



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102076326 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 200980124930. 5

代理人 王旭

(22) 申请日 2009. 04. 27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 9/00(2006.01)

- 61/048, 332 2008. 04. 28 US
- 61/048, 347 2008. 04. 28 US
- 12/256, 774 2008. 10. 23 US
- PCT/US2008/081021 2008. 10. 23 US
- PCT/US2008/081202 2008. 10. 24 US
- 12/258, 210 2008. 10. 24 US

(56) 对比文件

US 2004118701 A1, 2004. 06. 24,
 US 2006198822 A1, 2006. 09. 07,
 CN 1499977 A, 2004. 05. 26,
 RUTGEERTS et al. Review article: the
 limitations of corticosteroid therapy
 in Crohn's disease. <ALIMENT PHARMACOL
 THER>. 2001, 第 15 卷 (第 10 期), 1515-1525.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 12. 28

VAN WINSEN, et al. Sensitivity to
 glucocorticoids is decreased in relapsing
 remitting multiple sclerosis. <J. CLIN.
 ENDOCRINOL. METAB>. 2005, 第 90 卷 (第 2
 期), 734-740.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/041852 2009. 04. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/134728 EN 2009. 11. 05

LASSMANN. Hypoxia-like tissue injury
 as a component of multiple sclerosis
 lesions. <J. NEUROL. SCI. >. 2003, 第 206 卷 (第
 2 期), 187-191.

(73) 专利权人 利发利希奥公司

地址 美国华盛顿州

审查员 田晓明

(72) 发明人 理查德·L·华森 安东尼·B·伍德
格雷戈里·J·阿咸宾

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

权利要求书3页 说明书116页
序列表2页 附图87页

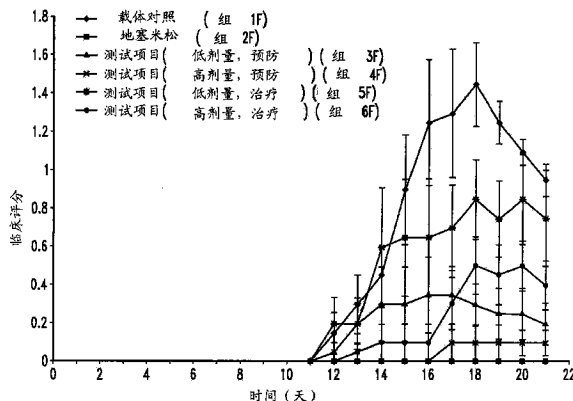
(54) 发明名称

治疗多发性硬化的组合物和方法

他实施方案包括电动改变的流体（例如，电动改变的富含气体的流体和溶液）和治疗组合物的特定施用途径或制剂。

(57) 摘要

提供了电动改变的流体（富含气体的电动流体），包括足以提供细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调节的量的电荷稳定的含氧纳米结构的离子水溶液，还提供了用于治疗炎性神经变性病或疾病或其至少一种症状的治疗性组合物和方法。所述电动改变的流体或治疗性组合物和方法包括任选与其他治疗剂组合的电动改变的离子水性流体。特定方面提供了通过调整细胞膜、膜电位、膜蛋白例如膜受体（包括但不限于G蛋白偶联受体（GPCR）和细胞内连接（例如，紧密连接、间隙连接、黏附区和桥粒）中至少一种来调节或调整与所述炎性应答相关的细胞内信号转导。其



1. 电动改变的水性流体在制备用于治疗炎性神经变性病症或疾病的药物中的用途,其中所述流体包括电荷稳定的含氧纳米泡的离子水溶液,所述纳米泡具有小于 100 纳米的平均直径并在离子水性流体中稳定成形,所述纳米泡的量足以在所述流体接触活细胞时提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整,其中炎性神经变性疾病或其至少一种症状被治疗,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 25ppm 的量存在。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述流体中作为所述电荷稳定的含氧纳米泡存在的溶解氧分子的百分比大于 0.01%。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其中总溶解氧以所述电荷稳定的含氧纳米泡存在。

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

5. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述离子水溶液是盐水溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述流体是超氧合的。

7. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体的改变是所述流体暴露于流体动力诱导的局部电动效应。

8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中暴露于所述局部电动效应是暴露于电压脉冲和电流脉冲的至少一种。

9. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述流体暴露于所述流体动力诱导的局部电动效应是所述流体暴露于用以产生所述流体的装置的诱导电动效应的结构元件。

10. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述炎性神经变性病症或疾病选自以下组成的组的至少一种:多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病和年龄相关的认知衰退。

11. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述炎性神经变性病症或疾病选自以下组成的组的至少一种:卒中/脑缺血、头部创伤、脊髓损伤、亨廷顿病、偏头痛、大脑淀粉样血管病、AIDS、轻度认知损害和哺乳动物朊病毒病。

12. 根据权利要求 10 所述的用途,其中所述炎性神经变性病症或疾病是多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病中的至少一种。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其中所述炎性神经变性病症或疾病是多发性硬化。

14. 根据权利要求 1 所述的用途,其中炎症的至少一种症状与选自以下组成的组的至少一种病症相关:中枢神经和脑中的慢性炎症以及中枢神经和脑中的急性炎症。

15. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体调整一氧化氮的局部或细胞水平。

16. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体促进选自以下组成的组的至少一种细胞因子在施用部位的局部减少:IL-1 β 、IL-8、TNF- α 和 TNF- β 。

17. 根据权利要求 1 所述的用途,还包括通过同时或附加地用另一种抗炎剂治疗所述受试者来协同或非协同抑制或减少炎症。

18. 根据权利要求 17 所述的用途,其中所述其他抗炎剂是类固醇。

19. 根据权利要求 17 所述的用途,其中所述其他抗炎剂是糖皮质激素类固醇。

20. 根据权利要求 19 所述的用途,其中所述糖皮质激素类固醇是布地奈德或其活性衍生物。

21. 根据权利要求 1 所述的用途,还包括组合疗法,其中至少一种另外的治疗剂被施用至患者。

22. 根据权利要求 21 所述的用途,其中,所述至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组:MMP 抑制剂、抗胆碱能药、皮质类固醇、肥大细胞稳定剂、白三烯调节剂、甲基黄嘌呤、 β_2 -激动剂、抗组胺药、免疫系统调节药;及其组合。

23. 根据权利要求 21 所述的用途,其中,所述至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组:乙酸格拉默、干扰素- β 、米托蒽醌、那他珠单抗、环孢霉素、硫唑嘌呤和麦考酚酸吗乙酯。

24. 根据权利要求 21 所述的用途,其中,所述至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组:沙丁胺醇、左旋沙丁胺醇、吡布特罗、阿福特罗、福莫特罗和沙美特罗。

25. 根据权利要求 21 所述的用途,其中所述至少一种另外的治疗剂是全身性皮质类固醇。

26. 根据权利要求 21 所述的用途,其中所述至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组:MMP-9 和 MMP-2 的抑制剂,短效 β_2 -激动剂、长效 β_2 -激动剂,异丙托铵,噻托溴铵,倍氯米松,布地奈德,氟尼缩松,氟地松,莫米松,氟羟脱氢皮质甾醇,甲基强的松龙,强的松龙,强的松,孟鲁司特,扎鲁司特,弃留通,色甘酸,奈多罗米,茶碱,羟嗪,苯海拉明,氯雷他定,西替利嗪,氢化可的松,他克莫司,吡美莫司;及其组合。

27. 根据权利要求 21 所述的用途,其中所述至少一种另外的治疗剂是组合药物,所述组合药物选自异丙托铵和沙丁胺醇、氟地松和沙美特罗、布地奈德和福莫特罗。

28. 根据权利要求 21 所述的用途,其中所述至少一种另外的治疗剂是 TSLP 和 / 或 TSLPR 拮抗剂。

29. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述 TSLP 和 / 或 TSLPR 拮抗剂选自自由以下组成的组:特异性针对以下各项的中和抗体:TSLP 与 TSLP 受体、可溶性 TSLP 受体分子和 TSLP 受体融合蛋白。

30. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述 TSLP 和 / 或 TSLPR 拮抗剂是 TSLPR- 免疫球蛋白 Fc 分子。

31. 根据权利要求 1 所述的用途,包括改变细胞膜结构或功能,所述改变细胞膜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。

32. 根据权利要求 31 所述的用途,其中所述膜相关蛋白包括选自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、细胞黏附蛋白、整联蛋白。

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

34. 根据权利要求 33 所述的用途,其中所述 G 蛋白偶联受体与 G 蛋白 α 亚基相互作用。

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

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

37. 根据权利要求 1 所述的用途,其中调整细胞膜电导率是调整全细胞电导。

38. 根据权利要求 37 所述的用途,其中调整全细胞电导是调整所述全细胞电导的至少一种电压依赖性贡献。

39. 根据权利要求 1 所述的用途,其中对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整是调整细胞内信号转导,所述调整细胞内信号转导是调整钙依赖性细胞通信途径或系统。

40. 根据权利要求 1 所述的用途,其中对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整是调整细胞内信号转导,所述调整细胞内信号转导是调整磷脂酶 C 活性。

41. 根据权利要求 1 所述的用途,其中对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整是调整细胞内信号转导,所述调整细胞内信号转导是调整腺苷酸环化酶活性。

42. 根据权利要求 1 所述的用途,其中对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整是调整细胞内信号转导,所述调整细胞内信号转导是调整与至少一种病症或症状有关的细胞内信号转导,所述病症或症状选自自由以下组成的组:中枢神经和脑中的慢性炎症,以及中枢神经和脑中的急性炎症。

43. 根据权利要求 1 所述的用途,包括施用至细胞网或层,并且还包括调整其中的细胞内连接。

44. 根据权利要求 43 所述的用途,其中所述细胞内连接是选自自由紧密连接、间隙连接、黏附区和桥粒组成的组的至少一种。

45. 根据权利要求 43 所述的用途,其中所述细胞网或层是选自自由以下组成的组的至少一种:CNS 脉管中的内皮细胞和内皮星形细胞紧密连接、血-脑脊髓液紧密连接或屏障、肺上皮细胞型连接、支气管上皮细胞型连接和肠上皮细胞型连接。

46. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体是氧合的,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 30ppm 氧的量存在。

47. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体是氧合的,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 40ppm 氧的量存在。

48. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体是氧合的,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 50ppm 氧的量存在。

49. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述电动改变的水性流体是氧合的,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 60ppm 氧的量存在。

50. 根据权利要求 1 至 49 中任一项所述的用途,其中所述电动改变的水性流体包括荷电的氧类型。

51. 根据权利要求 50 所述的用途,其中所述荷电的氧类型以至少 0.01ppm 的量存在。

52. 根据权利要求 1 至 49 中任一项所述的用途,其中所述电动改变的水性流体包括溶剂化电子形式和电动改性的氧类型中的至少一种。

53. 根据权利要求 52 所述的用途,其中所述溶剂化电子或电动改性的氧类型以至少 0.01ppm 的量存在。

54. 根据权利要求 50 所述的用途,其中所述电动改变的氧合水性流体包括至少部分由分子氧稳定的溶剂化电子。

55. 根据权利要求 1 所述的用途,其中对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整的能力在封闭的气密容器中持续至少 2 个月。

治疗多发性硬化的组合物和方法

技术领域

[0001] 特定方面一般涉及包括但不限于多发性硬化的炎性神经变性疾病（例如多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、卒中 / 脑缺血、头部创伤、脊髓损伤、亨廷顿病、偏头痛、大脑淀粉样血管病、AIDS 相关的炎性神经变性病、年龄相关的认知衰退；轻度认知损害和哺乳动物朊病毒病）和涉及调节或调整神经炎症，并且更特别涉及用于通过施用包括至少一种本发明的电动产生的流体（例如，电动产生的富氧流体）的治疗组合物治疗或预防受试者的多发性硬化或炎性神经变性疾病的至少一种症状的组合物和方法。特定方面的治疗涉及通过施用包含至少一种本文公开的电动产生的流体（包括富含气体的（例如，富氧的）电动产生的流体）的治疗组合物，通过调整细胞膜、膜电位、膜蛋白例如膜受体（包括但不限于 G 蛋白偶联受体）和细胞内连接（例如，紧密连接、间隙连接、黏附区（zona adherens）和桥粒）中至少一种来调整与炎性应答相关的细胞内信号转导。其他方面涉及组合法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2008 年 10 月 24 日提交的美国专利申请序号 12/258, 210、2008 年 10 月 23 日提交的美国专利申请序号 12/256, 774、2008 年 10 月 24 日提交的专利合作条约 (PCT) 申请序号 PCT/US2008/081202 和 2008 年 10 月 23 日提交的专利合作条约 (PCT) 申请序号 PCT/US2008/081021 的优先权，并且还要求 2008 年 4 月 28 日提交的美国临时专利申请序号 61/048, 332 和 2008 年 4 月 28 日提交的美国临时专利申请序号 61/048, 347 的优先权权益，其全部在此通过引用整体并入。

背景技术

[0004] 神经变性疾病是特征为神经元或其髓鞘恶化的一组疾病。这种神经元破坏最终导致功能障碍和残疾。很多时候发现炎症是神经变性疾病的组成部分并加入神经变性的发病原因 (Minagar, 等 (2002) *J. Neurological Sci.* 202 :13-23 ;Antel 和 Owens (1999) *J. Neuroimmunol.* 100 :181-189 ;Elliott (2001) *Mol. Brain. Res.* 95 :172-178 ; Nakamura (2002) *Biol. Pharm. Bull.* 25 :945-953 ;Whitton PS. (2007) *Br J Pharmacol.* 150 : 963-76)。总起来说，这些疾病包括本领域公认的炎性神经变性疾病。在一些神经变性患者中，神经炎症可以在神经元的任何明显损失之前若干年发生 (Tansey 等, *Front Bioscience* 13 :709-717, 2008)。许多不同类型的免疫细胞，包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞、星形细胞和小胶质细胞，可以促成免疫相关疾病的病理学，所述免疫相关疾病如多发性硬化 (M. S.)、帕金森病、淀粉样变性病（例如，阿尔茨海默病）、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、朊病毒病和 HIV 相关性痴呆。更具体地，研究组已经注意到，在 MS 中，髓磷脂损伤由炎性应答介导 (Ruffini 等 (2004) *Am J Pathol* 164 :1519-1522)，并且在白细胞浸润至 CNS 时 M. S. 发病被放大 (Dos Santos 等 (2008) *J Neuroinflammation* 5 :49)。一个研究组已经开发了测试 CNS 炎症及其在 MS 中作用的遗传模型（通过动物模型实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)。此外，发现促炎细胞因子（特别是 TNF- α ）在阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩性侧索硬化

(ALS) 中升高 (Greig 等 (2006) Ann NY Acad of Sci 1035 :290-315)。因此,这些炎性神经变性疾病可以被抗炎药物有效治疗。

[0005] 炎性神经变性疾病包括但不限于:多发性硬化 (MS)、帕金森病、淀粉样变性病 (例如,阿尔茨海默病)、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、HIV 相关性痴呆、卒中 / 脑缺血、头部创伤、脊髓损伤、亨廷顿病、偏头痛、大脑淀粉样血管病、AIDS、年龄相关的认知衰退;轻度认知损害和哺乳动物朊病毒病。

[0006] 多发性硬化 (MS) 是中枢神经系统 (CNS) 的慢性炎性神经变性疾病,其影响全世界约 1,100,000 人,特别影响年轻人 (Pugliatti 等 (2002) Clin. Neurol. Neuros. 104 :182-191)。MS 的病理学特征为神经组织脱髓鞘,其在临床上导致范围从良性至慢性进行性模式的疾病状态的许多疾病形式之一。更具体说,已经描述了多发性硬化的五种主要形式:1) 良性多发性硬化;2) 复发-缓解型多发性硬化 (RRMS);3) 继发进行性多发性硬化 (SPMS);4) 原发进行性多发性硬化 (PPMS);和 5) 进行-复发型多发性硬化 (PRMS)。慢性进行性多发性硬化是用于概括指 SPMS、PPMS 和 PRMS 的术语。多发性硬化的复发形式是重复复发的 SPMS、RRMS 和 PRMS。

[0007] 在整个疾病过程中,轴突周围的髓鞘逐渐破坏。因为完整髓磷脂是维持轴突完整性所必需的 (Dubois-Dalcq 等, Neuron. 48, 9-12 (2005)), 系统性破坏最终在临床上导致各种神经功能障碍,包括麻木和疼痛、协调和平衡问题、失明和一般认知损害。有趣的是,MS 进展可具有显著的患者间差异,一些患者在患有该病甚至几十年后仅具有轻微残疾,而其他患者在诊断后仅几年就变得依赖于轮椅。

[0008] MS 的病因学目前是未知的,但是考察遗传证据、分子基础和免疫学因素的研究正开始阐明疾病过程和脱髓鞘发生的机制。在遗传分析中,一些报道已经暗示相关个体与正常群体 (0.1% 的 MS 患病率) 相比具有更高的 MS 发病率:如果同卵双胞胎中一个具有 MS,则另一个具有 30% 的概率发生该疾病,并且如果异卵双胞胎和兄弟姐妹中的一个患有 MS,则其他人具有 1-2% 的概率。几个研究组已经利用谱系和关联研究发现负责该遗传力的基因,并且发现携带人类白细胞抗原 (HLA)-DR2 等位基因的 II 类主要组织相容性复合物 (MHC) 的个体受 MS 影响的相对风险高 3-4 倍。已经鉴定与 MS 有关,但是风险低很多的其他基因。MS 易感性与 II 类 MHC 之间的关联强烈表明 CD4+ T- 细胞在 MS 发病中的作用 (Oksenberg 等, JAMA 270 :2363-2369 (1993); Olerup 等, Tissue Antigens 38 :1-3 (1991))。

[0009] 此外,已经试图鉴定在罹患 MS 的 MS 患者中与健康个体相比差异表达的基因。基因微阵列已经被用于 1) 检查从各 MS 斑块类型 (急性相对于慢性) 和各斑块区域 (活动的与非活动的) 的转录 (Lock 和 Heller (2003)); 2) 比较 RRMS 患者相对于对照中的外周血单核细胞 (PBMC), 所述细胞来自进行干扰素- β 治疗的患者和未进行干扰素- β 治疗的患者 (Sturzebecher 等 (2003)); 和 3) 检查小鼠 (MS 的动物模型) 中实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 的各阶段的 CNS 细胞 (Lock 等 (2002))。这些实验中发现的大部分是预期的,包括如下发现:抗炎抗凋亡基因被下调,并且促炎增殖基因被上调。令人惊讶的结果包括鉴定治疗应用的潜在新靶,例如骨桥蛋白 (Chabas 等 2001) 和 TRAIL (Wandinger 等 2003))。然而,当比较 MS 患者与健康个体的表达时,许多具有差异调节的基因在 MS 发展方面具有未知的意义,因为可以影响 MS 易感性和 / 或进展的任何基因依然是未知的。

[0010] 进一步研究确定,自体反应性 CD4+T 细胞引发的炎性应答可以介导对髓磷脂的损

伤 (Bruck 等, *J. Neurol. Sci.* 206 :181-185 (2003))。一般认为,在 MS 发作期间发生于髓鞘和轴突的损伤的大部分在产生炎症应答的自体反应性 T 细胞应答中发生,所述炎症应答包括分泌促炎 (例如 Th1 和 Th17) 细胞因子 (Prat 等, *J. Rehabil. Res. Dev.* 39 :187-199 (2002); Hemmer 等, *Nat. Rev. Neurosci.* 3 :291-301 (2002))。

[0011] 目前可用于 MS 的治疗包括乙酸格拉默、干扰素- β 、那他珠单抗和米托蒽醌。一般而言,这些药物以非特异性方式抑制免疫系统并且仅稍微限制疾病的总体进展 (Lubetzki 等 (2005), *Curr. Opin. Neurol.* 18 :237-244)。因此,存在开发更好治疗 MS 的治疗策略的需求。

[0012] 乙酸格拉默由谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸和酪氨酸构成为无规聚合物。乙酸格拉默具有有限的效力和明显的副作用,例如注射部位肿块、寒战、发热、疼痛、呼吸急促、心跳加快和焦虑。在利用 943 例原发进行性 MS 患者的重要临床研究中,乙酸格拉默未能阻止残疾和疾病的进展 (Wolinsky, 等 (2007) *Ann Neurol* 61 :13-24)。

[0013] 干扰素- β 是成纤维细胞产生的天然存在的蛋白质并且是先天免疫应答的一部分。作为 MS 药物,干扰素- β 在降低 MS 发生率中约 18-38% 有效。副作用包括轻微的流感样症状和注射部位的反应和更严重副作用 (例如,抑郁、癫痫发作和肝问题)。

[0014] 米托蒽醌是 MS 的一种治疗。其作为用于抗击癌症的化疗治疗而被开发—通过干扰 DNA 修复与合成而起作用并且对癌细胞无特异性。米托蒽醌的副作用可以是相当严重的,并且包括恶心、呕吐、脱发、心脏损伤和免疫抑制。

[0015] 那他珠单抗是靶向 $\alpha 4$ -integren (一种细胞黏附分子) 的人源化单克隆抗体。认为那他珠单抗通过阻止引起炎症的免疫细胞穿过血脑屏障 (BBB) 而起作用。副作用包括疲劳、头痛、恶心、发冷和变应性反应。

[0016] 帕金森病是另一种炎症神经变性疾病,特征为运动障碍,包括肌肉强直和缓慢的身体运动。最近对帕金森病的研究发现,由于细胞因子和 HLA-DR 抗原增强的表达,免疫应答可能促成神经损伤 (Czlonkowska 等 (2002) *Med Sci Monit* 8 :RA165-77)。

[0017] 当某些蛋白改变结构并趋于彼此结合构建特定组织并阻断正常组织发挥功能时,发生淀粉样变性病。这些结构改变的蛋白被称为淀粉样蛋白。通常,淀粉样变性病被分成两类:原发性或继发性。原发性淀粉样变性病发生于具有不当免疫细胞功能的病态。继发性淀粉样变性病通常产生于一些其他慢性感染或炎症疾病的并发症。此类实例包括阿尔茨海默病和类风湿性关节炎。因为继发性淀粉样变性病中的根本问题是炎症,治疗炎症可能是有益的。

[0018] 阿尔茨海默病是另一种炎症神经变性疾病。其例证为不断损害学习和记忆,尽管该疾病本身可以指示认知能力改变的其他方式表现。在该疾病中,大脑皮层中神经元和突触的逐渐损失导致神经组织的严重萎缩。尽管阿尔茨海默病的原因未知,但是许多人相信炎症起了重要作用,并且临床研究显示,严重明显促成该疾病的发病 (Akiyama, 等 (2000) *Neurobiol Aging.* 21 :383-421)。

[0019] 在肌萎缩性侧索硬化中,已经表明了炎症与该疾病的关联 (Centonze, 等 (2007) *Trends Pharm Sci* 28 :180-7)。此外,发现 TNF- α mRNA 在肌萎缩性侧索硬化的转基因小鼠模型的脊髓中表达。有趣的是,转录物早在开始运动困难之前被检测,直至 ALS 引起死亡 (Elliot (2001) *Brain Res Mol Brain Res* 95 :172-8)。

[0020] 炎症

[0021] 炎症可以是对创伤或微生物感染的急性或慢性、局部或全身免疫和 / 或血管应答,所述微生物例如细菌或病毒。炎性反应通常破坏、稀释或限制损伤剂和受试者中的受损组织。特别是急性形式的炎症的特征为疼痛、发热、发红、肿胀和可能的功能缺失等经典体征。在组织学水平上,炎症涉及一系列复杂事件,包括小动脉、毛细血管和小静脉的扩张、以及通透性和血流增加、包括血浆蛋白的流体渗出、和白细胞迁移入炎症区域,特别是具有局部反应的区域。

