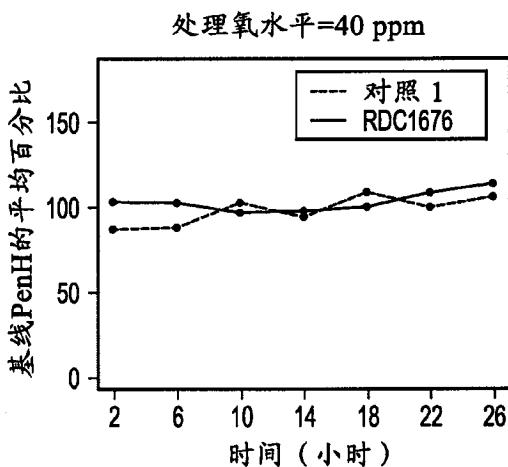


图 107C

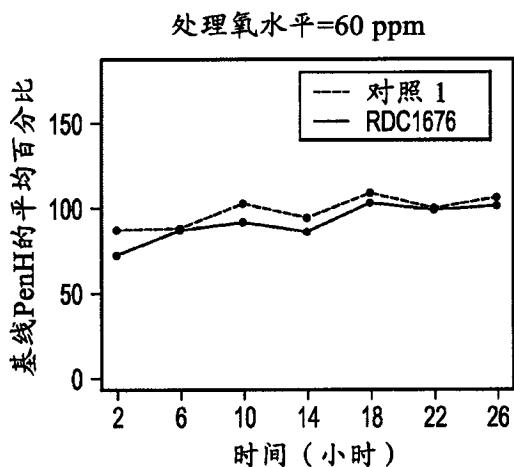


图 107D

沙丁胺醇 = 25

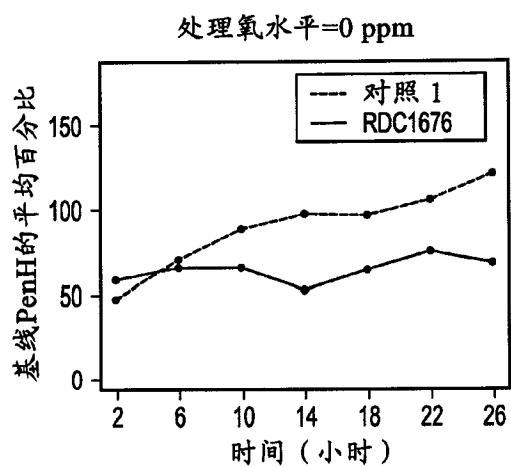


图 108A

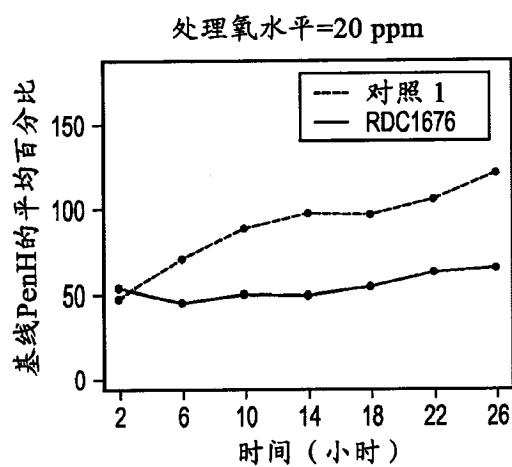


图 108B

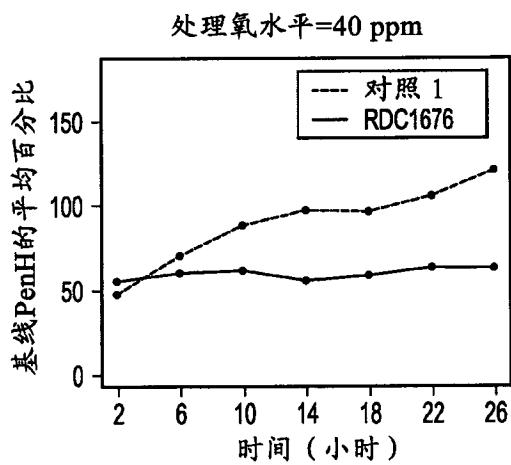


图 108C

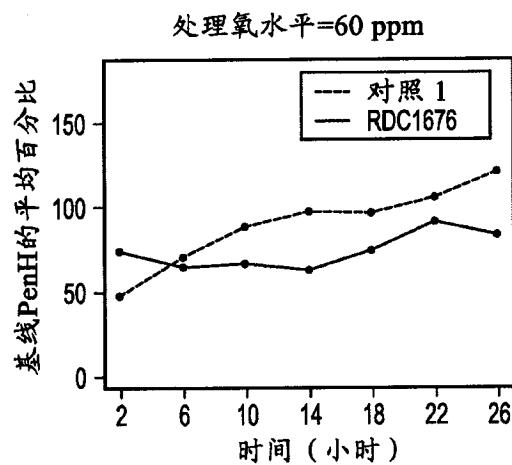


图 108D

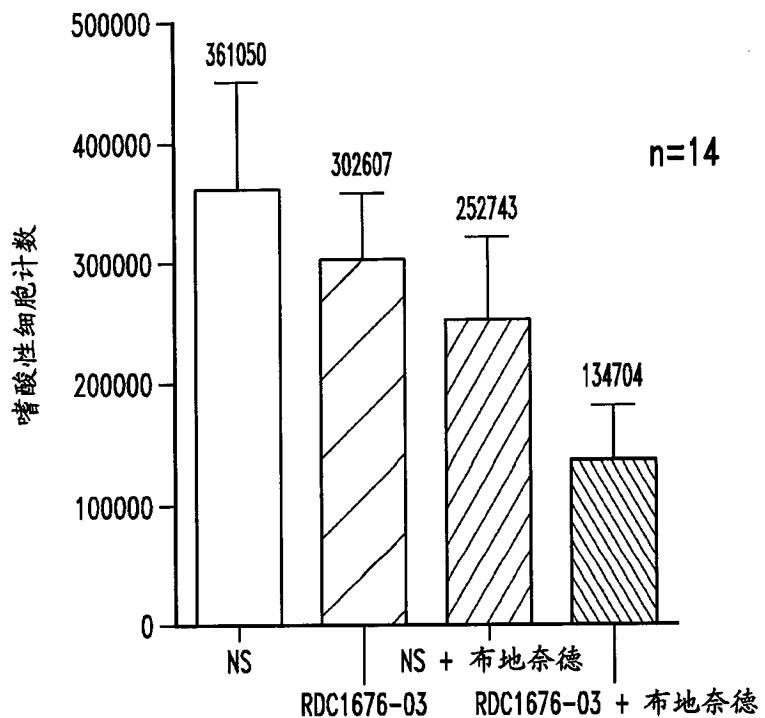