[0022] 炎症的治疗性治疗包括各式各样的药物,其根据特定炎性病症和寻求的结果而被静脉内、皮下、局部或口服施用。然而,当今可用的大多数抗炎治疗具有相当大的缺点,包括在注射部位的严重反应,增加的感染易感性,皮疹,或其他副作用。因此,需要更好的抗炎治疗剂 and 治疗方法。

[0023] 胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 是 IL-7 样细胞因子,其促发树状细胞介导的 Th2- 型炎性应答,并被认为是变应性炎症的总开关。TSLP 是 B 细胞和 T 细胞发育和成熟的必要生长因子。特别是,鼠 TSLP 支持 B 淋巴细胞增殖并且是 B 细胞增殖所需要的。鼠 TSLP 在控制 T 细胞受体 - γ (TCR. γ .) 基因座重排中起重要作用并且对胸腺细胞和成熟 T 细胞具有明显刺激作用。参见例如 Friend 等, *Exp. Hematol.*, 22 :321-328, 1994 ;Ray 等, *Eur. J. Immunol.*, 26 :10-16, 1996 ;Candeias 等, *Immunology Letters*, 57 :9-14, 1997。

[0024] TSLP 具有与 IL-7 类似的细胞因子活性。例如, TSLP 可以取代 IL-7 刺激 B 细胞增殖应答 (Friend 等, 同上)。尽管 TSLP 和 IL-7 介导类似的对靶细胞的作用,但是它们似乎具有不同的信号传导途径并且可能具有不同的生物应答。例如,尽管 TSLP 调整 STAT5 的活性,但是其未能活化任何 Janus 家族酪氨酸激酶成员 (Levin 等, *J. Immunol.*, 162 :677-683, 1999)。

[0025] TSLP 对树突细胞和 TNF 生成的作用在人 TSLP 和人 TSLP 受体在 2001 年被克隆后,发现人 TSLP 有效活化不成熟的 CD11c+ 髓样树状细胞 (mDC) (参见例如, Reche 等, *J. Immunol.*, 167 :336-343, 2001 和 Soumelis 等, *Nat. Immunol.*, 3 :673-680, 2002)。Th2 细胞一般在免疫学教科书和文献中被定义产生 IL-4、IL-5、IL-13 和 IL-10 的 CD4+T 细胞。而 Th1 细胞 (例如 CD4+T 细胞) 产生 IFN- γ 和有时产生 TNF。当 TSLP-DC 用于在体外刺激未致敏的同种异体 CD4+T 细胞时, Th2 细胞的独特型被诱导,其产生经典的 Th2 细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 和大量 TNF,但很少或没有 IL-10 或干扰素 - γ (Reche 等, 同上) (还参见例如, Soumelis 等, *Nat. Immunol.*, 3 :673-680, 2002)。TNF 通常不被认为是 Th2 细胞因子。然而, TNF 在哮喘气道中是重要的,并且与增加的 TNF 分泌关联的基因型与增加的哮喘风险相关。参见 Shah 等, *Clin. Exp. Allergy.*, 25 :1038-1044, 1995 和 Moffatt, M. F. 和 Cookson, W. O., *Hum. Mol. Genet.*, 6 :551-554, 1997。

[0026] TSLP 诱导人 mDC 以在 mRNA 和蛋白质两个水平上表达 TNF 超家族蛋白 OX40L (Ito 等, *J. Exp. Med.*, 202 :1213-1223)。TSLP-DC 对 OX40L 的表达对于炎性 Th2 细胞的加工是重要的。因此, TSLP 活化的 DC 通过上调 OX40L 而不诱导 Th1 极化的细胞因子的生成而产生 Th2 许可的微环境。同上。

[0027] TSLP 表达、变应原特异性应答和哮喘在早期研究中,已经显示 TSLP mRNA 由人原

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

[0028] TSLP 受体 (TSLPR) 和变态反应、哮喘 TSLP 受体 (TSLPR) 是大约 50kDa 的蛋白并且与公共 γ -链具有显著相似性。TSLPR 是新的 1 型细胞因子受体, 其与 IL-7R α (CD127) 组合, 构成例如 Pandey 等, *Nat. Immunol.*, 1 :59-64, 2000 描述的 TSLP 受体复合物。TSLPR 在其羧基末端附近具有酪氨酸残基, 其可以与磷酸化 STAT5 缔合并结合 TSLP 时介导多种生物功能 (Isaksen 等, *J. Immunol.*, 168 :3288-3294, 2002)。

[0029] 人 TSLPR 由单核细胞和 CD11c⁺ 树状细胞表达, 并且 TSLP 结合诱导 T_H2 细胞吸引趋化因子 CCL17 和 CCL22 的表达。而且, 如上所述, TSLPR 诱导的树状细胞活化间接导致 T_H2 细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的分泌增加, 这可以能是调节 CD4⁺T 细胞体内平衡所必需的。在鼠中, TSLPR 的缺乏对淋巴细胞数目没有影响。然而, TSLPR 和公共 γ -链的缺乏导致与仅缺乏公共 γ -链的鼠相比更少的淋巴细胞。参见 Reche 等, *J. Immunol.*, 167 :336-343, 2001 和 Soumelis 等, *Nat. Immunol.*, 3 :673-680, 2002。

[0030] 研究发现, TSLP 和 TSLPR 在鼠中引发变应性疾病中起重要作用。在一项研究中, 证明了被改造为在皮肤中过表达 TSLP 的鼠发生特应性皮炎, 特征为含有炎性浸润的湿疹性皮肤损害、循环 Th2 细胞的急剧增加和血清 IgE 升高 (Yoo 等, *J. Exp. Med.*, 202 :541-549, 2005)。研究表明 TSLP 可以直接活化鼠中的 DC。在 Li 等进行的另一项研究中, 该研究组证实在皮肤中过表达 TSLP 的转基因鼠发生特应性皮炎, 这加强了 TSLP 与发生特应性皮炎之间的关联。

[0031] 另一组研究证明, TSLP 是在鼠体内引发变应性气道炎症所需要的。在一项研究中, Zhou 等证明了 TSLP 转基因的肺特异性表达诱导了变应性气道炎症 (哮喘), 其特征为大量白细胞浸润 (包括 Th2 细胞)、杯状细胞增生和上皮纤维化, 以及增加的血清 IgE 水平 (Zhou 等, *Nat. Immunol.*, 6 :1047-1053, 2005)。然而, 相反, 缺乏 TSLPR 的鼠未能响应吸入的抗原而发生哮喘 (Zhou 等, 同上, 和 Al-Shami 等, *J. Exp. Med.*, 202 :829-839, 2005)。因此, 这些研究一起证明了 TSLP 是引发鼠变应性气道炎症所需要的。

[0032] 另外, 在 Yong-Jun 等进行的的研究中, 证明了上皮细胞衍生的 TSLP 在人中促发 DC 介导的炎性 Th2 应答, 这表明 TSLP 是上皮细胞-DC 界面的变应性炎症的总开关 (Yong-Jun 等, *J. Exp. Med.*, 203 :269-273, 2006)。

[0033] 在最近研究中显示, 通过抑制 TSLPR 对 DC 功能的调整减轻了鼠中的严重度 (Liyun Shi 等, *Clin. Immunol.*, 129 :202-210, 2008)。在另一组研究中, 证明 TSLPR 不仅在 DC 中表达, 而且在巨噬细胞、肥大细胞和 CD4⁺T 细胞上表达 (Rochman 等, *J. Immunol.*, 178 :6720-6724, 2007, 和 Omori M. 和 Ziegler S., *J. Immunol.*, 178 :1396-1404, 2007)。为了排除 TSLPR 中和对 CD4⁺T 细胞或变应性炎症中其他效应细胞的直接影响, Liyun Shi 等进行了实验, 其中 OVA- 负载的 DC 在过继转移至未致敏鼠气道之前用抗 TSLPR 体内治疗。之前已

经发现, OVA-DC 促发强嗜酸性气道炎症并伴随诸如 IL-4 和 IL-5 等 Th2 细胞因子的大量产生 (Sung 等, J. Immunol., 166 :1261-1271 和 Lambrecht 等, J. Clin. Invest., 106 :551-559, 2000)。然而, 用抗-TSLPR 预治疗 OVA-DC 导致嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润以及 IL-4 和 IL-5 水平的显著下降, 进一步说明了 TSLPR 在 DC 引发的变应性疾病中起的作用。该结果还支持 TSLPR 对 DC 的阻断将帮助控制气道炎症 (Liyun Shi 等, 同上)。

[0034] 有越来越多的实验涉及 TSLP/TSLPR 在各种生理和病理过程中的作用。TSLP 的生理学作用包括调整免疫系统, 特别是刺激 B 和 T 细胞增殖、发育和成熟。TSLP 在变应性哮喘的病理学和局部抗体介导的 TSLP 受体功能阻断以缓解变应性疾病中起至关重要的作用。因此, TSLP 和 TSLP 受体之间的相互作用被认为在许多生理疾病过程中是重要的, 并且能够显著减少许多神经变性疾病中的炎症, 所述神经变性疾病例如: MS、帕金森病、阿尔茨海默病、卒中 / 脑缺血、头部创伤、脊髓损伤、亨廷顿病、偏头痛、大脑淀粉样血管病、AIDS、年龄相关的认知衰退; 轻度认知损害和哺乳动物朊病毒病。

[0035] 发明概述

[0036] 特定方面提供用于治疗炎性神经变性病或疾病的方法, 包括向需要所述治疗的受试者施用治疗有效量的电动改变的水性流体, 所述电动改变的水性流体包括电荷稳定的含氧纳米结构的离子水溶液, 所述纳米结构基本上具有小于约 100 纳米的平均直径并在离子水性流体中稳定成形, 其量足以在所述流体接触活细胞时提供对细胞膜电位和细胞膜电导率中至少一种的调整, 其中炎性神经变性疾病或其至少一种症状被治疗。在某些方面, 电荷稳定的含氧纳米结构是流体中主要的电荷稳定的含气体纳米结构物种。

[0037] 根据其他方面, 流体中作为电荷稳定的含氧纳米结构存在的溶解氧分子的百分比是选自以下组成的组的百分比: 大于 0.01%、大于 0.1%、大于 1%、大于 5% ; 大于 10% ; 大于 15% ; 大于 20% ; 大于 25% ; 大于 30% ; 大于 35% ; 大于 40% ; 大于 45% ; 大于 50% ; 大于 55% ; 大于 60% ; 大于 65% ; 大于 70% ; 大于 75% ; 大于 80% ; 大于 85% ; 大于 90% ; 和大于 95%。在某些方面, 总溶解氧基本上以电荷稳定的含氧纳米结构存在。在其他方面, 电荷稳定的含氧纳米结构基本上具有小于选自以下组成的组的尺寸的平均直径: 90nm ; 80nm ; 70nm ; 60nm ; 50nm ; 40nm ; 30nm ; 20nm ; 10nm ; 和小于 5nm。根据某些方面, 离子水溶液包括盐水溶液。在其他方面, 所述流体是超氧合的。在某些方面, 所述流体包含溶剂化电子形式。

[0038] 根据某些方面, 电动改变的水性流体的改变包括所述流体暴露于流体动力诱导的局部电动效应。在其他方面, 暴露于局部电动效应包括暴露于电压脉冲和电流脉冲的至少一种。在某些方面, 所述流体暴露于流体动力诱导的局部电动效应包括所述流体暴露于用以产生流体的装置的诱导电动效应的结构元件。

[0039] 根据某些方面, 炎性神经变性病或疾病包括选自以下组成的组的至少一种: 多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、卒中 / 脑缺血、头部创伤、脊髓损伤、亨廷顿病、偏头痛、大脑淀粉样血管病、与 AIDS 相关的炎性神经变性病、年龄相关的认知衰退; 轻度认知损害和哺乳动物朊病毒病。根据其他方面, 炎性神经变性病或疾病包括多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病中的至少一种。在其他方面, 炎性神经变性病或疾病包括多发性硬化。

[0040] 根据某些方面, 炎症的至少一种症状与选自以下组成的组的至少一种病症相

关：中枢神经和脑中的慢性炎症以及中枢神经和脑中的急性炎症。在其他方面，电动改变的水性流体调整一氧化氮的局部或细胞水平。根据其他方面，电动改变的水性流体促进选自自由以下组成的组的至少一种细胞因子在施用部位的局部减少：IL-1 β 、IL-8、TNF- α 和 TNF- β 。其他方面包括通过同时或附加地用另一种抗炎剂治疗受试者来协同或非协同抑制或减少炎症。

[0041] 根据某些方面，所述其他抗炎剂包括类固醇或糖皮质激素类固醇。在其他方面，糖皮质激素类固醇包括布地奈德或其活性衍生物。其他方面包括组合疗法，其中至少一种另外的治疗剂被施用至患者。在其他方面，至少一种另外的治疗剂选自自由以下组成的组：乙酸格拉默、干扰素- β 、米托蒽醌、那他珠单抗；MMP 抑制剂，包括 MMP-9 和 MMP-2 的抑制剂；短效 β_2 -激动剂、长效 β_2 -激动剂、抗胆碱能药、皮质类固醇、全身性皮质类固醇、肥大细胞稳定剂、白三烯调节剂、甲基黄嘌呤、 β_2 -激动剂、沙丁胺醇、左旋沙丁胺醇、吡布特罗、阿福特罗、福莫特罗、沙美特罗；抗胆碱能药，包括异丙托铵和噻托溴铵；皮质类固醇，包括倍氯米松、布地奈德、氟尼缩松、氟地松、莫米松、氟羟脱氢皮质甾醇、甲基强的松龙、强的松龙、强的松；白三烯调节剂，包括孟鲁司特、扎鲁司特和弃留通；肥大细胞稳定剂，包括色甘酸和奈多罗米；甲基黄嘌呤，包括茶碱；组合药物，包括异丙托铵和沙丁胺醇、氟地松和沙美特罗、布地奈德和福莫特罗；抗组胺药，包括羟嗪、苯海拉明、氯雷他定、西替利嗪和氢化可的松；免疫系统调节药，包括他克莫司和吡美莫司；环孢霉素；硫唑嘌呤；麦考酚酸吗乙酯；及其组合。根据其他方面，所述至少一种另外的治疗剂是 TSLP 和 / 或 TSLPR 拮抗剂。根据某些方面，TSLP 和 / 或 TSLPR 拮抗剂选自自由以下组成的组：特异性针对以下各项的中和抗体：TSLP 与 TSLP 受体、可溶性 TSLP 受体分子和 TSLP 受体融合蛋白，包括 TSLPR 免疫球蛋白 Fc 分子或编码超过一个受体链的组分的多肽。

[0042] 根据其他方面，改变细胞膜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。在某些方面，膜相关蛋白包括选自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、细胞黏附蛋白、整联蛋白等。在其他方面，跨膜受体包括 G 蛋白偶联受体 (GPCR)。在某些方面，G 蛋白偶联受体 (GPCR) 与 G 蛋白 α 亚基相互作用。根据其他方面，G 蛋白 α 亚基包括选自自由以下组成的组的至少一种： $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{12}$ 。在某些其他方面，至少一种 G 蛋白 α 亚基是 $G\alpha_q$ 。

[0043] 其他方面涉及改变细胞膜结构或功能，包括改变膜电导率或膜电位。在其他方面，调整细胞膜电导率包括调整全细胞电导。其他方面涉及调整全细胞电导，包括调整全细胞电导的至少一种电压依赖性贡献。在某些方面，调整细胞内信号转导包括调整钙依赖性细胞通信途径或系统。在其他方面，调整细胞内信号转导包括调整磷脂酶 C 活性。

[0044] 在某些方面，调整细胞内信号转导包括调整腺苷酸环化酶 (AC) 活性。其他方面涉及调整细胞内信号转导，包括调整与至少一种病症或症状有关的细胞内信号转导，所述病症或症状选自自由以下组成的组：中枢神经和脑中的慢性炎症以及中枢神经和脑中的急性炎症。其他方面包括施用至细胞网或层，并且进一步包括调整其中的细胞内连接。在其他方面，细胞内连接包括选自自由紧密连接、间隙连接、黏附区和桥粒组成的组的至少一种。在某些方面，细胞网或层包括选自自由以下组成的组的至少一种：CNS 脉管中的内皮细胞和内皮星形细胞紧密连接、血-脑脊髓液紧密连接或屏障、肺上皮细胞型连接、支气管上皮细胞型连接和肠上皮细胞型连接。

[0045] 在其他方面,电动改变的水性流体是氧合的,并且其中流体中的氧在大气压下以至少 8ppm、至少 15ppm、至少 25ppm、至少 30ppm、至少 40ppm、至少 50ppm 或至少 60ppm 氧的量存在。在某些方面,电动改变的水性流体包括溶剂化电子形式和电动改性或荷电的氧物种中的至少一种。在其他方面,溶剂化电子或电动改性或荷电的氧物种以至少 0.01ppm、至少 0.1ppm、至少 0.5ppm、至少 1ppm、至少 3ppm、至少 5ppm、至少 7ppm、至少 10ppm、至少 15ppm 或至少 20ppm 的量存在。在其他方面,电动改变的氧合水性流体包括至少部分由分子氧稳定的溶剂化电子。在某些其他方面,足以提供对细胞内信号转导的调整的改变细胞膜结构或功能的能力在封闭的气密容器中持续至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 12 个月或更长时期。

[0046] 其他方面提供治疗组合物,包括本文所述的电动改变的氧合水性流体或溶液,并且包括在上述组合物中(和任选与至少一种其他治疗剂组合),其中所述流体或溶液中氧的存在量为至少 8ppm、至少 15ppm、至少 25ppm、至少 30、至少 40、至少 50 或至少 60ppm 氧。在某些实施方案中,电动改变的氧合水性流体或溶液包括电动改性或荷电的氧物种。在特定方面,电动改性或荷电的氧物种的存在量为至少 0.5ppm、至少 1ppm、至少 3ppm、至少 5ppm、至少 7ppm、至少 10ppm、至少 15ppm 或至少 20ppm。在某些实施方案中,电动改变的氧合水性流体或溶液包括由分子氧稳定的溶剂化电子。在特定方面,溶剂化电子的存在量为至少 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。

[0047] 其他实施方案涉及治疗组合物,包括本文所述的电动产生的富含气体的流体,其中所述流体含有在大气压下大于约 30ppm 水平的扩散或溶解气体,并且其中所述富含气体的流体含有溶剂化电子。在这些实施方案的某些中,所述富含气体的流体包括电动改变的离子富氧的水。

[0048] 特定方面提供一种组合物,包括电动改变的氧合离子水性流体或溶液,其中所述流体或溶液中氧的存在量为至少 25ppm、至少 30、至少 40、至少 50 或至少 60ppm 氧。在特定实施方案中,电动改变的氧合水性流体或溶液包括电动改性或荷电的氧物种。在某些方面,电动改性或荷电的氧物种以至少 0.5ppm、至少 1ppm、至少 3ppm、至少 5ppm、至少 7ppm、至少 10ppm、至少 15ppm 或至少 20ppm 的量存在。在特定实施方案中,电动改变的氧合水性流体或溶液包括由分子氧稳定的溶剂化电子。在某些方面,所述溶剂化电子以至少 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。

[0049] 在某些方面,所述氧合水性流体或溶液包括由分子氧稳定的溶剂化电子。在特定实施方案中,所述溶剂化电子以至少 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。

[0050] 附图简述

[0051] 图 1 是现有技术混合装置的局部横截面、局部框图。

[0052] 图 2 是混合装置的示例性实施方案的框图。

[0053] 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。

[0054] 图 4 是图 2 的混合装置顶端部分的不完全局部横截面视图。

[0055] 图 5 是图 2 的混合装置第一侧面部分的不完全横截面视图。

- [0056] 图 6 是图 2 的混合装置第二侧面部分的不完全局部横截面视图。
- [0057] 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全横截面视图。
- [0058] 图 8 是图 2 的混合装置的转子和定子的透视图。
- [0059] 图 9 是图 2 的混合装置的第一室内部的透视图。
- [0060] 图 10 是包括泵 410 的替代实施方案的图 2 的混合装置的第一室内部的不完全横截面视图。
- [0061] 图 11 是图 2 的混合装置的第二室内部的透视图。
- [0062] 图 12 是混合装置的替代实施方案的侧面部分的不完全横截面视图。
- [0063] 图 13 是供混合装置的替代实施方案使用的壳体的中部替代实施方案的透视图。
- [0064] 图 14 是供混合装置的替代实施方案使用的轴承壳体的替代实施方案的不完全横截面视图。
- [0065] 图 15 是通过垂直于旋转轴的平面而取得的图 2 的混合装置的混合室的横截面视图,描绘了当转子的通孔接近(但不对齐)定子的孔隙时由空泡引起的旋转流类型。
- [0066] 图 16 是通过垂直于旋转轴的平面而取得的图 2 的混合装置的混合室的横截面视图,描绘了当转子的通孔对齐定子的孔隙时由空泡引起的旋转流类型。
- [0067] 图 17 是通过垂直于旋转轴的平面而取得的图 2 的混合装置的混合室的横截面视图,描绘了当之前对齐定子的孔隙的转子的通孔不再与其对齐时由空泡引起的旋转流类型。
- [0068] 图 18 是转子的替代实施方案的侧视图。
- [0069] 图 19 是通过垂直于转子的旋转轴的平面而取得的放大的不完全横截面视图,描绘了在转子中形成的通孔和在定子中形成的通孔的交替构型。
- [0070] 图 20 是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全横截面视图,描绘了在转子中形成的通孔和在定子中形成的通孔的构型。
- [0071] 图 21 是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全横截面视图,描绘了在转子中形成的通孔和在定子中形成的通孔的替代偏移构型。
- [0072] 图 22 是可用来构建转子的通孔和 / 或定子的孔隙的形状的图解。
- [0073] 图 23 是可用来构建转子的通孔和 / 或定子的孔隙的形状的图解。
- [0074] 图 24 是可用来构建转子的通孔和 / 或定子的孔隙的形状的图解。
- [0075] 图 25 是可用来构建转子的通孔和 / 或定子的孔隙的形状的图解。
- [0076] 图 26 是在表面附近形成的双电层 (“EDL”) 的图解。
- [0077] 图 27 是混合室的内部的模型的透视图。
- [0078] 图 28 是图 27 的模型的横截面视图。
- [0079] 图 29 是实验装置的图解。
- [0080] 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。
- [0081] 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。
- [0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 图 34 图解了另外一个实验,其中图 2 的混合装置用于通过使用图 2 的混合装置中的氮气处理水来从水中喷射氧。

[0085] 图 35 图解了在标准的温度和压力下通过图 2 的混合装置从水中喷射氧。

[0086] 图 36 是示例性纳米笼 (nanocage) 的图解。

[0087] 图 37A 和 37B 图解了富氧的流体的瑞利散射效应;

[0088] 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特征。

[0089] 图 39 图解了在各种溶解氧饱和比下假单胞菌属 (Pseudomonas) 细菌的生长速率的差异。

[0090] 图 40A 和 40B 图解了使用富氧的细胞培养基和不富含气体的培养基的伤口体外愈合。

[0091] 图 41A 到 41F 示出真皮和表皮体内伤口愈合的组织学横切片。

[0092] 图 42 图解了用来检测酸性粘多糖例如透明质酸的处理和对照的愈合伤口中 Hale 染色的表达;

[0093] 图 43 图解了用来检测处理和对照的愈合伤口中血管发生的 Willebrand 因子染色的表达;

[0094] 图 44 图解了用来检测处理和对照的愈合伤口中弹性蛋白的 Luna 染色的检测;