图 109

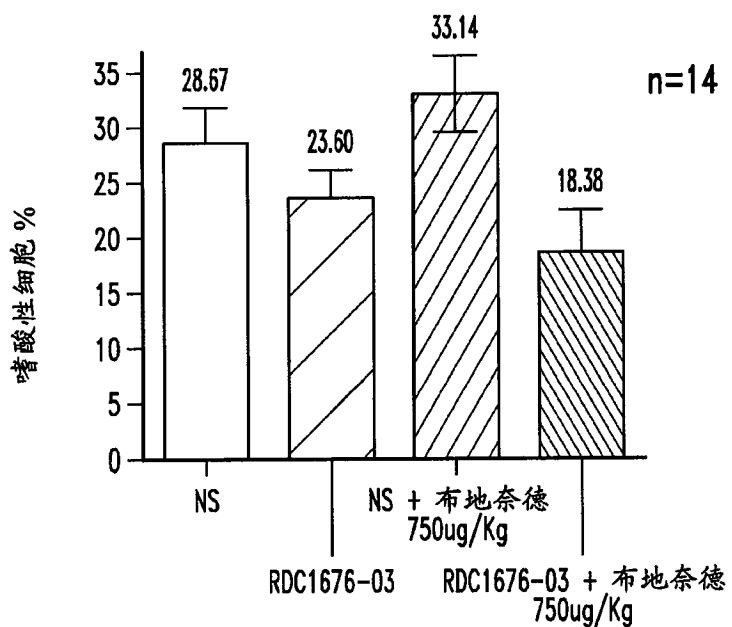


图 110

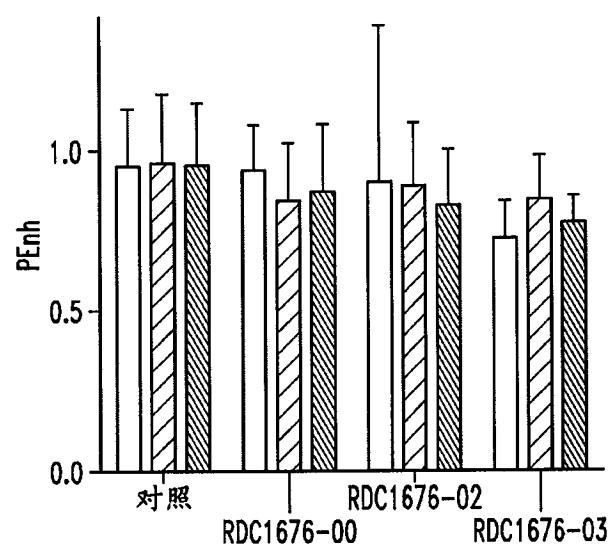


图 111A

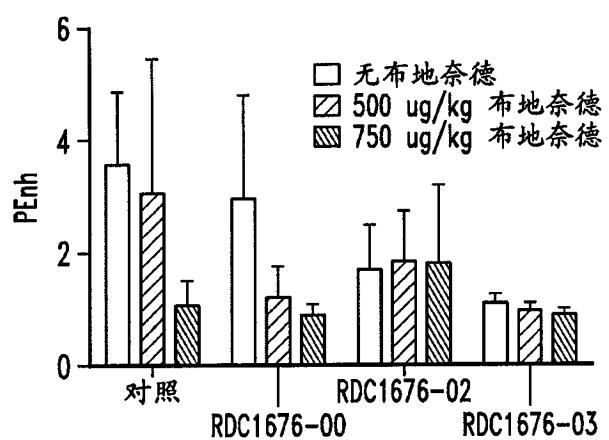


图 111B

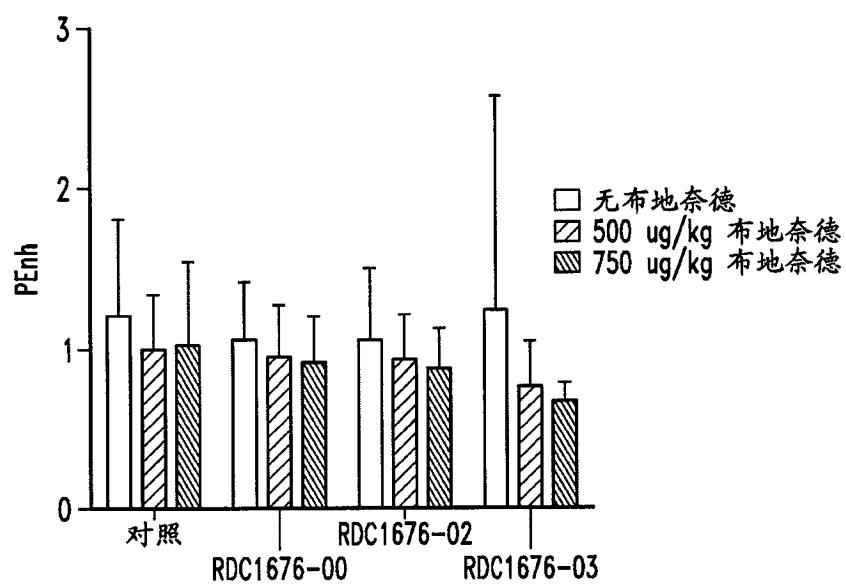


图 111C

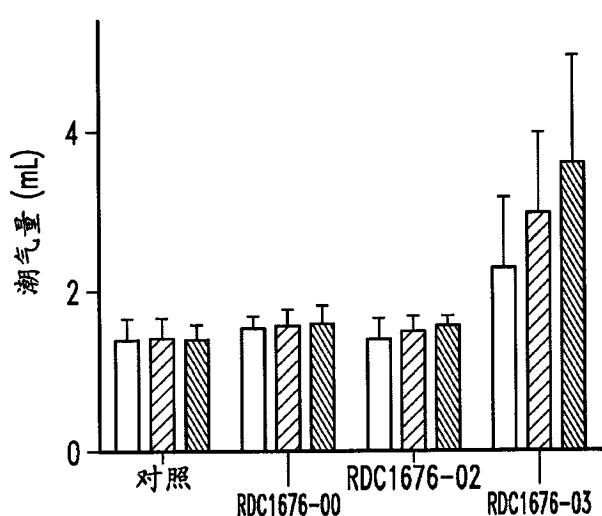


图 112A

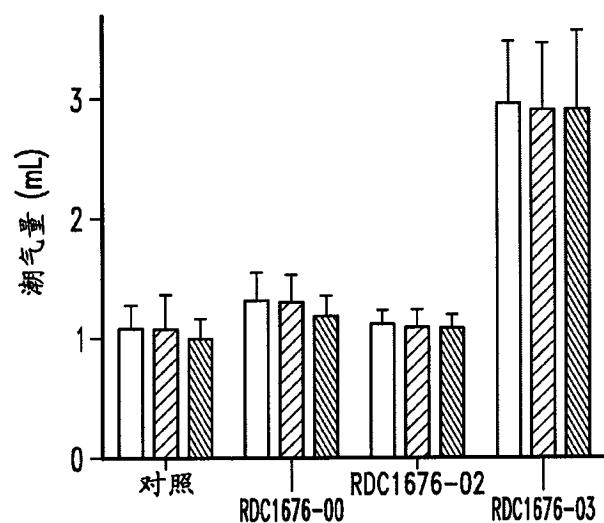


图 112B

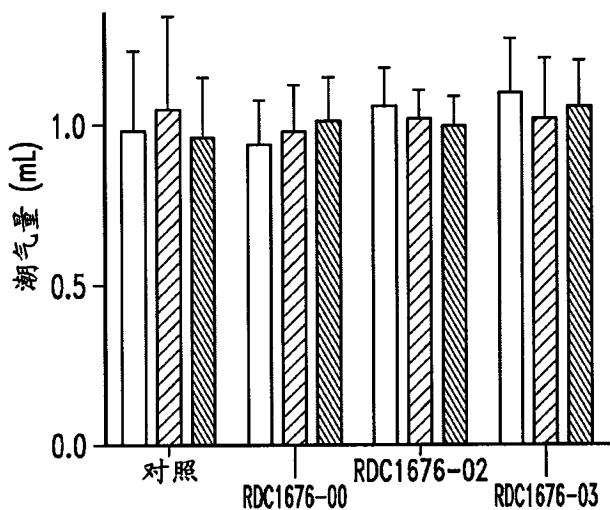