[0095] 图 45 图解了对于处理和对照的愈合伤口的每个视野的肥大细胞的数目。

[0096] 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分开的时间点的死细胞的百分比。

[0097] 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。

[0098] 图 48 图解了在加压罐氧合的流体 (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。

[0099] 图 49-58 示出细胞因子的全血样品评估结果。

[0100] 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。

[0101] 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,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发明公开的专利的富含气体的盐水流体中亲和力增加。与 B2 受体结合的缓激肽的稳定示于图 75 中。

[0102] 图 76-83 示出显示本文公开的具体实施方案影响调节性 T 细胞的能力的数据。该研究涉及辐射抗原提呈细胞并引入抗原和 T 细胞。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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;本发明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。

[0106] 图 95 和 96 示出支持局部电动效应 (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。

[0107] 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告分子海藻糖溶质的 ^{13}C -NMR 线宽。

[0108] 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波谱在 -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波谱中是不存在的。

[0109] 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。

[0110] 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保护免受醋甲胆碱诱导的支气管收缩。

[0111] 图 109-114 示出为评定本发明的电动产生的流体在 Brown 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粒细胞计数,示出在降低嗜酸性粒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 Eotaxin (嗜酸性粒细胞趋化因子) 的血液水平,在用本发明的电动产生的流体 (例如 RNS-60) 单独或连同布地奈德一起处理所产生的激发后 6 小时显著增强两种主要的抗炎细胞因子 IL10 和干扰素 γ 的血液水平,并且降低了 Rantes 的全身水平。数据示出存在布地奈德 $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ 与本发明的电动产生的流体 (例如 RNS-60) 的实质的协同效应。

[0112] 图 115 示出本发明的电动产生的流体 (例如 RNS-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。

[0113] 图 116 示出本发明的电动产生的流体 (例如 RNS-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 MMP-9 水平大约 80% 和 70%, 而生理盐水 (NS) 仅有边际效应。

[0114] 图 117A-C 证实一系列膜片钳实验的结果,所述实验在两个时间点 (15 分钟 (左组) 和 2 小时 (右组)) 和不同的电压方案中评价电动产生的流体 (例如 RNS-60 和 Solas) 对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0115] 图 118A-C 涉及图 117A-C 所涉及的实验,其示出在 3 种电压方案中 (A, 从 0mV 阶跃; B, 从 -60mV 阶跃; C, 从 -120mV 阶跃) 和 2 个时间点 (15 分钟 (空心圆) 和 2 小时 (实

心圆)), RNS-60 电流数据减去 Solas 电流数据所得到的图。

[0116] 图 119A-D 证实一系列膜片钳实验的结果,所述实验利用不同的外部盐溶液和在不同的电压方案中(A和C组显示从 0mV 的阶跃,而 B 和 D 组显示从 -120mV 的阶跃)评价电动产生的流体(例如 Solas(A 和 B 组)和 RNS-60(C 和 D 组))对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。

[0117] 图 120A-D 涉及图 119A-D 所涉及的实验,其示出对于 Solas(A 和 B 组)和 Revera 60(C 和 D 组),在 2 种电压方案中(A 和 C 组,从 0mV 阶跃;以及 B 和 D 组,从 -120mV 阶跃)从 20mM CaCl_2 (菱形符号)和 40mM CaCl_2 (方形符号)电流数据中减去 CsCl 电流数据(显示于图 119 中)所得到的图。

[0118] 图 121A 示出对 RNS60-1(rns60-11 μm 3D. jpg)的 1mm^2 AFM 扫描。小峰(“1”)表示疏水性纳米气泡,其具有 $\sim 20\text{nm}$ 宽和 $\sim 1.5\text{nm}$ 高或者更小。

[0119] 图 121B 示出对 PNS60-1(pp60-11 μm 3d. jpg)的 1mm^2 扫描。该扫描揭示出峰(“2”)(疏水性纳米气泡),其基本上大于($\sim 60\text{nm}$ 宽和 $\sim 5\text{nm}$ 高)RNS60-1 所观察到的峰。

[0120] 图 122 示出本发明电动流体(RHS-60)对于在多发硬化(MS)的本领域公认的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)大鼠模型中基本上是有有效用的。

[0121] 图 123 示出图 122 中所示的实验中使用的 EAE 诱导和治疗方案的示意性描述。

[0122] 发明详述

[0123] 本文所公开的某些实施方案涉及提供通过以下来治疗炎性神经变性疾病和/或多发性硬化的至少一种症状的组合物和方法:使部位与包含新的电动产生的流体的治疗组合物接触或向受试者施用包含新的电动产生的流体的治疗组合物。在某些具体实施方案中,电动产生的流体包括富含气体的电动产生的流体,该流体包括富氧的水。

[0124] 多发性硬化和病症

[0125] 本文的某些实施方案涉及通过预防或缓解多发性硬化和/或相关病症或疾病的至少一种症状来治疗受试者的治疗组合物和方法。

[0126] 本文的又一实施方案涉及预防或缓解与多发性硬化和/或相关病症有关的并发症的治疗组合物和治疗方法,所述方法包括例如缓解认知损害的症状。

[0127] 电动产生的流体:

[0128] 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示例性混合装置(还参见 US200802190088 和 W02008/052143,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氧合的非电动流体(例如压力罐氧合的流体及类似物)的新颖的且从根本上不同的流体。如在本文各方面中所公开的那样,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:

[0129] 在具体的方面,电动改变的水性流体包含电荷稳定的含氧纳米结构的离子水溶液,所述纳米结构实质上具有小于约 100 纳米的平均直径并在离子水性流体中稳定形成,其量足以提供在流体与活细胞接触之后对细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的调整。

[0130] 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。

[0131] 在具体的方面,电动改变的水性流体适合于调节其中溶解的报告溶质(例如海藻糖(Trehelose))的¹³C-NMR线宽。NMR线宽效应是在测量例如在具体工作实施例中如本文所述的测试流体中的溶质“翻滚”的间接方法中。

[0132] 在具体的方面,电动改变的水性流体的特征为以下至少一种:在-0.14V、-0.47V、-1.02V和-1.36V的任何一个的与众不同的方波伏安峰差异;在-0.9伏特的极谱峰;以及在-0.19和-0.3伏特不存在极谱峰,在-0.19和-0.3伏特的极谱峰是具体工作实施例中本文所公开的电动产生的流体所独有的。

[0133] 在具体的方面,电动改变的水性流体适合于改变细胞膜电导率(例如在本文公开的膜片钳研究中测量的全细胞电导的电压依赖性贡献)。

[0134] 在具体的方面,电动改变的水性流体是氧合的,其中在该流体中的氧的存在量为大气压下至少15ppm、至少25ppm、至少30ppm、至少40ppm、至少50ppm或至少60ppm的溶解氧。在具体的方面,电动改变的水性流体具有小于15ppm、小于10ppm的大气压下的溶解氧或大致环境氧水平。

[0135] 在具体的方面,电动改变的水性流体是氧合的,其中在该流体中的氧的存在量在大约8ppm与大约15ppm之间,并且在这种情况中有时在本文称作“Solus”。

[0136] 在具体的方面,电动改变的水性流体包括溶剂化电子(例如,通过分子氧稳定)和电动改性和/或带电的氧物种的至少一种,并且其中在某些实施方案中所述溶剂化电子和/或电动改性或带电的氧物种的存在量为至少0.01ppm、至少0.1ppm、至少0.5ppm、至少1ppm、至少3ppm、至少5ppm、至少7ppm、至少10ppm、至少15ppm或至少20ppm。

[0137] 在具体的方面,电动改变的水性流体适合于改变细胞膜的结构或功能(例如改变膜相关蛋白的构象、配体结合活性或催化活性)至足以提供对细胞内信号转导的调节,其中在具体的方面,所述膜相关蛋白包括选自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、细胞粘附蛋白和整联蛋白。在某些方面,发挥效应的G蛋白偶联受体(GPCR)与G蛋白的 α 亚基(例如 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 和 $G\alpha_{12}$)相互作用。

[0138] 在具体的方面,电动改变的水性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)。

[0139] 在具体的方面,电动改变的水性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)。

[0140] 在具体的方面,电动改变的水性流体表现出与乙酸格拉默干扰素- β 、米托蒽醌和/或那他珠单抗的协同作用。在具体的方面,电动改变的水性流体降低如本文工作实施例所示的支气管上皮细胞(BEC)中的DEP诱导的TSLP受体的表达。

[0141] 在具体的方面,电动改变的水性流体抑制在支气管上皮细胞(BEC)中DEP诱导的细胞表面结合的MMP9水平,如本文工作实施例中所示。

[0142] 在具体的方面,电动改变的水性流体的生物效应被白喉毒素抑制,表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙离子阻断影响电动改变的水性流体的活性(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。

[0143] 在具体的方面,电动改变的水性流体的物理和生物效应(例如改变细胞膜的结构或功能至足以提供对细胞内信号转导的调节的能力)在一个封闭的容器(例如,封闭的气密容器)中持续了至少两个月、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。

[0144] 因此,其他方面提供所述电动产生的溶液和制备电动改变的氧合的水性流体或溶液的方法,所述方法包括:在相对运动的两个间隔的表面间提供流体材料流,并且在所述两个间隔的表面间界定混合体积,其中流动的流体材料在混合体积内和穿过混合体积的单次通过的滞留时间为大于 0.06 秒或大于 0.1 秒;和在适于将至少 20ppm、至少 25ppm、至少 30、至少 40、至少 50 或至少 60ppm 的氧(O_2)溶解在材料中并电动改变流体或溶液的条件下将氧引入混合体积内的流动的流体材料。在某些方面,在小于 100 毫秒、小于 200 毫秒、小于 300 毫秒或小于 400 毫秒内将氧注入材料中。在具体实施方案中,表面积与体积比为至少 12、至少 20、至少 30、至少 40 或至少 50。

[0145] 其他方面提供制备电动改变的氧合的水性流体或溶液的方法,所述方法包括:在两个间隔的表面间提供流体材料流,所述两个间隔的表面在其间界定了混合体积;在适于在小于 100 毫秒、小于 200 毫秒、小于 300 毫秒或小于 400 毫秒内将至少 20ppm、至少 25ppm、至少 30、至少 40、至少 50 或至少 60ppm 的氧扩散到材料中的条件下将氧引入在混合体积中的流动的材料中。在某些方面,在混合体积内的所述流动的材料滞留时间为大于 0.06 秒或大于 0.1 秒。在具体实施方案中,表面积与体积比为至少 12、至少 20、至少 30、至少 40 或至少 50。

[0146] 另外的实施方案提供制备电动改变的氧合的水性流体或溶液的方法,所述方法包括使用用于通过混合第一材料和第二材料来产生输出混合物的混合装置,所述装置包括:第一室,其被构造为接纳来自第一材料来源的第一材料;定子;具有旋转轴的转子,所述转子被设置在定子内并且被构造为环绕其中的旋转轴旋转,所述转子和定子的至少一个具有多个通孔;在转子和定子之间界定的混合室,所述混合室与第一室流体联通并且被构造为接纳来自第一室的第一材料,并且所述第二材料经由转子和定子中的一个中所形成的多个通孔供给混合室;第二室,其与混合室流体联通并且被构造为接纳来自混合室的输出材料;以及安装在第一室内的第一内部泵,所述第一内部泵被构造为将第一材料从第一室抽吸到混合室中。在某些方面,第一内部泵被构造为在第一材料进入混合室之前对第一材料施加以圆周速度。

[0147] 其他实施方案提供制备电动改变的氧合的水性流体或溶液的方法,所述方法包括使用用于通过混合第一材料和第二材料来产生输出混合物的混合装置,所述装置包括:定子;具有旋转轴的转子,所述转子被设置在定子内并且被构造为环绕其中的旋转轴旋转;在转子和定子之间界定的混合室,所述混合室具有:开放的第一末端,第一材料通过该开放的第一末端进入混合室;和开放的第二末端,输出材料通过该开放的第二末端离开混合室,第二材料通过转子和定子的至少一个进入混合室;第一室,其与所述混合室的开放的第一末端的至少大部分联通;以及第二室,其与所述混合室的开放的第二末端联通。

[0148] 其他方面提供根据上述方法的任何一种制备的电动改变的氧合的水性流体或溶液。

[0149] 炎症

[0150] 炎症可以作为对外来材料尤其是微生物来源入侵受试者的防御性反应产生。此外,机械创伤、毒素和瘤形成可以诱导炎性反应。白细胞的积聚和随后的激活是大部分形式的炎症发病的中心事件。炎症的缺乏可能危害宿主,使其对恶化的感染或创伤敏感。诸如延长的炎性反应的过量炎症可能导致炎性疾病,所述炎性疾病包括但不限于:糖尿病、动脉硬化、白内障、慢性皮肤病、再灌注损伤和癌症;感染后综合征,例如感染性脑膜炎、风湿热;以及风湿性疾病,如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎。这些疾病每年影响着世界范围内数百万的人们,并且引起死亡率和发病率增加。这些不同疾病过程中炎性反应的共性使得其调节成为预防或治疗人类疾病的主要要素。

[0151] 促炎性细胞因子的过量产生参与了大量炎性疾病和自身免疫疾病的发病。TNF α 分泌是炎性级联引发的主要事件 (Brennan F. M., 等人 . Lancet, 1989, 2 :244-7 ;Haworth C, 等人 Eur. J. Immunol. 1991, 21 :2575-2579) 并且其直接促进这些疾病的引发和维持。其他细胞因子也发挥作用,包括白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8、IL-12、一氧化氮 (NO)、IFN- γ 、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及 IL-10。这些细胞因子的某些 (例如, IL-8) 可以增加或加重炎性反应,而其他 (例如, IL-10) 可以降低或减轻炎性反应。

[0152] 免疫系统的细胞尤其是巨噬细胞会对激活性刺激物反应而分泌这些细胞因子中的一些。细胞因子的靶细胞可以在任何身体隔室局部化并且可经由长距离机制作用或可以作用于邻近的细胞。因此,细胞因子可以以局部的或全身的方式调控炎症。

[0153] 金属蛋白酶

[0154] 金属蛋白酶是蛋白酶 (酶) 的超家族,被分为家族 (families) 和亚家族 (subfamilies),如例如 N. M. Hooper FEBS Letters 354 :1-6, 1994 所描述的。金属蛋白酶的例子包括基质金属蛋白酶 (MMP), 例如胶原酶 (MMP1、MMP8、MMP13), 明胶酶 (MMP2、MMP9), 间质溶解素 (MMP3、MMP10、MMP 11), 基质溶解因子 (MMP7), 金属弹性蛋白酶 (MMP12), 溶牙釉质素 (MMP19), MT-MMP (MMP14、MMP15、MMP16、MMP17); 包括分泌酶和 sheddase (例如 TNF 转换酶 (ADAM10 和 TACE)) 的 reprotolysin 或蛇毒金属蛋白酶 (adamalysin) 或 MDC 家族; 包括例如前胶原加工蛋白酶 (PCP) 的虾红素家族; 以及例如蛋白聚糖酶, 内皮素转换酶家族和血管紧张素转换酶家族的其他金属蛋白酶。总之, 已知金属蛋白酶裂解宽范围的基质物质, 例如, 胶原蛋白, 蛋白聚糖, 纤连蛋白。金属蛋白酶参与生物学重要的细胞介质的加工或分泌, 所述细胞介质例如肿瘤坏死因子 (TNF); 和后翻译蛋白水解过程或生物学重要的膜蛋白的脱落, 例如, 低亲和性 IgE 受体 CD23 (例如参见 N. M. Hooper 等, Biochem. J. 321 : 265-279, 1997)。

[0155] 不令人惊讶的是, 因此, 相信金属蛋白酶在许多生理疾病过程中是重要的, 所述生理疾病过程包括组织重塑 (例如, 胚胎发育, 骨形成, 月经期间的子宫重塑等)。而且, 抑制一种或多种金属蛋白酶的活性可在下列疾病或病症中有益, 例如: 各种炎症和变应性疾病, 例如, 关节炎 (尤其是风湿性关节炎, 骨关节炎和痛风), 胃肠道炎症 (尤其是炎性肠病, 溃疡性结肠炎和胃炎), 皮肤炎症 (尤其是银屑病, 湿疹, 皮炎); 肿瘤转移或侵袭; 与细胞

外基质不受控制的降解有关的疾病,例如,骨关节炎;骨再吸收疾病(例如,骨质疏松症和佩吉特病(Paget's disease));与异常的血管生成有关的疾病;与糖尿病有关的增强的胶原蛋白重塑;牙周病(例如牙龈炎),角膜溃疡,皮肤溃疡,术后病症(例如结肠吻合术)和皮肤伤口愈合;中枢和外周神经系统的脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化);阿尔茨海默病;在心血管疾病(例如,再狭窄和动脉粥样硬化)中观察到的细胞外基质重塑;哮喘;鼻炎以及慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0156] MMP12 也被称为巨噬细胞弹性蛋白酶或金属弹性蛋白酶,它开始在小鼠中克隆(Shapiro等,Journal of Biological Chemistry 267:4664,1992)并也已由相同的研究组于1995年在男性中克隆。MMP12 优先在激活的巨噬细胞中表达并已表现出由吸烟者的肺泡巨噬细胞分泌(Shapiro等,1993,Journal of Biological Chemistry,268:23824)以及在粥样硬化病变的泡沫细胞中分泌(Matsumoto等,Am. J. Pathol. 153:109,1998)。COPD 的小鼠模型基于吸烟六个月的小鼠(每天两支烟,一周六天)的激发。野生小鼠在这种处理后发展为肺气肿。当测试 MMP12 敲除的小鼠时,在该模型中没有发生显著的肺气肿,这强烈地说明 MMP12 是 COPD 发病机制中的关键的酶。COPD 中 MMP(例如,MMP12)的作用在 Anderson 和 Shinagawa,1999,Current Opinion in Anti-inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs 1(1):29-38 中讨论。最近发现吸烟增加在人颈动脉斑块中巨噬细胞浸润以及巨噬细胞来源的 MMP12 的表达(Matetzky S, Fishbein M C 等., Circulation 102:(18),36-39 Suppl. S, Oct. 31, 2000)。

[0157] MMP9-(明胶酶 B,92kDa-IV 型胶原蛋白酶;92kDa 明胶酶)是于 1989 年首次纯化然后克隆并测序的分泌蛋白(S. M. Wilhelm 等, J. Biol. Chem. 264(29):17213-17221, 1989;于 J. Biol. Chem. 265(36):22570,1990 中出版勘误表)(关于该蛋白酶的详细信息和参考文献的综述请参见 T. H. Vu & Z. Werb(1998)(见:Matrix Metalloproteinases(基质金属蛋白酶),1998, W. C. Parks & R. P. Mecham 编辑,115-148 页, Academic Press. ISBN 0-12-545090-7)。MMP9 的表达一般限制于几种细胞类型,包括滋养母细胞、破骨细胞,中性粒细胞和巨噬细胞(Vu & Werb,同上)。然而,表达可由几种介质在这些相同的细胞和其他细胞类型中诱导,包括细胞暴露于生长因子或细胞因子。这些相同的介质通常参与炎症反应的启动。如同其他的分泌 MMP, MMP9 作为无活性酶原被释放,该无活性酶原随后裂解以形成酶促的活性酶。体内对这种激活所需的蛋白酶还未知。活性 MMP9 相对于无活性酶的平衡进一步在体内通过与 TIMP-1(金属蛋白酶-1 的组织抑制剂,天然存在的蛋白质)的相互作用来调节。TIMP-1 与 MMP9 的 C 端区域结合,导致 MMP9 的催化结构域的抑制。MMP9 原(ProMMP9)的诱导表达、MMP9 原裂解为活性 MMP9 以及 TIMP-1 的存在的平衡结合起来确定存在于局部部位处的催化活性 MMP9 的量。蛋白水解活性 MMP9 攻击包括明胶、弹性蛋白和天然的 IV 和 V 型胶原蛋白在内的底物;其针对天然的 I 型胶原蛋白、蛋白聚糖或层粘连蛋白没有活性。越来越多的数据说明 MMP9 在各种生理学和病理学过程中的作用。生理学作用包括在胚胎植入的早期胚胎滋养母细胞通过子宫上皮的侵入;在骨生长和发育中的一些作用;和炎症细胞从脉管系统移动至组织。

[0158] 使用酶免疫测定法测量,与其他人群相比,来自于未治疗的哮喘患者的体液和 AM 上清液中的 MMP9 释放显著提高(Am. J. Resp. Cell & Mol. Biol., 5:583-591,1997)。此外,在某些其他病理学条件下已观察到 MMP9 的表达增加,从而说明 MMP9 参与许多疾病过程中,

例如 COPD、关节炎、肿瘤转移、阿尔茨海默病、多发性硬化以及导致急性冠状动脉病症,诸如心肌梗塞的动脉粥样硬化斑块破裂(还参见 WO07087637A3,在此通过引用并入本文)。

[0159] 最近,已经证实与健康对照受试者相比,MMP-9 的水平在患有稳定性哮喘的患者体内显著增加,甚至在患有急性哮喘的患者体内更高。MMP-9 在气道炎性细胞的浸润和气道高应答性的诱导方面发挥重要作用,这说明 MMP-9 可具有诱导和维持哮喘的重要作用(Vignola 等,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道阻塞相关),Am J Respir Crit Care Med 158:1945-1950,1998;Hoshino 等,Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma(吸入的皮质类固醇通过调节哮喘中基质金属蛋白酶-9 和金属蛋白酶-1 的组织抑制剂的表达之间的平衡来减少上皮下胶原沉积),J Allergy Clin Immunol 104:356-363,1999;Simpson 等,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,A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor(甲苯二异氰酸酯诱发哮喘的鼠模型可以用基质金属蛋白酶抑制剂治疗),J Allergy Clin Immunol 108:1021-1026,2001;and 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减少甲苯二异氰酸酯诱发哮喘的鼠模型中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达来调节炎性细胞迁移),J Allergy Clin Immunol 2003;111:1278-1284)。

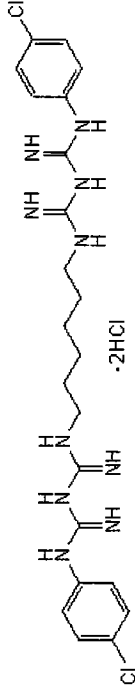
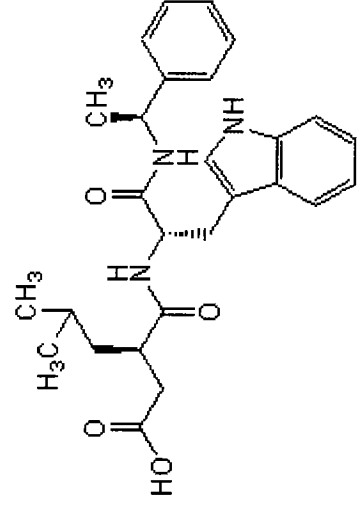
[0160] MMP 抑制剂:

[0161] 已知许多金属蛋白酶抑制剂(参见,例如由 Beckett R. P. 和 Whittaker M.,1998,Exp. Opin. Ther. Patents,8(3):259-282 和 Whittaker M. 等,1999,Chemical Reviews 99(9):2735-2776 对 MMP 抑制剂的综述)。WO 02/074767 公开了乙内酰脲衍生物的通式,其可用作 MMP 抑制剂,尤其是用作有效的 MMP12 抑制剂。美国专利申请序列号 11/721,590(公开为 20080032997) 公开了另一组乙内酰脲衍生物,其是金属蛋白酶的抑制剂并特别感兴趣的是抑制 MMP,例如 MMP12 和 MMP9。用于抑制 MMP 例如 MMP12 和 MMP9 的新的三唑酮衍生物在美国专利申请序列号 10/593543(公开为 20070219217) 中公开。在 11/509,490(公开为 20060287338)(也参见 10/831265(公开为 20040259896)) 中也公开了其他的 MMP12 和 MMP9 抑制剂。

[0162] 其他示例性 MMP 抑制剂在下表 1 中概述:

[0163]

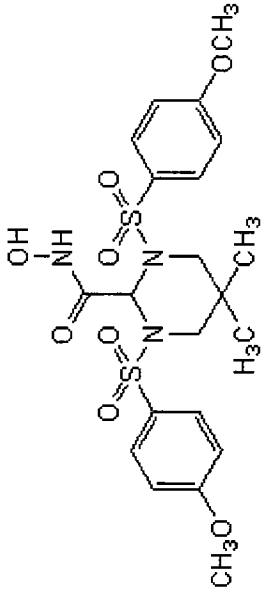
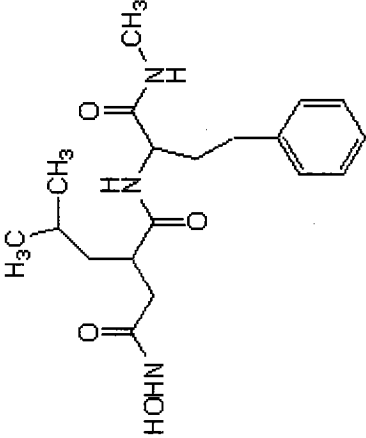
表 1. 示例性基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制剂 (例如从 EMD 生物学获得)。

产物/鉴定	目录号.	注释	结构
氯己定, 二羟基氯化物	220557	作为 MMP-2 和 MMP-9 的 Zn ²⁺ -螯合抑制剂	 <p>1,6-双[N'-(<i>p</i>-氯苯基)-N⁵-双胍基]己烷, 2HCl CHX</p>
CL-82198	233105	选择性 MMP-13 抑制剂 (IC ₅₀ = 10 μM). 不抑制 MMP-1、MMP-9 和 TACE.	
GM 1489	364200	MMP-1 的 K _i = 200 pM, MMP-2 为 500 nM, MMP-3 为 20 μM, MMP-8 为 100 nM, 以及 MMP-9 为 100 nM	 <p>N-[(2R)-2-(羧甲基)-4-甲基戊酰基]-L-色氨酸-(S)-甲基-苯甲酰胺</p>

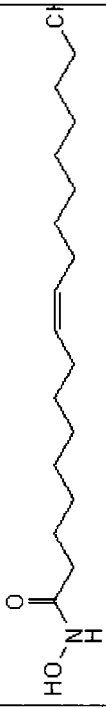
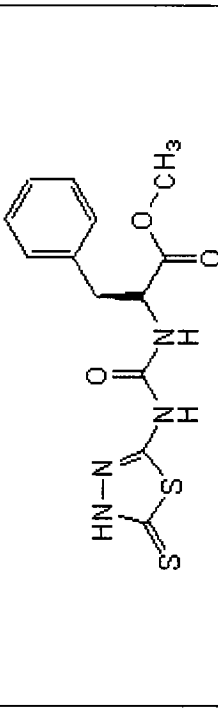
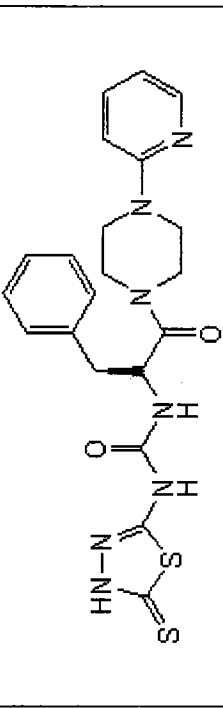
[0164]

<p>GM 6001 (加拉定)</p>	<p>364205</p>	<p>MMP-1 为 $K_i = 400$ pM, MMP-2 为 500 pM, MMP-3 为 27 nM, MMP-8 为 100 pM, 以及 MMP-9 为 200 pM. 参见目录号 364206.</p>	<p>N-[(2R)-2-(羟基羧基(4-甲基戊酰基)-L-色氨酸甲酰胺)</p>
<p>GM 6001, 阴性对照</p>	<p>364210</p>	<p>用于 GM 6001 的有用的阴性对照</p>	<p>N-叔丁氧基羧基-L-亮氨酸-L-色氨酸甲酰胺</p>
<p>MMP 抑制剂 I (FN-439)</p>	<p>444250</p>	<p>MMP-1 和 MMP-8 为 $IC_{50} = 1.0$ μM; MMP-9 为 $IC_{50} = 30$ μM; MMP-3 为 $IC_{50} = 150$ μM</p>	<p>4-Abz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NH-OH [Abz = 氨基苯甲酰基]</p>

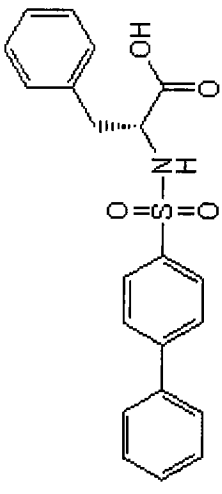
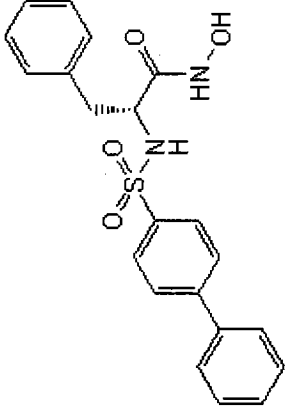
[0165]

MMP 抑制剂 II	444247	MMP-1 为 $IC_{50} = 24$ nM; MMP-3 为 18.4 nM, MMP-7 为 30 nM, 以及 MMP-9 为 2.7 nM	 <p>(N-(1,3-二-(4-甲氧基苯磺酰基)-5,5-二甲基-1,3-哌嗪-2-甲酰胺)</p>
MMP 抑制剂 III	444264	广谱 MMP 抑制剂. MMP-1 为 $IC_{50} = 7.4$ nM, MMP-2 为 2.3 nM, MMP-3 为 135 nM, MMP-7 为 10-100 nM, 以及 MMP-13 为 1-10 nM	
MMP 抑制剂 IV	444271	肽羧基脂肪酸, 其有效抑制 MMP 和来自绿脓杆菌的 <i>pseudolysin</i> .	HONH-CO-CH ₂ -CH ₂ -CO-Phe-Ala-NH ₂

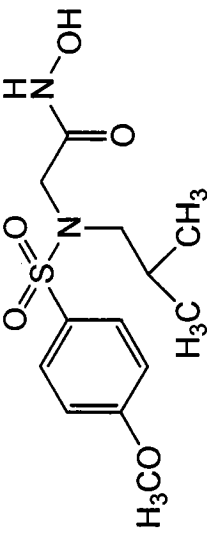
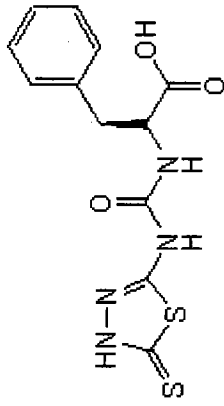
[0166]

<p>MMP-2 抑制剂 I (OA-Hy)</p>	<p>444244</p>	<p>$K_i = 1.7 \mu\text{M}$</p>	<p>顺式-9-十八碳烯酰基-N-羟基酰胺 油酰基-N-羟基酰胺</p> 
<p>MMP-2/MMP-3 抑制剂 I</p>	<p>444239</p>	<p>MMP-2 为 $K_i = 17 \mu\text{M}$ 以及 MMP-3 为 290 nM</p>	<p>N-[[[(4,5-二羟基-5-硫代-1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]羰基]-L-苯丙氨酸甲基酯</p> 
<p>MMP-2/MMP-3 抑制剂 II</p>	<p>444240</p>	<p>MMP-2 为 $K_i = 1.5 \mu\text{M}$ 以及 MMP-3 为 520 nM</p>	<p>-[[[4,5-二羟基-5-硫代-1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]羰基]氨基]-[(2-吡啶基)哌嗪基)-(S)-苯丙氨酸</p> 

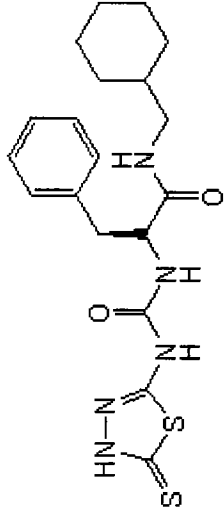
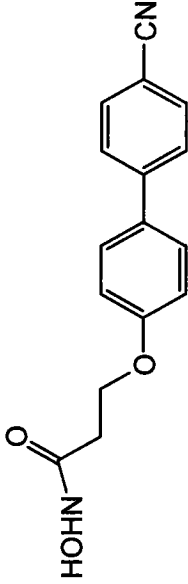
[0167]

MMP-2/MMP-9 抑制 剂 I	444241	MMP-2 为 $IC_{50} = 310 \text{ nM}$ 以及 MMP-9 为 240 nM	 <p>(2R)-2-[(4-联苯基磺酰基)氨基]-3-苯基丙酸</p>
MMP-2/MMP-9 抑制 剂 II	444249	MMP-2 为 $IC_{50} = 17 \text{ nM}$ 以及 MMP-9 为 30 nM	 <p>(2R)-2-[(4-联苯基磺酰基)氨基]-N-羟基-3-苯丙酰胺</p>
MMP-2/MMP-9 抑制 剂 III	444251	MMP-2 为 $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ 以及 MMP-9 为 10 M	H-Cys1-Thr-Thr-His-Trp-Gly-Phe-Thr-Leu-Cys10-OH (环 状: 1→10)
MMP-2/MMP-9 抑制 剂 IV	444274	MMP-2 ($K_i = 13.9 \text{ nM}$)和 MMP-9($K_i = 600$ nM)的缓慢结合和不可逆抑制剂	HONH-COCH ₂ CH ₂ CO-FA-NH ₂
MMP-3 抑制剂 I	444218	$IC_{50} = 5 \mu\text{M}$	Ac-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-NH ₂

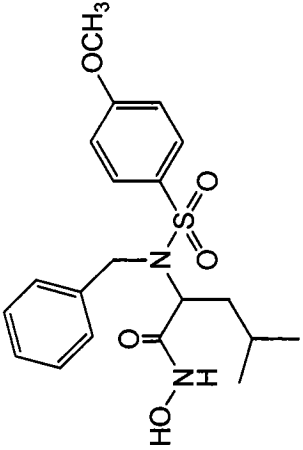
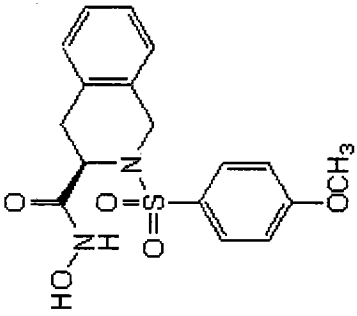
[0168]

MMP-3 抑制剂 II	444225	K _i = 130 nM	 <p>N-丁基-N-(4-甲氧基苯磺酰基)-甘氨酸异羟肟酸 (NNGH)</p>
MMP-3 抑制剂 III	444242	K _i = 3.2 μM	 <p>N-[[[(4,5-二羟基-5-硫代-1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]羰基]-L-苯丙氨酸</p>

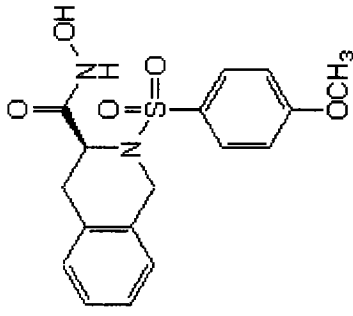
[0169]

MMP-3 抑制剂 IV	444243	$K_i = 810 \text{ nM}$	 <p>-[[[(4,5-二羟基-5-硫代-1,3,4-噻二唑-2-基)氨基]羰基]氨基]N-(环己基)-(S)-苯丙酰胺</p>
MMP-3 抑制剂 V	444260	人和兔 MMP-3 催化结构域两者的强效和竞争抑制剂, 其 K_i 值在低 μM 范围内	4-二苯并咪喃-2-基-4-脞基-丁酸
MMP-3 抑制剂 VI	444265	人和兔 MMP-3 催化结构域两者的强效和竞争抑制剂, 其 K_i 值在低 μM 范围内	4-(4'-联苯基)-4-羟基氨基-丁酸
MMP-3 抑制剂 VII	444280	MMP-3 的强效非肽抑制剂($\text{IC}_{50} = 25 \text{ nM}$ 针对催化结构域).	 <p>3-[4-(4-氰基苯基)苯氧基]丙烷异羟肟酸</p>

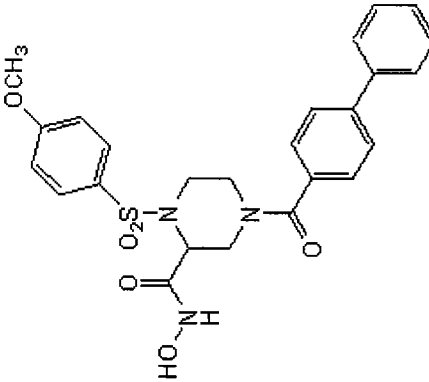
[0170]

<p>MMP-3 抑制剂 VIII</p>	<p>444281</p>	<p>人 MMP-3($K_i = 23 \text{ nM}$)和鼠巨噬细胞金属弹性蛋白酶(MME/MMP-12; $IC_{50} = 13 \text{ nM}$)的可渗透细胞的强效抑制剂</p>	 <p>N-羧基-2-(R)-{[(4-甲氧基苯基)磺酰基]-[4-甲基戊基]胺</p>
<p>MMP-8 抑制剂 I</p>	<p>444237</p>	<p>$IC_{50} = 4 \text{ nM}$</p>	 <p>(3R)-(+)-[2-(4-甲氧基苯磺酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸盐]</p>

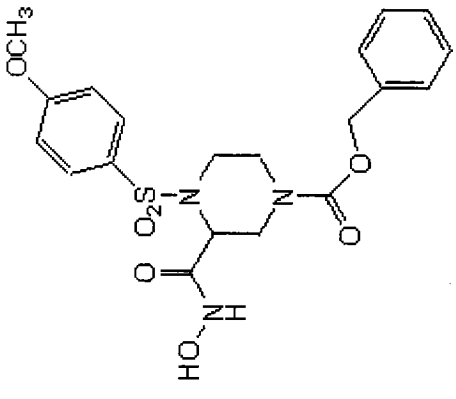
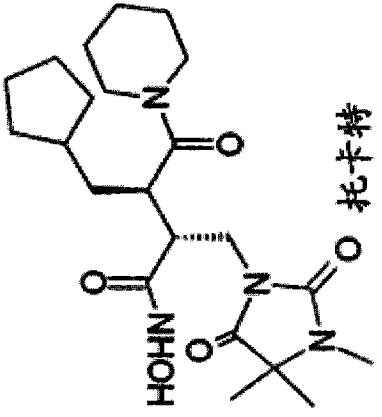
[0171]

MMP-8 抑制剂 I, 阴性对照	444238	MMP-8 抑制剂 I ($IC_{50} = 1000 \text{ nM}$)的有用阴性对照	 <p>(3S)-(-)-[2-(4-甲氧基苯磺酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸盐]</p>
MMP-9 抑制剂 I	444278	MMP-9($IC_{50} = 5 \text{ nM}$)的强效选择性抑制剂。也抑制 MMP-1 ($IC_{50} = 1.05 \text{ }\mu\text{M}$) 和 MMP-13 ($IC_{50} = 113 \text{ nM}$)。	结构不可得

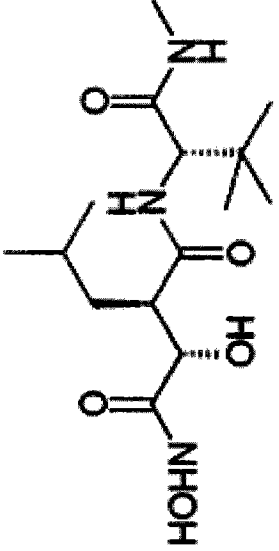
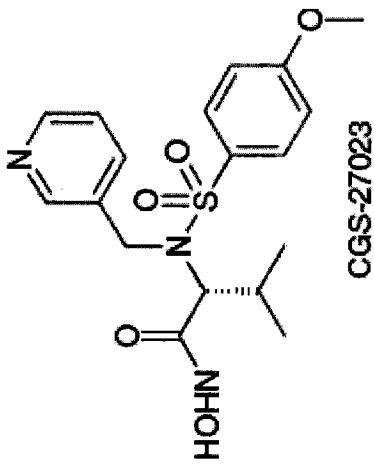
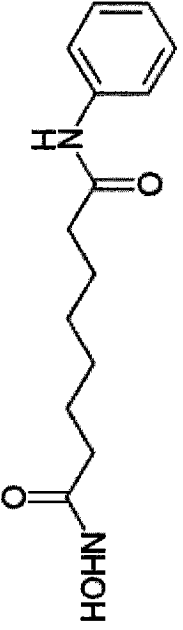
[0172]

MMP-9/MMP-13 抑制剂 I	444252	MMP-9 为 $IC_{50} = 900$ pM 和 MMP-13 为 900 pM。也抑制 MMP-1 ($IC_{50} = 43$ nM), MMP-3 ($IC_{50} = 23$ nM), 和 MMP-7 ($IC_{50} = 930$ nM).	 <p>N-羧基-1-(4-甲氧基苯基)磺酰基-4-(4-联苯基羰基)-2-甲酰胺</p>
--------------------	--------	---	--

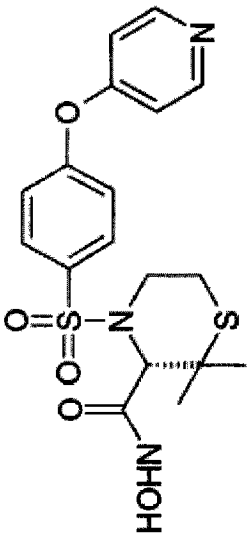
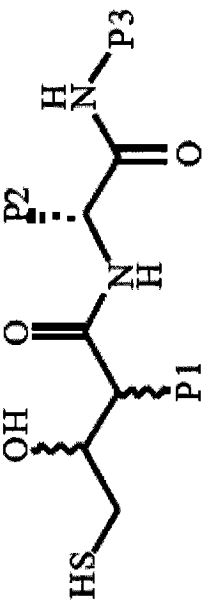
[0173]

<p>MMP-9/MMP-13 抑制剂 II</p>	<p>444253</p>	<p>MMP-9 为 $IC_{50} = 1.9$ nM 和 MMP-13 为 1.3 nM。也抑制 MMP-1 ($IC_{50} = 24$ nM), MMP-3 ($IC_{50} = 18$ nM), 和 MMP-7 ($IC_{50} = 230$ nM)。</p>	 <p>N-羟基-1-(4-甲氧基苯基)磺酰胺-4-苄氧基羰基哌啶-2-甲酰胺</p>
<p>托卡特 (Trocade)</p>		<p>参见 Marion Filipo 等 “A library of novel hydroxamic acids targeting the metallo-protease family: Design, parallel synthesis and screening, (靶向金属蛋白酶家族的新型羟胺文库: 设计、并行合成和筛选)” <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> 15, 63-76 页 (2007), 通过引用全部并入本文</p>	 <p>托卡特</p>

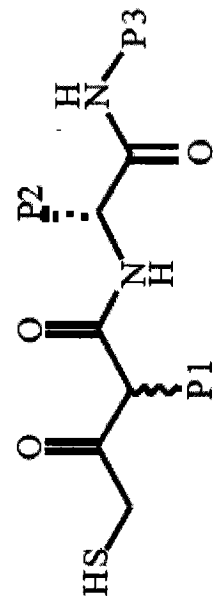
[0174]

<p>马立马司他 (Marimastat)</p>		<p>参见 Marion Flipo 等, 同上</p>	 <p>马立马司他</p>
<p>CGS-27023</p>		<p>参见 Marion Flipo 等, 同上</p>	 <p>CGS-27023</p>
<p>SAHA</p>		<p>参见 Marion Flipo 等 同上</p>	

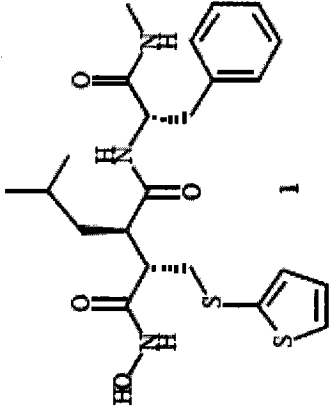
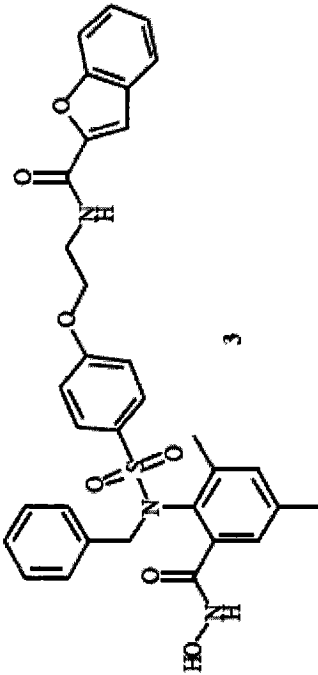
[0175]

<p>普 啉 司 他 (Prinomastat) (AG-3340)</p>	<p>参见 Marion Filipo 等, 同上</p>																																													
<p>示例性非氧膦酸盐 MPI</p>	<p>参见 David T. Puerta 等, "A Bioinorganic Perspective on Matrix Metalloproteinase Inhibition (关于基质金属蛋白酶抑制剂的生物无机前景)", <i>Current Topics in Medicinal Chemistry</i>, 4, 1551-1573 (2004), 在此通过引用全部并入本文</p>																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>P1</th> <th>P2</th> <th>P3</th> <th>酶 (nM)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>异丁基</td> <td>叔丁基</td> <td>甲基</td> <td>>20000</td> </tr> <tr> <td>异丁基</td> <td>叔丁基</td> <td>2-吡啶基</td> <td>4600</td> </tr> <tr> <td>异丁基</td> <td>CHM</td> <td>苯乙基</td> <td>1300</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>叔丁基</td> <td>甲基</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>叔丁基</td> <td>PhSO₂NH₂</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>异丁基</td> <td>苯乙基</td> <td>1500</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>异丁基</td> <td>吗啉代</td> <td>5100</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>异丁基</td> <td>Leu(乙基)</td> <td>210</td> </tr> <tr> <td>正庚基</td> <td>CHM</td> <td>PhSO₂NH₂</td> <td>290</td> </tr> <tr> <td>苯丙基</td> <td>CHM</td> <td>苯乙基</td> <td>>2000</td> </tr> </tbody> </table>			P1	P2	P3	酶 (nM)	异丁基	叔丁基	甲基	>20000	异丁基	叔丁基	2-吡啶基	4600	异丁基	CHM	苯乙基	1300	正庚基	叔丁基	甲基	120	正庚基	叔丁基	PhSO ₂ NH ₂	120	正庚基	异丁基	苯乙基	1500	正庚基	异丁基	吗啉代	5100	正庚基	异丁基	Leu(乙基)	210	正庚基	CHM	PhSO ₂ NH ₂	290	苯丙基	CHM	苯乙基	>2000
P1	P2	P3	酶 (nM)																																											
异丁基	叔丁基	甲基	>20000																																											
异丁基	叔丁基	2-吡啶基	4600																																											
异丁基	CHM	苯乙基	1300																																											
正庚基	叔丁基	甲基	120																																											
正庚基	叔丁基	PhSO ₂ NH ₂	120																																											
正庚基	异丁基	苯乙基	1500																																											
正庚基	异丁基	吗啉代	5100																																											
正庚基	异丁基	Leu(乙基)	210																																											
正庚基	CHM	PhSO ₂ NH ₂	290																																											
苯丙基	CHM	苯乙基	>2000																																											