图 112C

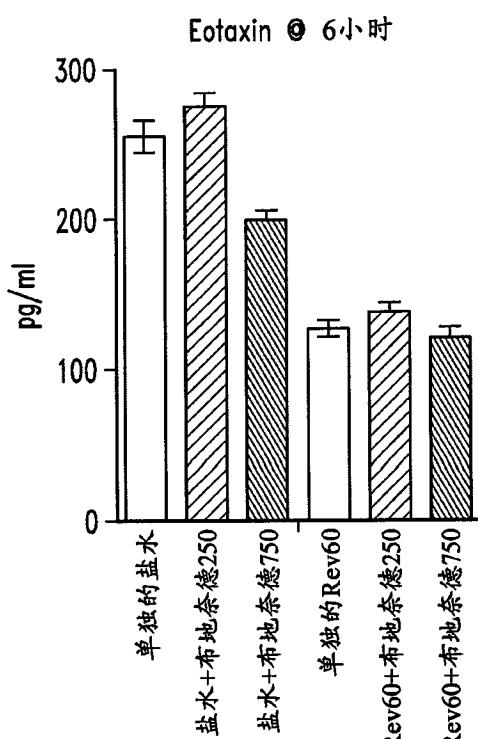


图 113A

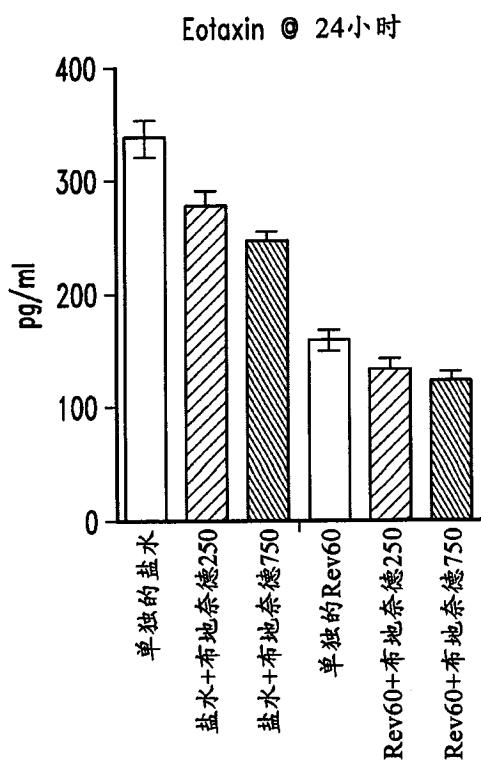


图 113B

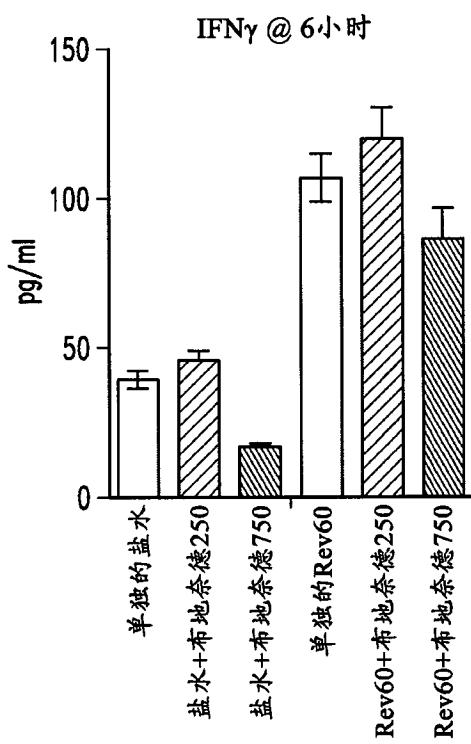


图 113C