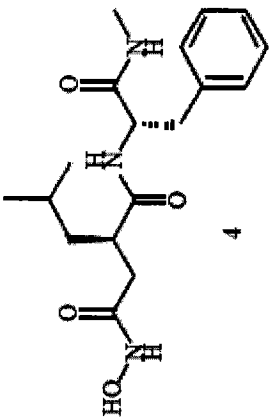
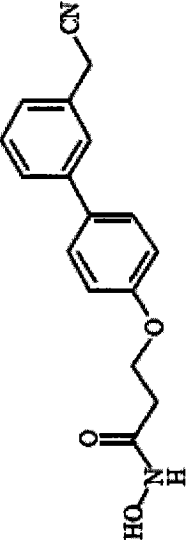
[0176]

示例性非氧膦酸盐 MPI	参见 David T. Puerta 等, 同上			酮 (mM)
	P1	P2		
	异丁基	叔丁基	甲基	500
	异丁基	叔丁基	2-吡啶基	160
	异丁基	CHM	苯乙基	98
	正庚基	叔丁基	甲基	16
	正庚基	叔丁基	PhSO ₂ NH ₂	22
	正庚基	异丁基	苯乙基	39
	正庚基	异丁基	吗啉代	130
	正庚基	异丁基	Leu(乙基)	26
	正庚基	CHM	PhSO ₂ NH ₂	43
	苯丙基	CHM	苯乙基	210

[0177]

<p>巴 马 司 他 (Batimastat)</p>		<p>参见 David T. Puerta 等, 同上;</p>	 <p style="text-align: center;">1</p>
<p>WAY-170523</p>		<p>参见 David T. Puerta 等, 同上</p>	 <p style="text-align: center;">3</p>

[0178]

<p>(N-(2-氧脞酸盐亚甲基-4-甲基-丙氧酰基)苯丙氧酰基)甲基胺</p>	<p>参见 David T. Puerta 等, 同上</p>	 <p>4</p> <p>(N-(2-氧脞酸盐亚甲基-4-甲基-丙氧酰基)苯丙氧酰基)甲基胺</p>
<p>3-[4-[3-(氧基甲基)丙烷氧基]苯氧基]丙烷羧酸</p>	<p>参见 David T. Puerta 等, 同上</p>	 <p>5</p> <p>3-[4-[3-(氧基甲基)丙烷氧基]丙烷羧酸</p>
<p>美国专利第 5,470,834 号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : SULFOXIMINE AND SULDODIIMINE MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(磺酰亚胺和 SULDODIIMINE 基质金属蛋白酶抑制剂), 于 1995 年 11 月 28 日 授权给 Schwartz 等</p>	

[0179]

美国专利第 5,618,844 号的化合物, 通过引用并入本文	题为: HYDROXAMIC ACID AND CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND USE THEREOF (异羟肟酸和羧酸衍生物, 其制备方法及其应用), 于 1997 年 4 月 8 日授权给 Gowravaram 等人	
美国专利第 5,804,593 号的化合物, 通过引用并入本文	题为: α -AMINO SULFONYL HYDROXAMIC ACIDS AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为基质金属蛋白酶抑制剂的 α -氨基磺酰基异羟肟酸), 于 1998 年 9 月 8 日授权给 Warpehoski 等人	
美国专利第 5,917,090 号的化合物, 通过引用并入本文	题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于 1999 年 6 月 29 日授权给 Huxley 等人	
美国专利第 6,020,366 号的化合物, 通过引用并入本文	题为: BUTYRIC ACID MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(丁酸基质金属蛋白酶抑制剂), 于 2000 年 2 月 1 日授权给 Picard 等人	
美国专利第 6,194,451 号的化合物, 通过引用并入本文	题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于 2001 年 2 月 27 日授权给 Alpegiani 等人	

[0180]

美国专利第6,277,876,号的化合物,通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于2001年8月21日授权给 Christensen	
美国专利第6,294,674,号的化合物,通过引用并入本文		题为: DIBENZOFURAN SULFONAMIDE MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(二苯并咪唑磺酰胺基质金属蛋白酶抑制剂), 于2001年9月25日授权给 Picard 等人	
美国专利第6,294,694 号的化合物,通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS AND METHOD OF USING SAME(基质金属蛋白酶抑制剂及其使用方法), 于2001年9月25日授权给 Witniak 等人	
美国专利第6,465,508 号的化合物,通过引用并入本文		题为: PREPARATION AND USE OF ORTHO-SULFONAMIDO ARYL HYDROXAMIC ACIDS AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为基质金属蛋白酶抑制剂的邻-磺酰胺基芳基羟胺酸的制备和应用), 于 October 15, 2002 授权给 Nelson 等人	
美国专利第6,482,827 号的化合物,通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于2002年11月19日授权给 Alpegiani 等人	

[0181]

美国专利第6,521,606号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于2003年2月18日授权给 Sorensen 等人	
美国专利第6,531,499号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS AND METHOD OF USING SAME(基质金属蛋白酶抑制剂及其使用方法), 于2003年3月11日授权给 Witniak 等人	
美国专利第6,541,489号的化合物, 通过引用并入本文		题为: AROMATIC SULFONE HYDROXAMIC ACID METALLOPROTEASE INHIBITORS(芳族磺羟酰胺金属蛋白酶抑制剂), 于2003年4月1日授权给 Barta 等人	
美国专利第6,583,299号的化合物, 通过引用并入本文		题为: α -AMINO- β -SULFONYL HYDROXAMIC ACID COMPOUNDS (α -氨基- β -磺酰基异羟酰胺化合物), 于2003年6月24日授权给 Hockerman 等人	
美国专利第6,600,057号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(芳族磺羟酰胺金属蛋白酶抑制剂), 2003年7月29日授权给 Quirk	

[0182]

美国专利第6,608,043号的化合物, 通过引用并入本文		题为: REMEDIES FOR JOINT DISEASES (关节疾病治疗方法), 于2003年8月19日授权给 Serizawa 等人	
美国专利第6,624,144号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS AND DOWN-REGULATORS (基质金属蛋白酶抑制剂和负调节物), 于2003年9月23日授权给 Koivunen 等人	
美国专利第6,624,177号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS AND THEIR THERAPEUTIC USES (基质金属蛋白酶抑制剂及其治疗用途), 于2003年9月23日授权给 O'Brien 等人	
美国专利第6,656,448号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于2003年12月2日授权给 Carpenter Jr. 等人	
美国专利第6,667,388号的化合物, 通过引用并入本文		题为: PEPTIDE INHIBITORS OF MMP ACTIVITY AND ANGIOGENESIS (MMP活性和血管发生的肽抑制剂), 于2003年12月23日授权给 Bein 等人	

[0183]

<p>美国专利第6,677,355号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : HYDROXAMIC ACID COMPOUNDS USEFUL AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(可用作基质金属蛋白酶抑制剂的异羟肟酸化合物), 于2004年1月13日授权给 Conrad 等人</p>	
<p>美国专利第6,686,355号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : BIPHENYL SULFONAMIDES USEFUL AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为基质金属蛋白酶抑制剂的联苯基磺酰胺), 于2004年2月3日授权给 Barvian 等人</p>	
<p>美国专利第6,750,228号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : AROMATIC SULFONE HYDROXAMIC ACID METALLOPROTEASE INHIBITORS(芳族异羟肟酸金属蛋白酶抑制剂), 于2004年6月15日授权给 Barta 等人</p>	
<p>美国专利第6,750,233号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : AROMATIC SULFONE HYDROXAMIC ACID METALLOPROTEASE INHIBITORS(芳族异羟肟酸金属蛋白酶抑制剂), 于2004年6月15日授权给 Barta 等人</p>	

[0184]

<p>美国专利第 6,765,003 号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : 3-ARYLSULFONYL-2 (SUBSTITUTED METHYL) PROPANOIC ACID DERIVATIVES AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为基质金属蛋白酶抑制剂的 3-芳基磺酰基-2(取代的甲基)丙酸衍生物), 于 2004 年 7 月 20 日授权给 Mantegani 等人</p>	
<p>美国专利第 6,825,352 号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : PREPARATION AND USE OF ORTHO-SULFONAMIDO ARYLHYDROXAMIC ACIDS AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为基质金属蛋白酶抑制剂的邻-磺酰胺基芳基羟肟酸的制备和应用), 于 2004 年 11 月 30 日授权给 Nelson 等人</p>	
<p>美国专利第 6,890,937 号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : AROMATIC SULFONE ACID HYDROXAMIC METALLOPROTEASE INHIBITORS(芳族磺羟肟酸金属蛋白酶抑制剂), 于 2005 年 5 月 10 日授权给 Barta 等人</p>	
<p>美国专利第 6,967,197 号的化合物, 通过引用并入本文</p>	<p>题为 : THIAZEPINYL HYDROXAMIC ACID DERIVATIVES AS MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS(作为金属蛋白酶抑制剂的硫氮杂卓卓基羟肟酸衍生物), 于 2005 年 11 月 22 日授权给 Neya 等人</p>	

[0185]

美国专利第 6,989,139 号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于 2006 年 1 月 24 日授权给 Decicco 等人	
美国专利第 7,060,248 号的化合物, 通过引用并入本文		题为: MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS (基质金属蛋白酶抑制剂), 于 2006 年 6 月 13 日授权给 Carpenter, Jr. 等人	
美国专利第 6,417,229 号的化合物, 通过引用并入本文		题为: α -SULFONYLAMINO HYDROXAMIC ACID INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES FOR THE TREATMENT OF PERIPHERAL OR CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISORDERS (用于治疗外周或中枢神经系统病症的基质金属蛋白酶的 α -磺酰氨基羧基异羟肟酸抑制剂), 于 2002 年 7 月 9 日授权给 Sahagan 等人	

[0186] 此外, 4-(4-苯氧基苯基磺酰基)丁烷-1,2-双硫醇(1)和 5-(4-苯氧基苯基磺酰基)戊烷-1,2-双硫醇(2)这两个化合物已表现出选择性结合和强力地抑制 MMP-2 和 MMP-9 (Bernardo 等, (2002) J. Biol. Chem. 277 :11201-11207)。这两个化合物在临床抑制 MMP-2 和 MMP-9 以及因此减轻炎症方面具有重要的应用。另外, 以亚抗菌水平使用某些四环

素类抗生素（例如米诺环素和多西环素）已表现出有效抑制 MMP 活性。本发明的某些方面包括与可用于抑制 MMP 的亚抗菌水平联合使用本发明的流体。

[0187] 治疗方法

[0188] 术语“治疗”是指包括逆转、缓解、抑制疾病、功能障碍或病症或它们的一种或多种症状的进展或预防疾病、功能障碍或病症或它们的一种或多种症状；并且“治疗”和“治疗上”是指如本文所定义的治疗的行为。

[0189] “治疗有效量”是在实施本文所提供的本发明的过程中所使用的任何化合物的任何量，所述量足以逆转、缓解、抑制疾病、功能障碍或病症或它们的一种或多种症状的进展或预防疾病、功能障碍或病症或它们的一种或多种症状。

[0190] 本文的某些实施方案涉及治疗组合物和通过预防或缓解与特定病症或疾病有关的炎症如炎症神经变性疾病中的至少一种症状来治疗受试者的方法。例如，本文所公开的治疗组合物和 / 或方法可有用于治疗或预防选自下列各项组成的组的一种或多种病症或疾病：多发性硬化 (MS)、帕金森病、淀粉样变性（例如阿尔茨海默病）、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、朊病毒疾病以及 HIV 相关性痴呆。

[0191] 已经用类固醇；氨甲喋呤；免疫抑制药物，包括环磷酰胺、环孢菌素，硫唑嘌呤和来氟米特；非类固醇类抗炎剂，如阿司匹林、对乙酰氨基酚；和 COX-2 抑制剂；金剂和抗疟疾治疗来治疗与炎症相关的一些病症或疾病。这些药物具有多种缺点和不良反应，包括注射部位反应、皮疹、上呼吸道感染、自身免疫病患和对感染的敏感性增加。此外，许多抗炎药物需要静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 施用，这与较方便和依从性较好的口服或局部皮肤途径相反。因此，仍然需要开发用于炎症相关病症和疾病的新药物和治疗方法。

[0192] 目前，对 MS 的治疗包括乙酸格拉默、干扰素- β 、米托蒽醌和那他珠单抗。乙酸格拉默是由谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸和酪氨酸构成为无规聚合物。乙酸格拉默具有有限的功效和很大的副作用，例如，注射部位的肿块、寒冷、发热、疼痛、呼吸急促、心跳加快和焦虑。在重要的临床研究中，使用患有原发性进行性 MS 的 943 名患者，乙酸格拉默未能阻止残疾和疾病的进展 (Wolinsky 等 (2007) Ann Neurol 61 :13-24)。

[0193] 干扰素- β 是成纤维细胞产生的天然存在的蛋白质并且是先天免疫应答的一部分。作为 MS 药物，干扰素- β 在降低 MS 发生率中的有效率为约 18-38%。副作用包括轻微的流感样症状和注射部位的反应和更严重副作用（例如，抑郁、癫痫发作和肝问题）。

[0194] 米托蒽醌是 MS 的一种治疗。其作为用于抗击癌症的化疗治疗而被开发。其通过干扰 DNA 修复与合成而起作用并且对癌细胞无特异性。米托蒽醌的副作用可以是相当严重的，并且包括恶心、呕吐、脱发、心脏损伤和免疫抑制。

[0195] 那他珠单抗是靶向 $\alpha 4$ -integren（一种细胞黏附分子）的人源化单克隆抗体。认为那他珠单抗通过阻止引起炎症的免疫细胞穿过血脑屏障 (BBB) 而起作用。副作用包括疲劳、头痛、恶心、发冷和变应性反应。

[0196] 总之，这些药物以非特异性方式抑制免疫系统并仅极少地限制疾病的总体进展 (Lubetzki 等 (2005), Curr. Opin. Neurol. 18 :237-244)。因此，存在开发治疗策略以更好地治疗 MS 的需求。

[0197] 联合疗法

[0198] 其他方面提供本文公开的发明方法，其进一步包括联合疗法，其中，将至少一种额

外的治疗剂施用于患者。在具体的方面,所述至少一种额外的治疗剂选自:乙酸格拉默、干扰素- β 、米托蒽醌和那他珠单抗和/或如上表1所示的MMP抑制剂。

[0199] 电动产生的富含气体的流体和溶液的抗炎活性

[0200] 根据本发明的某些方面,本文所公开的富含气体的流体和/或溶液具有抗炎特性和作用,并且可用作治疗受与炎性神经变性有关的疾病或功能障碍折磨的受试者的抗炎剂。图38显示来自健康血液供体的经过刺激的淋巴细胞的细胞因子特征的实验结果。如图38中可以看到,本发明的富含氧的流体(水)引起特定细胞因子的下调,尤其是IL-6、IL-8和IL-1 β 。

[0201] 促炎性细胞因子的产生增加参与了大量炎性疾病和自身免疫疾病的发病。TNF α 分泌是炎性级联引发的主要事件(Brennan F.M.,等人.Lancet,1989,2:244-7;Haworth C,等人 Eur. J. Immunol. 1991,21:2575-2579)并且其直接促进炎性疾病和自身免疫疾病的引发和维持。其他促炎性细胞因子也发挥有作用,包括白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8、IL-12、一氧化氮、IFN- γ 和GM-CSF,而诸如IL-10的抗炎性细胞因子则可以降低疾病。免疫系统的细胞尤其是巨噬细胞会对激活性刺激物反应而分泌这些细胞因子中的许多。

[0202] 炎性过程中涉及了多种细胞类型。单核细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞的TNF α 过量产生是大量疾病发病的关键因素。巨噬细胞和T细胞在免疫反应的引发和维持中尤其发挥重要的作用。一旦被病理的或免疫原性刺激物激活,巨噬细胞便通过释放包括下列的大量细胞因子而反应:TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、IL-12、一氧化氮(NO)、IL-6、GM-CSF、G-CSF、M-CSF以及其他。T细胞释放IL-2、IL-4、INF- γ 和其他炎性细胞因子。这些细胞因子激活其他的免疫细胞,并且一些也可以作为独立的细胞毒性剂起作用。巨噬细胞和T细胞来源的炎性介质的过量释放可特定地导致正常细胞和周围组织损伤。

[0203] 促炎性细胞因子参与了HIV-AIDS和其他病毒感染,包括巨细胞病毒感染、流感病毒感染和疱疹病毒家族感染。TNF α 增强人巨细胞病毒的主要即时早期增强子/启动子的基本活性,并且在前期单核细胞(premonocytic cell)中的潜伏性HCMV感染再激活中起作用(Prosch S.,等人 Virology 1995,208:197-206)。

[0204] 此外,大量炎性细胞因子促进患脓毒症或内毒素性休克的患者的发病率。例如,TNF α 和IL-1 β 在脓毒症、败血性休克和内毒素性休克中具有已经充分确定的重要作用。这些细胞因子的水平增加伴随有发热、低血压和休克(Smith J.W.等人 J. Clin. Oncol. 1992,10:1141-1152;Chapman P.B.,等人 J. Clin. Oncol. 1987,5:1942-1951)以及磷脂酶A2(Gronich J.,等人 J. Clin. Invest. 1994,93:1224-1233)和NO合成酶的基因表达的诱导。

[0205] NO从平滑肌细胞的诱导在败血性休克期间介导了平均动脉压和全身血管阻力的降低,这表明了NO的基本作用。因此,对IL-8、IL-1 β 和NO的靶下调作用可以有益于治疗炎性疾病或病患,包括脓毒症、败血性休克和内毒素性休克。

[0206] TNF α 的过度产生促进诸如糖尿病和类风湿性关节炎的大量自身免疫疾病的临床特征。系统性红斑狼疮(SLE)也会被IL-1 β 和TNF α 水平增加促进。在狼疮患者中,血清C反应性蛋白、IL-1 β 和TNF α 水平高于对照,这表明炎性反应的增加在该疾病中起作用(Liou L.B. Clin. Exp. Rheumatol. 2001,19:515-523)。具有一种形式的SLE即神经精神

性红斑狼疮 (NPLE) 的患者的研究表明表达 TNF α 的 mRNA 的外周血单核细胞的数目以及 NO 代谢物的脑脊液水平与 NPLE 疾病的严重程度相关 (Svenungsson E., 等人. *Ann. Rheum. Dis.* 2001, 60 :372-9)。

[0207] 在动物模型中, IL-1 和 TNF α 在多种急性和慢性反应中起重要作用。此外, IL-11、IFN α 和 IFN β 还可以上调炎性反应。相反地, 几种细胞因子可以参与下调炎性反应 (即, IL-4、IL-10、IL-13 以及其他)。如在实施例 1 中所示, 与具有 T3 抗原的本发明的富含气体的流体接触的细胞显示出比在具有 T3 抗原的对照培养基中增加的 IFN- γ 水平, 而具有 T3 抗原的本发明的富含气体的培养基中 IL-8 低于具有 T3 抗原的对照培养基。此外, 在具有 PHA 的本发明的富含气体的培养基中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平低于具有 PHA 的对照培养基, 而具有 PHA 的本发明的富含气体的流体中的 IL-1 β 水平与具有 PHA 的对照培养基相比则较低。在单独的本发明的富含气体的培养基中, IFN- γ 水平高于对照培养基。这些结果与抗炎性微环境一致。

[0208] NO 被认为是炎性反应的介质和调节剂。它对病原具有细胞毒性特性, 但是也可能对受试者自身的组织具有有害作用。(Korhonen 等人, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4(4) :471-9, 2005)。NO 与可溶性的鸟苷酸环化酶反应形成环尿苷一磷酸 (cGMP), 该环尿苷一磷酸介导许多 NO 的作用。NO 也可以与分子氧和过氧化物阴离子相互作用产生可以改变各种细胞功能的活性氧物种。NO 的这些间接作用对炎症具有显著的作用, 其中大量 NO 由诱导型 NO 合成酶 (iNOS) 产生并且活性氧物种由激活的炎性细胞合成。

[0209] NO 可以由角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞和可能的其他细胞产生。NO 的一些血管作用包括血管舒张、抑制血小板对血管内皮的粘附、抑制白细胞对血管内皮的粘附以及清除超氧化物酶。(Shah 等人, *Env. Health Persp.* v. 106(5) :1139-1143)。

[0210] 此外, 已经显示 NO 合成的抑制延缓伤口收缩、改变胶原组织并改变新生表皮 (neopidermis) 厚度。(Amadeu 和 Costa, *J. Cutan. Pathol.* 33 :465-473, 2006)。伤口中肥大细胞迁移和血管发生也受 NO 抑制的影响。(出处同上) 不受任何具体的机制理论束缚, 在某些实施方案中, 本发明的富含气体的流体可以调节局部的 NO 和 / 或细胞 NO 的产生或降解, 这与本文所公开的实施例部分所说明的伤口愈合作用谱一致。由于调控途径不同, 在某些实施方案中, 本发明的富含气体的流体可以增加 NO 产生和 / 或延迟 NO 降解, 而在其他的某些实施方案中, 本发明的富含气体的流体可以降低 NO 产生和 / 或促进 NO 降解。

[0211] 特定地, 用富含氧的盐水溶液处理伤口显示在第 4 天至第 11 天和第 3 天与第 11 天之间伤口愈合增加, 用富含氧的盐水溶液处理的伤口中新表皮迁移速度为用生理盐水溶液处理的伤口的表皮迁移的 2 至 4 倍, 如本文的实施例 9 所示。该研究还显示在第 15 天和第 22 天之间, 如通过较早地形成了较多成熟的表皮层所证明的, 用富含氧的盐水溶液处理的伤口以较快的速率分化。在所有阶段, 在用富含氧的盐水溶液处理的伤口内没有出现与正常愈合相伴随的表皮中所出现的增厚。

[0212] 因此, 根据伤口愈合作用谱, 但不受任何具体理论限制, 据信富含氧的盐水溶液可以在伤口内调节 NO 的局部水平和 / 或细胞水平。NO 在伤口愈合中调节生长因子、胶原沉积、炎症、肥大细胞迁移、表皮增厚和新血管形成。此外, 一氧化氮是由受氧调节的诱导型酶产生的。

[0213] 在肥大细胞迁移的情况下, 对于富含氧的溶液还出现了迁移早晚的差异。这与关

于 NO 合成抑制领域中已知的情况一致 (Amadeu 和 Costa, J. Cutan Pathol 33 :465-473, 2006)。

[0214] 现在参考图 41A 至 41F, 各图解比较了存在或不存在富含氧的盐水溶液的猪表皮组织的伤口愈合结果。如可以看到的, 在第 1、4 和 16 天进行了对照伤口和使用富含氧的盐水溶液的伤口的愈合观察。

[0215] 图 41A 图解第 1 天对照伤口的伤口愈合。如可以看到的, 伤口显示出表皮 / 真皮增厚和轮廓损失。图 41B 图解第 1 天使用富含氧的盐水溶液处理的伤口的伤口愈合。伤口显示出通常在新伤口上正常的表皮 / 真皮厚度和正常的轮廓。

[0216] 现在参考图 41C 和 41D, 图解了第 4 天对照伤口的伤口愈合和第 4 天用富含氧的盐水溶液处理的伤口的伤口愈合。对于图 41C 中所图解的对照伤口, 伤口显示出 600 微米的表皮突出物。在图 41D 中的用富含氧的盐水溶液处理的伤口中, 图示了 1200 微米的表皮突出物。因此, 在实验的前 4 天, 使用富含氧的盐水溶液处理的伤口中产生的表皮突出物显示出为未用富含氧的盐水溶液处理的伤口两倍的表皮生长速率。

[0217] 现在参考图 41E, 图解了第 16 天的对照伤口。该伤口与图 41F 中所图解的用富含氧的盐水溶液处理的伤口所示出的相比, 显示出具有表皮 / 真皮轮廓损失的较低分化的表皮。图 41F 在伤口中显示出更加分化的表皮和更正常的表皮 / 真皮轮廓。

[0218] 在炎症过程的前两个阶段, 外来体被破坏, 例如, 如果外来体为生物体; 或外来体周围的组织被松散, 例如, 如果外来体为碎片。在愈合阶段, 炎症开始消退; 各血管和血管模式变得再次正常; 并且创伤修复开始。修复过程的三个主要事件为 (1) 通过成纤维细胞增殖形成新的结缔组织; (2) 上皮再生; 和 (3) 长出新的毛细血管。

[0219] 甚至在炎症消退之前, 成纤维细胞就开始由周围的正常组织向损伤区域移动, 在所述正常组织中, 成纤维细胞通常以休眠状态存在。它们通过沿纤维蛋白链的变形运动迁移并将它们本身分布在整个愈合区域。一旦固定在损伤组织的位置内, 它们便开始合成胶原并分泌这种蛋白, 这种蛋白将其自身安排在纤维中。纤维以其纵轴在最大应力方向将其自身定向。随着胶原束硬度增加, 成纤维细胞逐渐退化并紧密地连接至该束, 并且损伤区域转化为疤痕组织。

[0220] 疤痕组织形成的同时, 在伤口边缘的完整的表皮细胞开始以一个片层增殖并向损伤区域中心移动。随着炎症消退, 增加了对直接血液来源的需要, 并且在创伤部位出现了血管发生。

[0221] 炎症是涉及多种细胞类型的复杂过程。例如, 肥大细胞释放触发早期血管舒张的介质, 伴随着内皮细胞的分离和在内皮下层的胶原纤维的暴露。血管内形成的细胞间隙内的纤维捕获血小板并触发介质从这些细胞释放。

[0222] 除血小板之外, 暴露的胶原纤维还与滤过加宽的血管壁的孔的血浆蛋白相互作用, 包括血液凝固级联、增加血管舒张、增加血管透性和趋化性的触发因子。

[0223] 此外, 补体级联可以被以下几种刺激物激活: 损伤的血管、损害的细胞释放的蛋白水解酶、任何参与的细菌的膜组分和抗原 - 抗体复合体。激活的补体组分的一些充当趋化因子, 负责白细胞向发炎区域的流动, 而其他则促进吞噬作用并参与细胞裂解。

[0224] 此外, 据信本发明的富含气体的流体或溶液还可以调控炎症的至少一方面所涉及的至少一种细胞因子, 所述细胞因子包括但不限于 MAF (巨噬细胞活化因子)、MMIF (巨噬

细胞迁移抑制因子)、MCF(巨噬细胞趋化因子)、LMIF(白细胞迁移抑制因子)、HRF(组胺释放因子)、TF(转移因子)、白细胞介素(IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15等)、TNF- α 、TNF- β 、干扰素(IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- ζ 、IFN- δ 等)、G-CSF(粒细胞集落刺激因子)、GM-CSF(粒细胞巨噬细胞CSF)、M-CSF(巨噬细胞CSF)、多潜能-CSF(IL-3)、成纤维细胞生长因子(aFGF、bFGF)、EGF(表皮生长因子)、NGF(神经生长因子)、PDGF(血小板源生长因子)、VEGF(血管内皮生长因子)、转化生长因子(TGF- α 、TGF- β 等)、NAP-2(嗜中性白细胞活化蛋白2)、PF-4(血小板因子4)、血小板球蛋白、MCP-1(单核细胞趋化蛋白1)、MCP-3、MIP-1 α 、MIP-1 β +(巨噬细胞炎性蛋白)、RANTES(激活后调节的正常T细胞表达和分泌的细胞因子(regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted chemokine))、HSP(热休克蛋白)、GRP(葡萄糖调节蛋白)、泛素以及其他细胞因子。

[0225] 因此,在某些实施方案中,富含气体的流体和/或治疗组合物可以增加抗炎性分子或细胞因子的产生和/或分泌或降低抗炎性分子或细胞因子的降解,从而减轻或预防炎症和/或炎性神经变性的至少一种症状。在其他实施方案中,本发明的富含气体的流体和/或治疗组合物可以降低促炎性分子或细胞因子的产生和/或分泌或增加促炎性分子或细胞因子的降解,从而减轻或预防炎症和/或炎性神经变性的至少一种症状。

[0226] 先前的研究已显示了抗MOG抗体在脱髓鞘作用的增大和EAE(实验性自身免疫脑脊髓炎)恶化中的关键作用,EAE是用于类风湿性关节炎的人自身免疫疾患的动物模型系统。(Linington,等人1992. J. Neuroimmunol. 40 :219-224)。此外,抗MOG的抗体参与了多发性硬化病的发病。(Berger等人 N. Engl. J. Med. 2003 Jul 10 ;349(2) :139-45)。

[0227] 如在图48和实施例12中所示的,本发明所发明的富含气体的流体放大了淋巴细胞对之前引发动物的抗原的反应。如图48中所示,当在用本发明的包含溶剂化电子的富含气体的流体重构的流体中培养时,与加压的、氧合的流体(压力罐)或对照去离子化流体相比,淋巴细胞增殖对MOG激发的反应更高。

[0228] 本发明的电动产生的富含气体的流体和溶液

[0229] 一种流体用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”一般地可指对于任何具体公开的实施方案的液体、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,在某些实施方案中“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。

[0230] 在本文所公开的具体实施方案中,溶解的气体包括环境空气。在一个优选的实施方案中,溶解的气体包括氧。在另一个实施方案中,溶解的气体包括氮氧化物。

[0231] 存在几种领域认可的富含气体液体(例如富氧水)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,叶轮将空气或氧与水混合,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。水中氧的自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,所述装置能够向上达到大约20ppm或水的自然氧水平的两倍。在某些实施方案中,氧水平可能甚至更高。

[0232] 在本文所公开的某些实施方案中,本发明的富含气体的流体提供了抗炎益处。本文所公开的某些实施方案涉及包含以下物质的治疗组合物:本发明的富含气体的流体以及任选的至少一种另外的治疗剂,如药物、金属、肽、多肽、蛋白、核苷酸、碳水化合物或糖基化蛋白、脂肪(包括油或蜡)或预防或减轻与炎症相关的病症或疾病的至少一个症状的其他药剂。

[0233] 此外,本文所公开的某些实施方案包括涉及创伤的炎症的治疗组合物和方法。伤口护理期望的是改善基础皮肤组织的健康和外观。诸如刀伤、擦伤或水疱的损伤诱导的伤口或诸如外科切口或造口(ostomiess)的手术诱导的伤口需要局部的治疗来补救受影响的区域并防止进一步的皮肤损害。如果伤口没有正确处理,则可能会导致进一步的皮肤刺激,如炎症,并且可能导致继发感染和受试者的进一步的不舒适。

[0234] 本文提供的具体实施方案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材料中的氧微泡,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。在某些实施方案中,在输注的流体主材料中的溶解氧水平可保持在大气压下大于约30ppm持续至少13小时。在其他具体的实施方案中,在输注的流体主材料中的溶解氧水平可保持在大气压下大于40ppm持续至少3小时。

[0235] 在另外的实施方案中,输注的流体主材料还包括盐水溶液。在其他的实施方案中,输注的流体主材料在大气压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。在某些实施方案中,输注的流体主材料可具有大气压下至少50ppm的溶解氧水平。

[0236] 在某些实施方案中,输注的流体主材料在氧已扩散到其中之后对通过它的激光束发光表现出瑞利散射持续以选择的时间段。

[0237] 表2说明了在用富含氧的盐水溶液处理的愈合伤口和在本发明的富含气体的富含氧的盐水溶液样品中进行的各种分压测量。

[0238] 表2

[0239]

组织氧测量	
探针 Z082B0	
在空气中 :171mmHg 23°C	
列	分压 (mmHg)
B1	32-36
B2	169-200
B3	20-180*

B4	40-60
*伤口深度最小,大多数 > 150,偶尔 20s	

[0240] 泡尺寸测量

[0241] 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。然而进行的实验不直接测量泡的尺寸,进行的实验确立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。

[0242] 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 微米过滤器而确立的。在进行这些测试时,第一材料 110(在这种情况下是流体)的体积和第二材料 120(在这种情况下是气体)的体积通过混合装置 100 以产生输出材料 102(即其中具有扩散的气体的流体)的体积。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。将注射器内的流体注射通过 0.22 微米过滤器进入到 50ml 烧杯中。所述过滤器包括 Milipor Millex 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。

[0243] 表 3. DO 水平

注射器中的 DO	0.22 微米过滤器之后的 DO 水平
42.1 ppm	39.7 ppm
43.4 ppm	42.0 ppm
43.5 ppm	39.5 ppm

[0244] 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。

[0245] 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,移除过滤器并且将最后一份样品从未过滤的输出材料 102 中取出。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。使用温克勒滴定法得到上述的 DO 水平测试结果。

[0246] 如本领域中所理解的那样,双层(界面的)(DL)当被放到液体中时出现在物体的

表面上。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对于电动双层的效应可以是可获得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，在相比于现有技术装置 10 的混合器 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，在优选的实施方案中，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，在转子表面和转子表面附近产生大量剪切力，通过并毗邻正在自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）小于通过并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，混合装置 100 的电动表面积的泡组分可能实质上大于现有技术扩散装置 10 的泡组分。

[0248] 因此，不受理论的束缚，混合装置 100 的混合室不仅具有 (i) 与现有技术装置 10 相比明显较高的表面积与体积比（现有技术装置 10 的表面积与体积比为 10.9，而本发明的混合器 100 的表面积与体积比为 39.4）以及 (ii) 高 7 倍的滞留时间，而且 (iii) 电流输出溶液的独特特性可能另外反映了混合装置 100 的明显较大的泡沫表面积的贡献。这些区别方面反映了本发明的混合器 100 的区别特征，并且可能它们的每一个都有助于本发明的输出材料 / 流体的独特电动特性。

[0249] 现在参考图 30，其中图解了在混合装置 100 中富含氧气的水中的 DO 水平，所述富含氧气的水储存在 500ml 的薄壁塑料瓶和 1000ml 的玻璃瓶中达至少 365 天。将每个瓶封盖并储存在 65 度的华氏温度下。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。

[0250] 参考图 31，其中图解了在混合装置 100 中富含氧气的水中的 DO 水平，所述富含氧气的水储存在 500ml 的薄壁塑料瓶和 1000ml 的玻璃瓶中。将两种瓶子都在 39 度的华氏温度下冷藏。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。

[0251] 包含通过本发明方法赋予本发明组合物的水合（溶剂化）电子形式的组合物

[0252] 在如本文所述的某些实施方案中（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运作以稳定传递给流体的电荷（例如水合的（溶剂化）电子）。不受理论或机制束缚，本发明的某些实施方案涉及富含氧的流体（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。某些实施方案可涉及水合的（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. 2003, 卷 24, 6 ; 802-804 ; 2003）

[0253] 辣根过氧化物酶 (HRP) 的影响。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 在不存在过氧化氢的情况下促进卟啉-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 pH6.0 下一个连苯三酚单位将在 20 秒内从连苯三酚形成 1.0mg 的红棕酚。这种红棕酚 (20 秒) 单位等同于 25°C 下每分钟大约 18 μ M 单位。

[0254] 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. 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产生。当与现有技术氧合的流体 (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。

[0255] 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的流动。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。

[0256] 如以下所述进行对于过氧化氢的存在本发明的富含氧的流体的几项化学测试, 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。

[0257] 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富含氧与溶剂化电子的本发明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。

[0258] 谷胱甘肽过氧化物酶研究

[0259] 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。

[0260] 产生富含气体的流体或溶液的装置

[0261] 相关技术说明

[0262] 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 复制的, 通过引用将该专利整体并入。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。

[0263] 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。

[0264] 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。

[0265] 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。

[0266] 入口 37 被构造并放置成使它定位在仅沿着相对较小部分（小于约 5%）的环状入口通道 32，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。

[0267] 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。

[0268] 在壳体 34 内形成单出口 40。混合的主材料和输注材料经由出口 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 穿过出口 40 抽吸出来的流体。

[0269] 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。

[0270] 如对本领域内的普通技术人员来说明显的，入口 37 仅仅赋予主材料轴流。只有转子 21 赋予主材料绕流。此外，出口 40 仅对出来的材料赋予或提供轴流。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，绕流矢量必须被破坏或消除。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。

[0271] 电动富含氧的水性流体和溶液

[0272] 图 2 提供了图解混合装置 100 的一些组件和材料进入该装置、在该装置内和出该装置的流动的框图。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 以新的方式搅动所述两种或多种输入材料产生具有新特征的输出材料 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中的悬浮液(例如,乳液),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合物、具有新的静电特征的组合、以及它们的组合。

[0273] 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、第二材料的来源 122 提供的第二材料 120、和任选地第三材料的来源 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。在一些实施方案中,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。在优选的实施方案中,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。在一些实施方案中,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)。

[0274] 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 的一种或多种可以分别在来源 112、来源 122 和来源 132 中在压力下储存,并且可以通过该压力被驱入混合装置 100。本发明并不限于用于分别从来源 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。

[0275] 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。

[0276] 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 流入输出材料 102 流出混合装置 100 的第二室 320 中。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)从第二室 320 被抽吸到储存容器 104 中。

[0277] 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。

[0278] 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 上并将输出材料 102 从混合装置 100 运出到合并的储存容器 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。

[0279] 参考图 2、图 4-9 和图 11, 提供混合装置 100 的实施方案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案或可用于成比例地构建选定尺寸的混合装置。

[0280] 参考图 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 可以摆动或以其他方式移动。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 在基本上固定的位置。

[0281] 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 可以相对于中心部分 522 连接在第一机械密封壳体 524 上。轴承壳体 532 可以相对于中心部分 522 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。

[0282] 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 Kulpsville, Pennsylvania 的 SKF USA Inc 制造的型号“202SZZST”, 该公司运营网站 (为 www.skf.com)。

[0283] 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) 并且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), 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)。

[0284] 混合室 330

[0285] 现在参考图 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。在一些实施方案中, 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 的装置的实施方案在本教导的范围内。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 之间形成的多个通孔 608。任选地, 侧壁 604 的外表面 606 可以包括其他特征, 如孔隙、突出、纹理及类似特征。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。

[0286] 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。在一些实施方案中, 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 可以包括其他特征,如通孔、突出、纹理及类似特征。

[0287] 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。在一些实施方案中,直径“D1”为约 3.04 英寸。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,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。在具体的实施方案中,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,在具体实施方案中,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。

[0288] 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。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,定子 700 沿旋转轴“ α ”可以具有约 5 英寸的长度。

[0289] 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。

[0290] 图 4-7 中所描绘的定子 700 的孔隙 708 和通孔 608 一般为圆柱形。通孔 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 的一个或多个通孔 608 可以具有与其他通孔 608 的直径不同的直径。例如,通孔 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,通孔 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,或者通孔 608 的直径可以沿转子 600 以另一方式变化。

[0291] 如下面关于替代性实施方案所描述的,孔隙 708 和通孔 608 可以具有一般不为圆柱形的形状,并且这些实施方案在本发明的范围内。例如,通孔 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,每个通孔 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。

[0292] 图 8 提供定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的通孔 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”。

[0293] 与定子 700 的孔隙 708 类似,转子 600 的通孔 608 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 的通孔 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 的通孔 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。

[0294] 定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的通孔 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,通孔 608 经过孔隙 708。

[0295] 在侧排“RLAT-1”至“RLAT-6”的每一排中的通孔 608 可以侧向间隔开而使得在侧排内的所有通孔 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”中的通孔 608 在最后侧排“RLAT-6”中的通孔 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。

[0296] 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。

[0297] 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”的每一个中的通孔 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 个通孔 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。

[0298] 参考图 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 内形成的通孔 608 连接转子 600 的内部 610 与混合室 330。

[0299] 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。

[0300] 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。

[0301] 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”。在一些实施方案中,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。

[0302] 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 622 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。

[0303] 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”。在具体实施方案中,直径“D5”可以为约 1.25 英寸。第二末端部分 726 可以具有基本上与直径“D5”类似的直径“D6”。

[0304] 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 中所描绘的实施方案中,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。

[0305] 参考图 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。

[0306] 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。

[0307] 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。

[0308] 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 fed 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。

[0309] 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 中所形成的通孔 608 从转子 600 的内部 610 出来。

[0310] 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。

[0311] 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。

[0312] 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。

[0313] 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。

[0314] 参考图 9,在转子 600 环绕旋转轴“a”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。排出的泡、小滴、粒子以及类似形式的第二材料 120 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。

[0315] 发动机 510

[0316] 参考图 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 510 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。在具体实施方案中,直径“D7”可以为约 0.25 英寸至 1.5 英寸。尽管在图 6 中所描绘的实施方案中,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案在本发明的范围内。

[0317] 还参考图 4,可能需要覆盖或遮蔽联接器 900。在图 4 和 6 中所图示的实施方案中,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部分 915 和 916 的弯曲部分 914。驱动防护罩 910 的基本上线性部分 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。

[0318] 发动机 510 可以通过支撑构件 920 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。在所描绘的实施方案中,支撑构件 920 包括心轴 780 所通过的通孔。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。

[0319] 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 所图示的实施方案中,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。

[0320] 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 每分钟 (“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。

[0321] 第一室 310

[0322] 参考图 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。

[0323] 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。

[0324] 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 中所描绘的实施方案中,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。

[0325] 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案中,第一室 310 的内侧可以按基本上环绕驱动轴 500 的部分 1020 的圆环形路径 (由图 9 中的箭头“C2”标示) 使第一材料 110 偏转。在这种实施方案中,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。

[0326] 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 的实施方案中 (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。

[0327] 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。在所描绘的实施方案中,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。

[0328] 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。

[0329] 图 7 和 9 中所描绘的泵 410 一般称为单螺杆泵。在这个实施方案中,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 所描绘的实施方案中,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。

[0330] 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。

[0331] 泵 410 还可以被构造成在第一材料 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 两种中是相同的,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 的基本上更大部分的有效内表面 706(参见图 7)。

[0332] 在包括外部泵 210 的实施方案中(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,在一些实施方案中,由泵 210 赋予的圆周速度和由泵 410 赋予的圆周速度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。

[0333] 在图 10 中所描绘的替代性实施方案中,泵 410 可以包括被构造成在第一材料 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。

[0334] 第二室 320

[0335] 现在参考图 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。

[0336] 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 330 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。

[0337] 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。输出材料 102 从具有转子 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 中所描绘的实施方案中, 出口 3010 可以偏移旋转轴“ α ”。出口 3010 被放置成以与驱动轴 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。

[0338] 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案中, 第二室 320 的内侧可以按基本上环绕驱动轴 500 的部分 3020 的圆环形路径使输出材料 102 偏转。

[0339] 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 的处理量的速率抽吸的任何泵。在这种实施方案中, 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。

[0340] 泵 420

[0341] 参考图 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 的实施方案中, 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。

[0342] 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。在所描绘的实施方案中, 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。

[0343] 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。在泵 410 将第一材料 110 抽吸到混合室 330 中同时, 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。

[0344] 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。

[0345] 图 6 和 7 中所描绘的泵 420 一般称为单螺杆泵。在这个实施方案中,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。

[0346] 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)。

[0347] 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。

[0348] 在替代性实施方案中,泵 420 可以具有图 10 中所描绘的泵 410 的基本上相同的构造。在这个实施方案中,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。

[0349] 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 的多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:通孔 608 的尺寸、通孔 608 的形状、通孔 608 的排列、通孔 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)。

[0350] 替代性实施方案

[0351] 参考图 12,描绘混合装置 5000。混合装置 5000 为混合装置 100 的替代性实施方案。本文使用相同的标号来标示基本上类似地对应于混合装置 100 的组件的混合装置 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。

[0352] 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。

[0353] 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)的多个通孔 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 中形成的通孔 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 可以以泡、小滴、粒子以及类似形式进入混合室 330。

[0354] 替代性实施方案

[0355] 混合装置 100 的替代性实施方案可以使用图 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。本文使用相同的标号来标示基本上类似地对应于混合装置 100 的组件的中心部分 5900 的相关组件。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)。

[0356] 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。在其他实施方案中,中心部分 5900 可以由非导电性材料构建。在这类实施方案中,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。

[0357] 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隔离。

[0358] 现在参见图 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。

[0359] 在这个实施方案中,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。

[0360] 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 的替代性实施方案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。

[0361] 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。在具体实施方案中,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。

[0362] 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,并且这些实施方案在本发明的范围内。

[0363] 混合室 330 内的混合

[0364] 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。

[0365] 因此,跨混合装置 100 的压降基本上降低了。在图 2、4-9 和 11 中所描绘的实施方案中,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。

[0366] 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。

[0367] 微穴

[0368] 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 内形成的通孔 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 紊流。

[0369] 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。通孔 608 和任选的孔隙 708 破坏层流并且可引起第一材料 110 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(空泡)。空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。当空泡破裂时,产生极高的压力。在两个对齐的开口(例如,孔隙 708 之一和通孔 608 之一)彼此经过时,出现震荡(冲击波),产生显著的能量。与穴和震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。

[0370] 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 100 提供改变流体分子键角的最连续冲击能量,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。

[0371] 现在参考图 15,提供了转子 600 的替代性实施方案转子 6000。可以将混合室 330 中第一材料 110 内产生的穴构造造成沿混合室 330 的长度以不同频率出现。可以通过改变沿

转子 600 的长度的通孔 6608 的数目和 / 或布置来改变穴的频率。通孔 6608 的每一个可以基本上类似于通孔 608 (上面讨论的)。

[0372] 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。通孔 6608 的密度从部分 6100 至部分 6200 增加, 部分 6100 的孔数目高于部分 6200 的孔数目。通孔 6608 的密度从部分 6200 至部分 6300 也是增加的, 部分 6200 的孔数目高于部分 6300 的孔数目。由于部分 6100、6200 和 6300 中形成的通孔 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。

[0373] 通过制造具有在具体区域内适当地排列的所需数目的通孔 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 内的所需的震荡频率 (或频率) 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 内形成的通孔 608 的具体数目和排列来达成。

[0374] 图 19-21 描绘在定子 700 内形成的孔隙 708 和在转子 600 内形成的通孔 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 和通孔 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 和通孔 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。

[0375] 孔隙 708 与通孔 608 的相对排列也可以影响混合室 330 中的穴的产生。图 17 图解其中孔隙 708 跨混合室 330 与通孔 608 对准的实施方案。在这个实施方案中, 转子 600 的旋转使转子的通孔 608 与定子 700 的孔隙 708 直接对齐。当彼此直接对齐时, 孔隙 708 和通孔 608 产生的压缩和解压缩力直接彼此对齐。

[0376] 在图 18 中所描绘的实施方案中, 孔隙 708 和通孔 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” 可以作为通孔 608 的尺寸的函数来确定。例如, 偏移量 “X” 可以约等于通孔 608 的直径的一半。如果转子 600 或定子 700 内包括不为通孔 608 和孔隙 708 的特征 (如, 凹陷、突出等) 或除通孔 608 和孔隙 708 外的其他特征 (如, 凹陷、突出等), 则偏移量 “X” 可以作为这些特征的尺寸的函数确定。以这种方式, 定子 700 的孔隙 708 和转子 600 的通孔 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)。