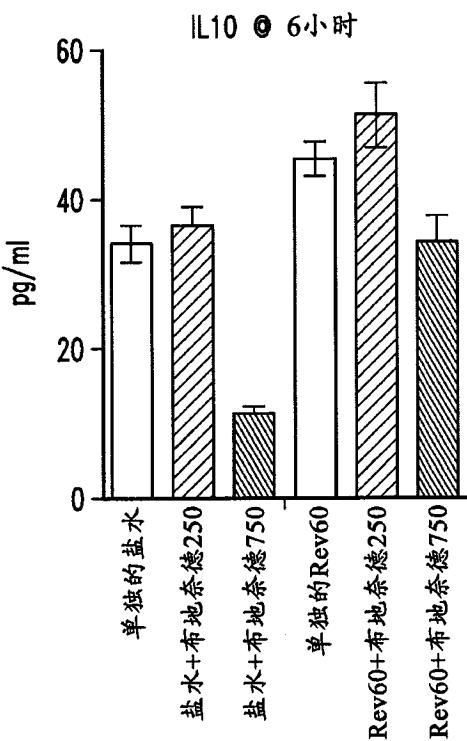


图 113D

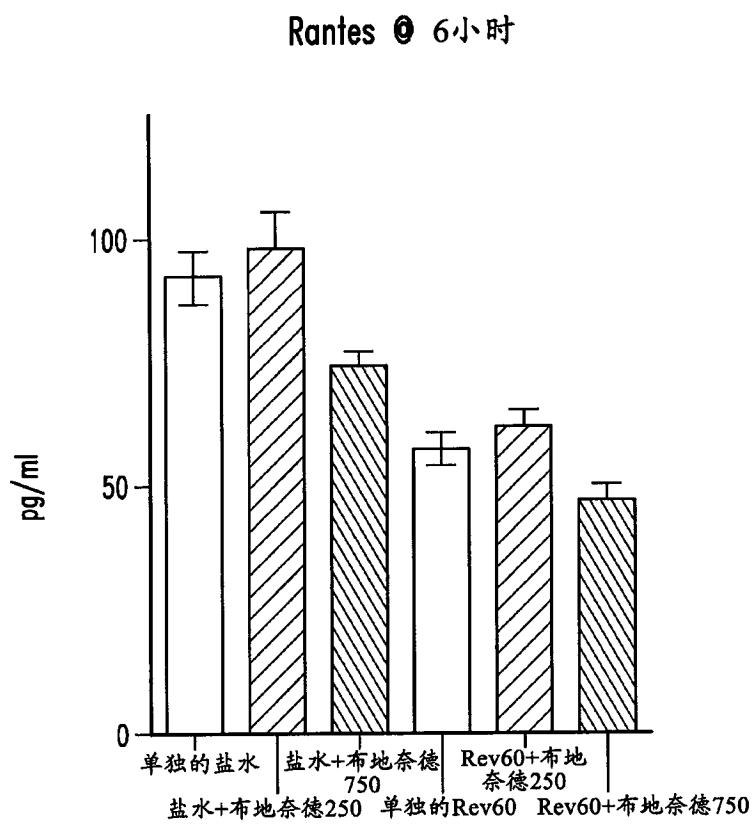


图 114

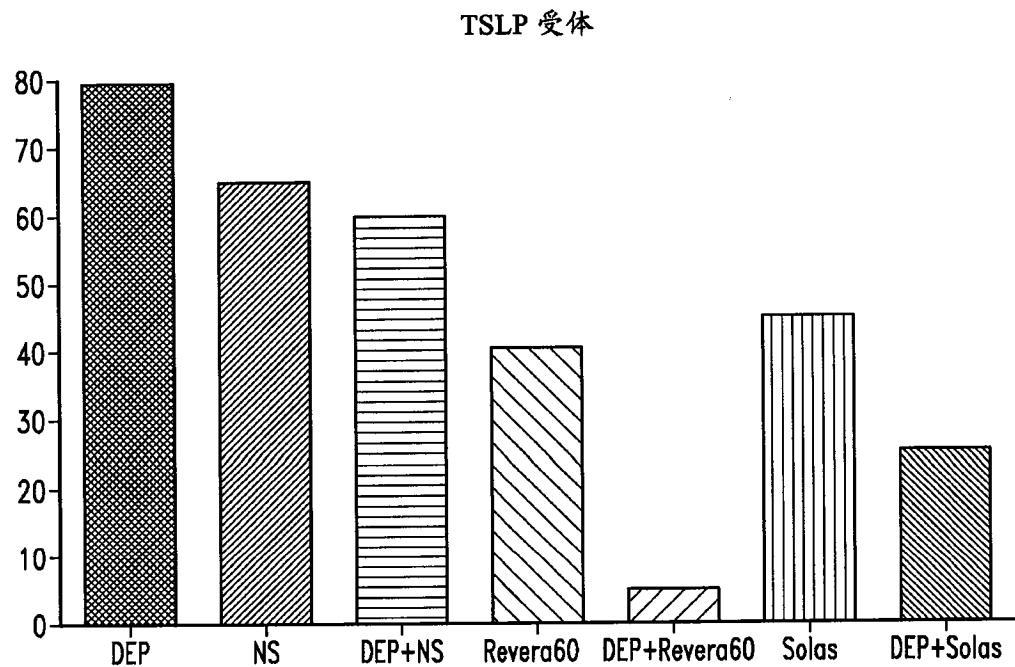


图 115

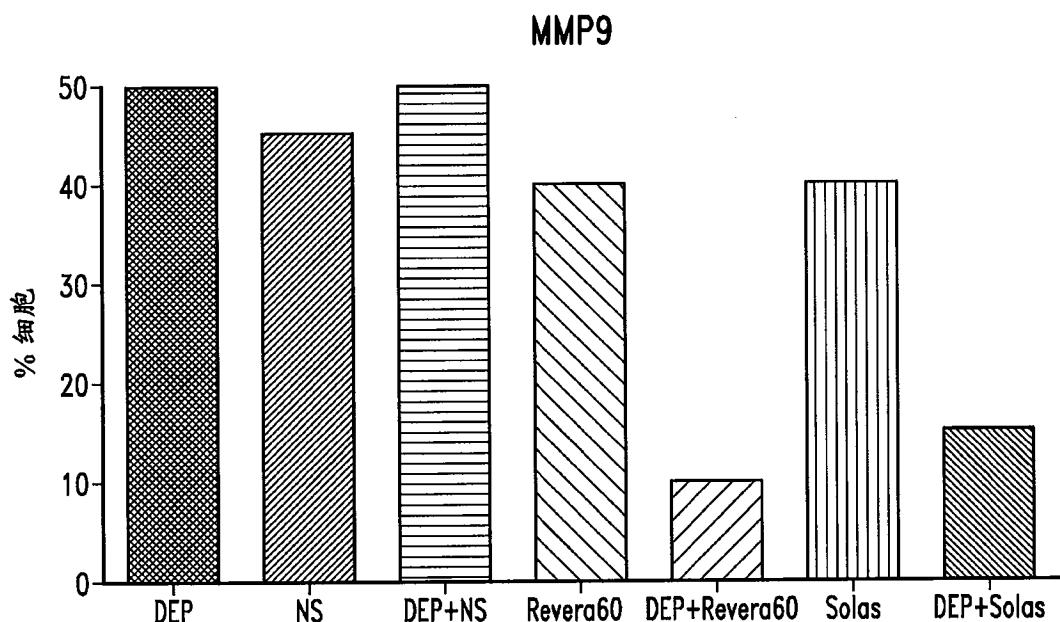


图 116