[0377] 现在参考图 22-25, 提供了孔隙 708 和通孔 608 的合适的横截面形状的非限制性实例。孔隙 708 和 / 或通孔 608 的横截面形状可以如图 22 所示为正方形, 如图 23 所示为圆环形以及类似形状。

[0378] 孔隙 708 和 / 或通孔 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 描绘具有相对于宽部分 7022 的窄部分 7020 的泪滴横截面形状。如果通孔 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。

[0379] 可以通过形成具有如图 25 所示的螺旋构造的孔隙 708 和 / 或通孔 608 将另外的旋转力引入混合室 330。流向和流出具有螺旋构造的孔隙 708 和 / 或通孔 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案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 / 或通孔 608 以实现用于在混合室 330 中混合材料的各种震荡和搅动力。

[0380] 双层效应

[0381] 混合装置 100 可以被构造为通过第一材料 110 和第二材料 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作用(下面所述)的复杂混合。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观察到,包括在输出材料内被稳定的溶解电子形式。

[0382] 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 模型表明分散抗衡离子层向水中延伸约 1 微米。

[0383] 根据具体方面,上面提到的电动作用是由带电荷表面 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,即使在液体 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 存在于扩散抗衡离子层 7128 内与表面 7120 隔开。因此,在液体 7120 移动时,扩散抗衡离子 7126 的一些被运离表面 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”。

[0384] 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 / 或在第一材料 110 中形成的至少一种 EDL 引起的电动作用(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。

[0385] 第一材料 110 穿过混合室 330 相对于表面干扰(例如通孔 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比、混合材料在混合室的增加的滞留时间、以及进一步与小的平均泡尺寸(以及因此的明显更大的泡表面积)组合使得能有效对本发明输出材料赋予 EDL 介导的作用。

[0386] 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案中,液体 7120 的移动和 / 或流动电流有助于在内表面 705 和外表面 606 处涉及 H_2O 、 OH^- 、 H^+ 和 O_2 的氧化还原反应。

[0387] 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。

[0388] 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) 可以是移动的。移动的抗衡离子 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 供应至和移出部分 7140 的入口“入”和出口“出”具有明显小于平行板 7142 和 7144 的表面积 (和较低的表面积与体积比), 从而降低了第一材料 110 中进入和离开部分 7140 的移动的抗衡离子 7126 部分。因此, 进入和出部分 7140 局部地增加了流动电流。尽管混合装置 100 内通常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)。

[0389] 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, 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, 所以不可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。

[0390] 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。

[0391] 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 之间存在通过较多导电性通路的其他导电机理, 则回流可以使用那些较多导电性通路。例如, 导电性金属板 7142 和 7144 可以提供更导电性通路; 然而这些更导电性通路仅传递电子电流而不传递离子电流。

[0392] 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:

[0393] $O_2 + H_2O \rightarrow O_3 + 2H^+ + 2e^-$ 。

[0394] 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:

[0395] $2H^+ + e^- \rightarrow H_2$ 。

[0396] 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。

[0397] 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。

[0398] 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。

[0399] 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。

[0400] 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物种的电化学电压值。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。

[0401] 用 HRPE 和连苯三酚测试瓶 7150 中的去离子水 7153 得到了 HRP 介导的连苯三酚反应活性, 与本文所述的替代性转子/定子实施方案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物种稳定。

[0402] 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。

[0403] 滞留时间

[0404] 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 的长度和混合室 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,在具体实施方案中,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。

[0405] 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,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 的实施方案具有约 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)相互作用比现有技术装置 10 的可能的时间长约 7 倍。在其他实施方案中,滞留时间比现有技术装置 10 可能的滞留时间高至少 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 倍或更高。

[0406] 参考下表 4,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)。

[0407] 表 4. 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基本上增加的(例如,7 倍)滞留时间。

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)
[0408] 现有技术装置 10	60	1.000	231.000	12.876	0.056
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

[0409] 输注速率

[0410] 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。

[0411] 输出材料 102

[0412] 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。下面讨论对输出材料 102 进行分析以鉴定来自被混合装置 100 处理的输出材料 102 的一个或多个特性的结果。

[0413] 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尺寸不大于 0.1 微米。

[0414] 溶解氧水平的衰退

[0415] 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。

[0416] 现在参考图 30,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。

[0417] 现在参考图 31,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。

[0418] 分子相互作用

[0419] 传统上,量子特性被认为是属于小于 10^{-10} 米的基本粒子,而我们日常生活的宏观世界则被称为是经典的,因为它是按照牛顿运动定律运行的。

[0420] 近来,分子已被描述为形成尺寸随着稀释而增加的集簇。测得这些集簇的直径为若干微米,并且已经报道尺寸随着稀释呈非线性增加。推测测量为直径为 100 纳米的量子相干域在纯水中产生,并且相干域中的水分子的集体振动可最终成为锁定为电磁场波动的相,提供水中的稳定振荡,以激发长久的相干震荡的形式提供“记忆”形式,该长期相干震荡对于改变水的集体结构的水中溶解物质具有特异性,这可依次地确定发生的特异性相干震荡。当这些震荡由磁场相耦合变为稳定时,稀释时水仍可带有“种子”相干震荡。当分子的集簇尺寸增加时,其电磁信号相应扩大,增强由水携带的相干震荡。

[0421] 尽管溶解分子的集簇尺寸和水的详细微观结构发生变化,但是相干震荡的特异性

可存在。一种用于考虑水的性质变化的模型基于对结晶的考虑。

[0422] 参考图 36, 显示了形成纳米级笼 8700 的简化的质子化水集簇。质子化水集簇通常呈现 $H^+(H_2O)_n$ 形式。一些质子化水集簇是天然存在的, 如在电离层中。不受任何具体理论的束缚, 并且根据具体方面, 其他类型的水集簇或结构 (集簇、纳米笼等) 是可能的, 包括赋予本发明的输出材料的包含氧和稳定化电子的结构。氧原子 8704 可以被捕获到所得结构 8700 中。半结合的纳米笼的化学性质容许氧 8704 和 / 或稳定化电子在延长的时间段内保持溶解。诸如医药化合物的其他原子或分子可以被笼蔽以用于持续递送的目的。溶液材料与溶解化合物的特定化学性质取决于那些材料的相互作用。

[0423] 经由实验显示混合装置 100 所处理的流体表现出不同的结构特征, 这与在集簇结构情况下的流体分析是一致的。

[0424] 已证明通过混合装置 100 处理的水与正常的未处理的水相比具有可检测的结构差异。例如, 处理的水显示出具有比未处理的水中所观察到的更多的瑞利散射。在所进行的实验中, 制备处理的和未处理的水样品 (通过将它们每一种密封在单独的瓶中), 将其编码 (用于以后鉴定处理的样品和未处理的样品) 并送入独立的测试实验室进行分析。只在测试完成后, 才解释编码以揭示哪个样品被混合装置 100 处理。

[0425] 在实验室, 将两种样品置于具有 633 纳米波长的激光束中。在测试前流体已被密封在玻璃瓶中约 1 周。对于处理的样品, 样品 B 散射光, 这与其相对于激光源的位置无关。然而, 样品 A 则不然。在开瓶后 2 至 3 小时后, 样品 B 的散射效应消失。这些结果暗示水表现出了引起水保持其特性的记忆并且该记忆随时间消散。这些结果还暗示处理的水的结构与未处理的流体的结构在光学上是不同的。最后, 这些结果暗示光学效应不直接与 DO 水平相关, 因为开始的 DO 水平为 45ppm 并且实验结束时评估的 DO 水平为约 32ppm。

[0426] 电荷稳定的纳米结构 (例如电荷稳定的含氧纳米结构):

[0427] 如上“双层效应”“滞留时间”“输注速率”“泡尺寸测量”中所述的, 混合装置 100 在几毫秒内产生第一材料 110 和第二材料 120 以及复合物的独特的非线性流体动力学相互作用, 动力学涡流为复合物混合提供以有效大的表面积接触 (包括装置的表面积和小于 100nm 的特别小气泡的表面积), 从而提供本文所述的新型电动效应。此外, 使用包括绝缘的转子和定子部件的特别设计的混合装置本文证明了部件局部化的电动效应 (电压 / 电流) (见工作实施例 20)。

[0428] 如本领域已公认的, 已知电荷再分配和 / 或溶剂化电子在水溶液中高度不稳定。根据具体的方面, 申请人的电动效应 (例如电荷再分配, 包括, 具体方面中的溶剂化电子) 在输出材料 (例如, 盐水溶液, 离子溶液) 中惊人地稳定。事实上, 如本文所述, 本发明的电动流体 (例如 RNS-60 或 Solas) 的性质和生物活性的稳定性可在气密性容器中保持数月, 这说明溶解的气体 (例如氧气) 的参与有助于产生和 / 或保持和 / 或介导本发明的溶液的性质和活性。显著地, 如本文工作实施例所描述的, 电荷再分配和 / 或溶剂化电子可在本发明的电动离子水性流体中稳定地形成, 其量足以在流体与活性细胞 (例如, 哺乳动物细胞) 接触后提供对细胞膜电位或细胞膜电导率 (例如, 参见细胞膜片钳工作实施例 23 和 24) 中的至少一种的调节。

[0429] 如“分子相互作用”部分所描述的, 为了评价本发明电动流体 (例如, 电动盐水溶液) 的稳定性和生物相容性, 申请人已提出水分子和溶解于水中的物质 (例如氧) 分子之

间的相互作用改变水的集体结构并提供纳米笼簇,包括包含赋予本发明的输出材料的氧和 / 或稳定的电子的纳米结构。不受机制的约束,和根据本发明所述的活性和性质,在具体的方面纳米结构的配置如下:含有(至少用于形成和 / 或稳定性和 / 或生物活性)溶解的气体(例如氧);在与细胞膜或其相关组分接触之后,这样的配置使电动流体(例如 RNS-60 或 Solas 盐水流体)能够调节(例如赋予或接受)电荷和 / 或电荷效应;和在具体的方面,以生物相关形式提供稳定(例如,携带、驻留、捕获)溶剂化电子。

[0430] 根据具体的方面以及由本发明所支持,在离子或盐水(例如标准盐水,NaCl)溶液中,本发明的纳米结构包括电荷稳定的纳米结构(例如平均直径小于 100nm),该纳米结构可以包含电荷稳定的水合外层中的至少一种溶解的气体分子(例如氧)。根据其他的方面和如本发明其他地方所描述的,电荷稳定的水合外层可包括驻留有至少一种溶解的气体分子(例如,氧)的笼或空隙。根据进一步的方面,由于合适的电荷稳定的水合外层的提供,电荷稳定的纳米结构和 / 或电荷稳定的含氧纳米结构可另外地包含溶剂化电子(例如稳定的溶剂化电子)。

[0431] 不受机理和具体理论的限制,本发明的优先权日之后,已经提出了由水性液体中被离子稳定的与环境气体(大气)平衡的电荷稳定的微泡(Bunkin 等, *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 104:486-498, 2007;通过引用并入本文)。根据本发明的具体方面,申请人的新的电动流体包括电荷稳定的含氧纳米结构的新的生物活性形式,并可进一步包括这种结构的新阵列(array)、簇或缔合。

[0432] 根据电荷稳定的微泡模型,水结构的短程分子序态被气体分子(例如,开始与非吸附离子复合的溶解的气体分子提供短程序态缺陷)的存在所破坏,提供离子液滴的凝聚,其中,所述缺陷被水分子的第一和第二配位层包围,所述水分子的第一和第二配位层可选地被配位层中占据六个和 12 个空缺位的吸附性离子(例如获取 Na⁺ 离子屏蔽层以形成电双层)和非吸附性离子(例如占据第二配位层 Cl⁻ 离子)填充。在不饱和离子溶液中(例如不饱和盐水溶液),这种水合的“核”保持稳定直至第一和第二层分别被六个吸附性离子和五个吸附性离子填充,然后,经过库伦扩增产生含气体分子的内部空隙,其中吸附性离子(例如,Na⁺离子)被吸附至形成的空隙的表面,同时非吸附性离子(或一些部分)被分散进入溶液(同上 Bunkin 等)。在这个模型中,纳米结构的空隙防止吸附至其表面的离子(例如,Na⁺离子)之间的库伦排斥所导致的塌陷。含空隙的纳米结构的稳定性被假设为由于具有类似电荷的溶解离子选择性吸附在空隙 / 气泡表面上和在溶解气体和气泡内的气体之间的扩散平衡所引起的,其中得到的电双层所施加的朝向外部的负性静电压力为表面张力提供稳定的代偿,并且气泡内部的气体压力与环境压力平衡。根据这个模型,这些微泡的形成需要离子组分,在特定方面,粒子之间排斥介导的缔合可提供更大序态的簇(阵列)的形成(同前)。

[0433] 电荷稳定的微泡模型说明粒子可以是气体微泡,但是仅考虑离子溶液中形成同时与环境空气平衡的这些结构,其不能表征并且不能表示是否氧能够形成这些结构,以及同样不表示是否溶剂化电子可通过这些结构缔合和 / 或稳定。

[0434] 根据具体的方面,本发明的包括电荷稳定的纳米结构和 / 或电荷稳定的含氧纳米结构的电动流体是新颖的,并且根据微泡模型从根本上不同于假设的非电动的大气电荷稳定的微泡结构。显著地,这个结论是无法回避的,至少部分来自下面的事实,即对照盐水溶

液不具有本发明公开的生物学性质得到的,而申请人的电荷稳定的纳米提供新的,生物活性形式的电荷稳定的含氧纳米结构。

[0435] 根据本发明的具体的方面,申请人的新的电动装置和方法提供新的电动改变的流体,所述流体包括非常大量的电荷稳定的纳米结构,该量超过了在与空气平衡的离子流体中同时或不同时存在的量,或在任何非电动产生的流体中的量。在具体的方面,电荷稳定的纳米结构包括电荷稳定的含氧纳米结构。在附加的方面,电荷稳定的纳米结构是所有或基本上所有电荷稳定的含氧纳米结构或电荷稳定的含氧纳米结构是电动流体中主要的电荷稳定的含气体纳米结构物种。

[0436] 根据又进一步的方面,电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构可包括或驻留溶剂化电子,从而提供新的稳定的溶剂化电子载体。在具体的方面,电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构提供新型电极(或倒置电极),这与常规的具有单一有机配位阳离子的溶质电极相反,其具有多个绕空隙或含氧原子的空隙稳定排列的阳离子,其中,所排列的钠离子可与水合外层配位,而不是与有机分子配位。根据具体的方面,溶剂化电子可由水分子的水合外层来容纳,或优选地容纳在分布在所有阳离子上的纳米结构空隙中。在特定的方面,本发明的纳米结构提供溶液中的新型“超级电极”结构,其不仅通过提供溶剂化电子在多个阵列的钠阳离子上的分布/稳定,还提供溶剂化电子与空隙中捕获的(多个)氧分子的缔合或部分缔合——溶剂化电子分布在钠原子和至少一个氧原子的阵列上。根据具体的方面,因此,作为本发明公开的与本发明的电动流体缔合的“溶剂化电子”在包括被水分子直接水合的传统模型中可能不被溶剂化。可选地,与干燥的电极盐类相同之处很少,本发明的电动流体中的溶剂化电子可分布在多个电荷稳定的纳米结构上以提供“格点粘合剂”以稳定水性溶液中高序态阵列。

[0437] 在具体的方面,本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构能够与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。在具体的方面,驻留了溶剂化电子的本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构能够与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。

[0438] 在具体的方面,本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构作为电荷和/或电荷效应供体(递送)和/或作为电荷和/或电荷效应受体与细胞膜或其组分或蛋白质等发生相互作用以介导生物活性。在具体的方面,驻留了溶剂化电子的本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构作为电荷和/或电荷效应供体和/或作为电荷和/或电荷效应受体与细胞膜发生相互作用以介导生物活性。

[0439] 在具体的方面,本发明的电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构与所观察到的本发明的电动流体的稳定性和生物性质一致且是所观察到的本发明的电动流体的稳定性和生物性质的原因并进一步提供新的电极(或倒置电极(inverted electrode)),所述电极提供水性离子溶液(例如盐水溶液,NaCl等)中稳定的溶剂化电子。

[0440] 在具体的方面,电荷稳定的含氧纳米结构基本上包括,采取下面的形式或可产生,电荷稳定的含氧纳米气泡。在具体的方面,电荷稳定的含氧簇提供形成电荷稳定的含氧纳米结构的相对较大的阵列和/或电荷稳定的含氧纳米气泡或其阵列。在具体的方面,电荷稳定的含氧纳米结构可提供在与疏水表面(见本文下面实施例 25)接触之后形成疏水纳米气泡。

[0441] 在具体的方面,电荷稳定的含氧纳米结构基本含有至少一个氧分子。在特定的方面,电荷稳定的含氧纳米结构基本含有至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 10 至少 15、至少 20、至少 50、至少 100 或更多个氧分子。在具体的方面,电荷稳定的含氧纳米结构含有或产生约 $20\text{nm} \times 1.5\text{nm}$ 的纳米气泡(例如疏水纳米气泡),含有约 12 个氧分子(例如基于氧分子的尺寸(约 $0.3\text{nm} \times 0.4\text{nm}$),假设为理想气体并应用 $n = PV/RT$,其中 $P = 1\text{atm}$, $R = 0.082 \text{ L} \cdot \text{atm}/\text{mol} \cdot \text{K}$; $T = 295\text{K}$; $V = \pi r^2 h = 4.7 \times 10^{-22}\text{L}$,其中 $r = 10 \times 10^{-9}\text{m}$, $h = 1.5 \times 10^{-9}\text{m}$,且 $n = 1.95 \times 10^{22}\text{mol}$)。

[0442] 在具体的方面,流体中存在的氧分子的百分数是选自下列各项组成的组的百分数量:大于 0.1%;1%;2%;5%;10%;15%;20%;25%;30%;35%;40%;45%;50%;55%;60%;65%;70%;75%;80%;85%;90%;且 95%,所述氧分子处于离子水性流体中的具有电荷稳定的结构的纳米结构或其阵列中。优选地,此百分数大于约 5%,大于约 10%,大于约 15%,或大于约 20%。在附加的方面,在离子水性流体中具有电荷稳定的结构的电荷稳定的含氧纳米结构或其阵列的大体尺寸选自下列各项组成的组:小于 100nm;90nm;80nm;70nm;60nm;50nm;40nm;30nm;20nm;10nm;5nm;4nm;3nm;2nm;and 1nm。优选地,这个尺寸小于约 50nm,小于约 40nm,小于约 30nm,小于约 20nm 或小于约 10nm。

[0443] 在具体的方面,本发明的电动流体包括溶剂化电子。在进一步的方面,本发明的电动流体包括电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构,和/或其阵列,其包括下列中的至少一种:溶剂化电子;和独特的电荷分布(极性、对称、非对称电荷分布)。在具体的方面,电荷稳定的纳米结构和/或电荷稳定的含氧纳米结构和/或其阵列具有顺磁性。

[0444] 相反,相对于本发明的电动流体,对照压力罐氧合流体(非电动流体)等不含有这种能够调节细胞膜电位和细胞膜电导率中的至少一种的电荷稳定的生物活性纳米结构和/或生物活性的电荷稳定的含氧纳米结构和/或其阵列。

[0445] 用于制备富含气体的流体的系统

[0446] 本发明公开的系统和方法容许以高浓度稳定地富集气体(例如,氧)而具有最小限度的被动损失。这种系统和方法可以有效地用于将很多种气体以较高的百分比富集到很多种流体中。仅举例来说,使用公开的系统 and / 或方法,在室温下通常具有约 2-3ppm(百万分率)的溶解氧的去离子水可以达成如下范围内的溶解氧水平:至少约 5ppm、至少约 10ppm、至少约 15ppm、至少约 20ppm、至少约 25ppm、至少约 30ppm、至少约 35ppm、至少约 40ppm、至少约 45ppm、至少约 50ppm、至少约 55ppm、至少约 60ppm、至少约 65ppm、至少约 70ppm、至少约 75ppm、至少约 80ppm、至少约 85ppm、至少约 90ppm、至少约 95ppm、至少约 100ppm、或更高或在它们之间的任何值。根据具体的示例性实施方案,可以产生具有约 30-60ppm 溶解氧水平的富含氧的水。

[0447] 表 5 说明了在用富含氧的盐水溶液(表 5)处理的愈合伤口和在本发明的富含气体的富含氧的盐水溶液样品中进行的各种分压测量。

[0448] 表 5

[0449]

组织氧测量

探针 Z082B0	
在空气中 :171mmHg	23°C
列分压 (mmHg)	
B1	32-36
B2	169-200
B3	20-180*
B4	40-60
伤口深度最小,大多数 > 150,偶尔 20s	

[0450] **减少宿主抗移植物病**

[0451] 电动产生的流体（例如，富含氧的电动产生的流体）的立即应用有可能降低可移植的细胞、细胞系、组织和器官的宿主抗移植物病 (GVHD)。电动的富含氧的溶液可用于人工血液和血液灌注医疗过程，如冠状动脉搭桥手术 (coronary bypass surgery) 和电击 - 创伤过程。类似地，电动的富含氧的溶液可以在用于移植的运输中和在手术时用于灌注实体器官，如肝、肾、心脏等。根据具体方法，根据所公开的实施方案制备的电动的富含氧的溶液的使用导致了较长的储存时间和较好的移植结果，包括 GVHD 的减少。这可以应用于可能用于活的受试者或植入活的受试者的新鲜的、冷冻的、冷藏的、解冻的、脱水的、保存的或处理的材料。

[0452] 在某些实施方案中，使用本发明的富含气体的流体储存、运输、混合、递送和或移植器官由于减少炎症、减少坏死和 / 或增加细胞功能而可以提供更成功的器官和 / 或组织的保存和 / 或移植。此外，本发明的富含气体的流体可以静脉内递送给受试者，包括人患者。有可能对血浆氧合以用于受试者（人体或其他动物），该血浆可以具有治疗癌症或其他医药病症或疾病的用途。还可以在储存较长的时间段时，使用血浆氧合来保存血浆。

[0453] 如在此所用的“受试者”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。

[0454] **施用的途径和形式**

[0455] 在具体的示例性实施方案中，本发明的富含气体的流体可作为单独的治疗组合物或与另一种治疗剂的组合发挥功能以便该治疗组合物防止或减轻至少一种炎症症状。本发明的治疗组合物包括能够被施用给需要它们的受试者的组合物。在某些实施方案中，治疗组合物制剂还可包括选自以下组成的组的至少一种其他剂：载体、佐剂、乳化剂、悬浮剂、增甜剂、调味剂、香料和粘合剂。

[0456] 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、封装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

薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸钠；粉末状黄耆胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可油和栓剂蜡 (suppository wax)；油类，例如花生油、棉籽油；红花油；芝麻油；橄榄油；玉米油和大豆油；二醇类；例如丙二醇；酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原的水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇和磷酸盐缓冲溶液，以及其他非毒性相容的润滑剂例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和加香剂，根据配制者的判断，防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。在具体的方面，此类载体和赋形剂可以是本发明的富含气体的流体或溶液。

[0457] 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。

[0458] 除了本发明的治疗性富含气体的流体之外，治疗组合物还可包括惰性稀释剂例如另外的非富含气体的水或其他溶剂，增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类（具体而言，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯，和它们的混合物。如由本领域普通技术人员所理解的那样，具体治疗组合物的新颖且改进的制剂、新颖的富含气体的治疗流体和递送新颖的富含气体的治疗流体的新颖方法可通过用相同、相似或不同的组合物的富含气体的流体代替一种或多种惰性稀释剂而获得。例如，常规的水可以由富含气体的流体代替或补充，生产所述富含气体的流体是通过将氧混合到水或去离子水中以提供富含气体的流体。

[0459] 在某些实施方案中，本发明的富含气体的流体可与一种或多种治疗剂组合在一起和/或单独使用。在具体的实施方案中，并入富含气体的流体可包括用一种或多种富含气体的流体代替一种或多种本领域已知的溶液，例如去离子水、盐溶液及类似物，由此提供用于递送给受试者的改进的治疗组合物。

[0460] 某些实施方案提供了治疗组合物，所述治疗组合物包含本发明的富含气体的流体、药物组合物或其他治疗剂或其药学上可接受的盐或溶剂化物、以及至少一种药物载体或稀释剂。这些药物组合物可用在前述疾病或病症的预防和治疗中和如以上所提到的治疗法中。优选地，载体必须是药学上可接受的并且必须与组合物中的其他成分相容，即对组合物中的其他成分没有有害影响。载体可以是固体或液体并且优选地被配制为单位剂量制剂，例如可包含按重量计 0.05% 到 95% 活性成分的片剂。

[0461] 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。

[0462] 施用途径

[0463] 对于具体受试者的最适合的施用手段将取决于被治疗的疾病或病症的性质和严重程度或者被使用的治疗法的性质，以及治疗组合物或另外的治疗剂的性质。在某些实施方案中，口服或局部施用是优选的。

[0464] 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。

[0465] 可提供适于口服施用的其他制剂以包括可凭借各种类型的计量剂量的加压气溶胶、喷雾器、雾化器或吸入器而产生的细粒粉剂或雾剂。具体而言, 治疗剂的粉末或其他化合物可被溶解或悬浮在本发明的富氧流体中。

[0466] 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。

[0467] 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肉注射而施用。

[0468] 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。

[0469] 适合于局部、眼内、耳内或鼻内应用的制剂包括软膏、乳膏、糊剂、洗剂、尼膏剂、凝胶 (例如水凝胶)、喷雾剂、可分散的粉末和颗粒、乳剂、使用流动推进剂的喷雾剂或气溶胶剂 (例如脂质体喷雾剂、滴鼻剂、鼻喷雾剂及类似物) 以及油类。对于此类制剂适合的载体包括石油膏、羊毛脂、聚乙二醇、醇和它们的组合。鼻腔递送或鼻内递送可包括计量剂量的任何这些制剂或其他制剂。同样, 耳内或眼内可包括滴剂、软膏、冲洗液 (irritation fluid) 及类似物。

[0470] 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形状。

[0471] 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。

[0472] 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、喷雾器、雾化器或吸入器而产生的细粒粉剂或雾剂。具体而言, 治疗剂的粉末或其他化合物可被溶解或悬浮在本发明的富含气体的流体中。

[0473] 对于经口腔的肺部施用, 所述粉末或小滴的颗粒尺寸通常在 $0.5-10 \mu\text{M}$ 的范围内, 优选 $1-5 \mu\text{M}$, 以确保递送到支气管树中。对于鼻腔施用, 在范围 $10-500 \mu\text{M}$ 中的颗粒尺寸是优选的以确保驻留在鼻腔中。

[0474] 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。在某些实施方案中, 如本文所公开的那样, 本发明的富含气体的流体可

以除标准的液化推进剂以外一起使用或代替标准的液化推进剂使用。在使用过程中,这些装置通过适合于递送计量体积(通常从 10 μ L 到 150 μ L)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。

[0475] 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。

[0476] 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。

[0477] 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。

[0478] 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。

[0479] 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。根据特定的方面,活性成分的每日剂量可以为 0.001L 至 10L,优选的剂量为约 0.1L 至 1L。

[0480] 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。

[0481] 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、黄耆胶、纤维素衍生物、有机硅、膨润土、硅酸和滑石,或它们的混合物。粉末和喷雾剂也可以包含赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝和硅酸钙,或这些物质的混合物。可通过制造气溶胶药物常规使用的任何已知手段将纳米晶体抗微生物金属的溶液转换成为气溶胶或喷雾。一般来说,此类方法包括加压或提供一种工具,该工具通常用惰性载体气体对溶液的容器进行加压并使该加压的气体通过一个小孔。喷雾剂可另外地包含常规推进剂,例如氮气、二氧化碳和其他惰性气体。此外,可将微球或纳米颗粒与本发明的富含气体的治疗组合物或流体以施用该治疗化合物给受试者所需要的任何途径一起利用。

[0482] 注射用制剂可存在于单位剂量或多剂量密封的容器例如安瓿和管形瓶中,并且可被储存在仅需要在使用前立即添加无菌液体赋形剂或富含气体的流体的冷冻干燥的(冻干的)的条件下。临时性注射溶液和悬浮液可从无菌的粉末、颗粒和片剂制备。注射性组合物用的有效的药物载体的需求是本领域普通技术人员公知的。参见例如, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker 和 Chalmers, 编, 238-250(1982) 和 *ASHP Handbook on Injectable Drugs*(注射药物的 ASHP 手册), Toissel, 第四版, 622-630(1986)。

[0483] 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。

[0484] 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。

[0485] 适合的药物载体描述于该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。

[0486] 施用给受试者(尤其是哺乳动物,特别是人)的剂量在本发明的背景中应该足以经合理的时段在动物中实现治疗反应。本领域的熟练技术人员将认识到剂量将取决于各种因素,包括动物的状态、动物的体重以及被治疗的病症。适合的剂量是在受试者中产生已知实现希望的反应的治疗组合物的浓度。

[0487] 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。

[0488] 将会理解的是可以进行组合化合物的施用:(1) 以处于共制剂中的化合物的组合同时施用或(2) 交替地施用,即连续地、相继地、平行地或同时地以独立的药物制剂递送化合物。在交替疗法中,例如,在施用第二种,任选地第三种活性成分时的延迟不应丧失活性成分的协同疗效的益处。根据利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案,该组合理想地应使施用达到最有效的结果。在利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案中,该组合理想地应使施用达到每种活性成分的血浆峰值浓度。通过施用组合的共制剂的每天一次一丸的方案对于一些遭受炎性神经变性疾病的患者可能是可行的。根据特定实施方案,该组合的活性成分的有效血浆峰值浓度大约为 $0.001 \mu\text{M}$ 至 $100 \mu\text{M}$ 。最佳的血浆峰值浓度可通过为具体患者所开的制剂和剂量方案来实现。还应当理解的是,本发明的流体和乙酸格拉默,干扰素 β , 米托蒽醌和/或那他珠单抗或其任一种的生理学功能性衍生物,不论同时或序贯地提供,均可单独施用,多次施用或其任意组合。一般而言,在交替疗法(2)期间,连续地施用有效剂量的每种化合物,而在共制剂疗法(1)中,一同施用有效剂量的两种或两种以上化合物。

[0489] 本发明的组合可方便地提供为以单位剂型中的药物制剂。方便的单位剂型包括每个单位剂型 1mg 至 1g 范围内任何量的活性成分,例如但不限于: 10mg 至 300mg 。本发明流

体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗组合的协同效应可在例如 1 : 50 至 50 : 1 (本发明流体 : 格拉替雷,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗) 的较大比率范围内实现。在一个实施方案中,该比率可在约 1 : 10 至 10 : 1 的范围内。在另一实施方案中,在共同配制组合剂型 (例如丸剂、片剂、囊片或胶囊) 中,本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗的重量比为约 1,即本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗的量大致相等。在其他示例性的共制剂中,存在或多或少的本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗。在一种实施方案中,每种化合物将以当单独使用时展示抗炎活性时的量在组合中使用。所述组合的化合物的其他比率和量包括在本发明的范围内。

[0490] 单一剂型可进一步包括本发明的流体和乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和 / 或那他珠单抗或它们任一种的生理学功能型衍生物和药学可接受的载体。

[0491] 本领域技术人员将会理解到的是需要用于治疗的本发明的组合中活性成分的量根据各种因素而变化,各种因素包括待治疗的病症的性质和患者的年龄和状况,并且最后由主治医师或保健医生来判断。待考虑的因素包括施用途径、制剂的性质、动物的体重、年龄和一般状况以及待治疗的病症的性质和严重性。

[0492] 将单一剂型中活性成分中的任意两种组合用于与第三种活性成分同时或相继地施用也是可能的。三组分组合可同时或相继地施用。当相继地施用时,该组合可进行两次或三次施用。根据特定实施方案,本发明的流体和乙酸格拉默、干扰素 β 、米托蒽醌和 / 或那他珠单抗的三组分组合可以任何顺序施用。

[0493] 以下实施例仅是旨在说明而不以任何方式限制。

实施例

[0494] 实施例 1

[0495] 溶解氧稳定性

[0496] 如图 30 中所示,图解了在 500ml 薄壁塑料瓶和 1000ml 玻璃瓶中的溶解氧水平,这两种瓶子每一个都被封盖并储存在 65 度华氏温度下。

[0497] 如可以看到的,当塑料瓶在装瓶后约 65 天打开时,水中的溶解氧水平为约 27.5ppm。当第二个瓶子在装瓶后约 95 天打开时,溶解氧水平为约 25ppm。同样,对于玻璃瓶,溶解氧水平在第 65 天为约 40ppm,并且在第 95 天为约 41ppm。因此,该图表明当使用所述的系统和方法将氧扩散到流体中时,在塑料瓶和玻璃瓶两者中的溶解氧水平在 65° 华氏温度下都保持相对高的比率。

[0498] 实施例 2

[0499] 平衡盐溶液中的衰退的氧含量

[0500] 图 33 图解了 500ml 平衡盐溶液的溶解氧保留,该平衡盐溶液最初具有 5ppm 的溶解氧水平。在标准温度和压力下,用本发明的扩散器富集溶液后,溶解氧水平为约 41ppm。将溶液保持在琥珀色玻璃瓶中。1 小时后,溶解氧水平为 40ppm ;2 小时后为 36ppm ;3 小时后为 34ppm ;约 4.5 小时后为略高于 30ppm。快到 6 小时时进行最后的测量,此时溶解氧水平为约 28ppm。

[0501] 实施例 3

[0502] 微泡尺寸

[0503] 通过使用本发明的扩散器用富含气体的流体进行了实验以便测定气体微泡的尺寸限值。通过使富含气体的流体通过 0.22 微米和 0.1 微米的过滤器来确定微泡的尺寸限值。在进行这些测试中,使一定体积的流体通过本发明的扩散器并产生富含气体的流体。将 60 毫升的这种流体抽入 60ml 注射器中。然后通过温克勒滴定测量注射器中的流体的溶解氧水平。注射器内的流体使其通过 0.22 微米 Millipore Millex GP50 过滤器进入到 50ml 烧杯中。然后测量 50ml 烧杯中的材料的溶解氧比率。该实验进行三次以得到以下表 6 中说明的结果。

[0504] 表 6

[0505]

注射器中的 DO	0.22 微米过滤器之后的 DO
42.1 ppm	39.7 ppm
43.4 ppm	42.0 ppm
43.5 ppm	39.5 ppm

[0506] 如可以看到的那样,通过将扩散的材料通过 0.22 微米过滤器没有显著改变注射器内测量的溶解氧水平和在 50ml 烧杯内测量的溶解氧水平,这暗示流体内的溶解气体的微泡不大于 0.22 微米。

[0507] 进行了第二个测试,其中用本发明的扩散器富集一批盐水溶液并且以未过滤状态收集输出溶液样品。未过滤样品的溶解氧水平是 44.7ppm。使用 0.1 微米的过滤器过滤来自本发明的扩散器的富含氧的溶液并再取两份样品。对于第一份样品,溶解氧水平为 43.4ppm。对于第二份样品,溶解氧水平为 41.4ppm。最后,移去过滤器,并且从未过滤的溶液中最后取样。在这种情况下,最后的样品具有 45.4ppm 的溶解氧水平。这些结果与使用 Millipore 0.22 微米过滤器的那些结果是一致的。因此,盐水溶液中大部分的气泡或微泡的尺寸约小于 0.1 微米。

[0508] 实施例 4

[0509] 喷射效应

[0510] 图 34 和 35 图解了本发明的扩散器对通过其的流体的喷射效应。富含氧的水的喷射在标准的温度和压力下在 8 加仑的罐中进行。如所示的,开始的富含氧的水具有约 42ppm 的溶解氧水平。通过扩散器流动 2 分钟后,用氮气喷射富含氧气的水以便使此后的溶解氧水平略高于 20ppm。在第 6 分钟,溶解氧水平为约 6ppm。在该过程开始后约 14 分钟,富含氧的水的溶解氧水平达到略高于零 (0) 的最低值。这些图图解了氮气可以扩散到水中以从水中喷射氧的方法。然而,可以在任何流体内使用任何气体来将一种气体从另一种喷射,并将该另一种气体扩散到流体中。该实验可以利用任何主流体材料和任何流体输注材料。

[0511] 实施例 5

[0512] 瑞利效应

[0513] 通过本文所述的扩散器装置处理的流体与正常的未处理的水相比时,表现出水结

构的差异。已显示本文所公开的实施方案所制备的富含气体的水与未处理的水相比具有更多的瑞利散射。

[0514] 在所进行的实验中,制备富含气体的水样品和不富含气体的水样品并将它们送去进行光学分析。这些测试的目的是测定在正常的(未处理的)去离子水与通过本发明的扩散器装置富集的水之间是否存在任何总的的光学差异。

[0515] 将两种样品编码以保密它们的身份,只在完成测试后才标示样品。根据图 37A 所示出的图表将两种样品置于 633 纳米的激光束中。根据本文所公开的某些实施方案为富含气体的流体的样品 B 表现出散射光,这与其相对于激光源的位置无关。将样品 B 流体在玻璃瓶中密封约 1 周。开瓶后 2 至 3 小时后,散射效应消失。因此,富含气体的流体结构与未处理的流体的结构在光学上是不同的。光学效应并不直接与溶解氧水平相关,因为开始的溶解氧水平为约 45ppm 并且实验结束时评估的溶解氧水平为约 32ppm。结果显示在图 37B 中。

[0516] 实施例 6

[0517] 溶剂化电子的产生

[0518] 其他证据也以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以包括溶剂化电子。

[0519] 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学将氧还原成羟基离子:

[0520] $O_2 + 2H_2O + 4E = 4OH$

[0521] 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。

[0522] 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物种稳定的溶剂化电子。

[0523] 实施例 7

[0524] 体外伤口愈合

[0525] 针对培养的人表皮角质形成细胞愈合伤口的能力测试了富含气体的流体(用氧气富集)的作用。

[0526] 从新生儿包皮中分离人表皮角质形成细胞,新生儿包皮是从常规的包皮环切术获

得的并且经过去标识。在 PBS 中洗涤包皮两次,并在 2.4U/mL 分散酶 II 中孵育以将真皮从表皮分离。用 0.25%胰蛋白酶/1mM EDTA 孵育表皮,用大豆胰蛋白酶抑制剂中和,搅拌并通过 70 μ m 筛以分离细胞。接着,将细胞悬液离心并在补充有下列物质的细胞培养基 (M154) 中重悬:0.07mM CaCl_2 、和人角质形成细胞生长补充物 (0.2%氢化可的松、0.2ng/mL 人表皮生长因子) 以及青霉素/链霉素、两性霉素抗生素混合物。将角质形成细胞悬液涂布在未涂覆的 12 孔培养皿中并在 24 小时后更换培养基,并且开始接种后每 48 小时更换培养基。

[0527] 达到细胞汇合后,用无菌的 p1000 移液管头进行线性刮擦,产生均匀的无细胞创伤。用 Dulbecco PBS 洗涤单层几次以便移除任何的细胞碎片。然后在下列培养基中孵育受伤的单层:i) 完全生长培养基(如此实施例中上面所描述);ii) 用无氧的剪切型 (sheared) 盐水(使用所公开的扩散器装置处理但不添加气体的对照流体)1:1 稀释的完全生长培养基;以及 iii) 用富含氧的盐水 1:1 稀释的完全生长培养基。每个研究都重复三次。

[0528] 孵育前,用各培养基填充孔,并通过将 25 \times 25mm 玻璃盖玻片置于各孔上面来密封孔。创伤后 6、12、24 和 48 小时,进行氧测量,并对培养物照相 (imagined)。

[0529] 在创伤后 6 小时,盐水中和富含气体的培养基中的伤口边缘都比培养基对照中的那些更皱褶,所述培养基对照用本文所公开的扩散器装置处理过但没有添加气体。在创伤后 12 小时,在所有三种培养基中的伤口边缘似乎都不平整,其中沿边界处的角质形成细胞向着伤口中心迁移。迁移的角质形成细胞的定量表明角质形成细胞迁移在盐水和富含气体的培养基中水平大致相同。实验结果显示在图 40A 和 44B 中。

[0530] 实施例 8

[0531] 改善的伤口愈合

[0532] 进行了研究来测定暴露于富含氧的盐水溶液的伤口的改善的愈合特征,所述富含氧的盐水溶液是根据本文所公开的实施方案处理的。在这个实验中,将绷带置于猪皮肤切除的活组织检查伤口上。将绷带浸泡在富含氧的盐水溶液或者将对照组的绷带浸泡在不富含氧的盐水溶液中。微观上,研究评估了几种因素,包括:1) 表皮形成 (epidermalization);2) 新血管形成;3) 表皮分化;4) 肥大细胞迁移;和 5) 有丝分裂。

[0533] 从外表上开,伤口似乎以不同的速率愈合。用富含氧的盐水溶液处理的伤口显示在第 4 天至第 11 天伤口愈合增加。然而,两种伤口似乎在大致相同的时间完全愈合。研究显示,在第 3 天和第 11 天之间,用富含氧的盐水溶液处理的伤口中新表皮迁移速度为用生理盐水溶液处理的伤口的表皮迁移速度的 2 至 4 倍。该研究还显示在第 15 天和第 22 天之间,如通过较早地形成了较成熟的表皮层所证明的,用富含氧的盐水溶液处理的伤口以较快的速率分化。在所有阶段,在用富含氧的盐水溶液处理的伤口内没有出现与正常愈合相伴随的表皮中所出现的增厚。

[0534] 不受任何具体理论的限制,据信,富含氧的盐水溶液可以增加伤口内 NO 的局部水平。NO 在伤口愈合中调节生长因子、胶原沉积、炎症、肥大细胞迁移、表皮增厚和新血管形成。此外,一氧化氮是由受氧调节的诱导型酶产生的。

[0535] 因此,尽管不欲受任何具体理论的束缚,本发明的富含气体的流体可以刺激 NO 产生,这与这些实验中所看到的伤口愈合作用谱一致。

[0536] 愈合的猪表皮在富含氧气的盐水组中在第 15 天至第 22 天经受了较早的分化。在

肥大细胞迁移的情况下,对于富含氧的溶液还出现了迁移早晚的差异。由于染色困难,有丝分裂水平的结论性结果尚不能确定。

[0537] 现在参考图 41A 至 41F,各图解比较了存在或不存在富含氧的盐水溶液的猪表皮组织的伤口愈合结果。因此,在第 1、4 和 16 天跟踪对照伤口和使用富含氧的盐水溶液的伤口的愈合。41A 图解第 1 天对照伤口的伤口愈合。如可以看到的,伤口显示出表皮 / 真皮增厚和轮廓损失。图 41B 图解第 1 天使用富含氧的盐水溶液处理的伤口的伤口愈合。伤口显示出通常在新伤口上正常的表皮 / 真皮厚度和正常的轮廓。

[0538] 现在参考图 41C 和 41D,图解了第 4 天对照伤口的伤口愈合和第 4 天用富含氧的盐水溶液处理的伤口的伤口愈合。对于图 41C 中所图解的对照伤口,伤口显示出 600 微米的表皮突出物。在图 41D 中的用富含氧的盐水溶液处理的伤口中,图示了 1200 微米的表皮突出物。因此,在实验的前 4 天,使用富含氧的盐水溶液处理的伤口中产生的表皮突出物显示出为未用富含氧的盐水溶液处理的伤口两倍的表皮生长速率。

[0539] 现在参考图 41E,图解了第 16 天的对照伤口。该伤口与图 41F 中所图解的用富含氧的盐水溶液处理的伤口所示出的相比,显示出具有表皮 / 真皮轮廓损失的较低分化的表皮。图 41F 在伤口中显示出更加分化的表皮和更正常的表皮 / 真皮轮廓。

[0540] 因此,如关于图 41A 至 41F 所图解的,用富含氧的盐水溶液处理的伤口显示出比未处理的伤口更好的愈合特征并且显示出具有更正常的表皮 / 真皮轮廓的更加分化的表皮。

[0541] 实施例 9

[0542] 谷胱甘肽过氧化物酶研究

[0543] 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。通过加入该多酶混合物并颠倒来测试水样品。在 A_{340nm} 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。

[0544] 实施例 10

[0545] (电动产生的超级氧合的流体和 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))

[0546] 实验 1:

[0547] 在开始的实验中,评估十六只豚鼠支气管扩张剂对呼吸道功能连同醋甲胆碱诱导的支气管收缩的影响。在确定最佳给药后,以 $50 \mu g/mL$ 对每只动物进行给药以递送每只动物在 $250 \mu L$ 中的 $12.5 \mu g$ 的硫酸沙丁胺醇的靶剂量。

[0548] 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 $250 \mu L$ 的在一种或两种稀释剂中的 $50 \mu g/mL$ 的硫酸沙丁胺醇的气管内灌注:组 A 是已通过本发明装置、没有添加氧的去离子水,而组 B 是本发明的富含气体水。使用 Penn Century 微型喷雾器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代表每个治疗组。

[0549] 在沙丁胺醇施用后 2 小时显示其基线 PenH 值的至少 75% 的动物不被包括在数据分析中。这个排除标准是基于过去的研究,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。

[0550] 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 7 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)。

[0551] 表 7

[0552] 如用醋甲胆碱的激发所测量的支气管收缩保护

[0553] 组 A

[0554] 按动物编号的免受支气管收缩的百分比保护

[0555]

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

[0556] 组 B

[0557] 按动物编号的免受支气管收缩的百分比保护

[0558]

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	2.87	88.16	20.40	21.45	31.60	123.47	8.46

[0559] 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:

[0560] 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。

[0561] 材料:

[0562] 豚鼠 (*Cavia porcellus*) 是购自 Charles River Canada 公司 (St. Constant, Quebec, Canada) 的 Hartley 白化病种, Cr1: (HA) BR。重量:在治疗的开始是大约 $325 \pm 50g$ 。组的数目是 32, 其中每组 7 只雄性动物 (加上来自同一批次动物的 24 只备用动物)。饮食:除了在指定的程序期间以外所有动物自由享用标准的检定合格的颗粒状商品化实验室饮食 (PMI 检定合格的豚鼠 5026; PMI Nutrition International Inc.)。

[0563] 方法:

[0564] 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

胆碱的激发。选择气管内途径以对测试物品 / 对照溶液的肺部暴露最大化。已选择全身吸入激发用于醋甲胆碱的激发以便激起上气道超敏反应（即支气管收缩）。

[0565] 治疗的持续时间是一天。

[0566] 表 8 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 μ g/ml)。所有动物接受 250 μ l 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 μ g/ml 的浓度。

[0567] 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 10x 储备液 (500 μ g/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 μ g/ml)。硫酸沙丁胺醇的这些浓度也被配制在非电产生的对照流体（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 μ g/ml)。

[0568] 每只动物使用 Penn Century 微型喷雾器接受测试物品或对照物品的气管内灌注。对动物整夜禁食并使用异氟烷麻醉,借助喉镜（或适合的替代物）使喉可见并且将微型喷雾器的尖端插入到气管中。施用 250 μ l / 动物的剂量体积的测试物品或对照。

[0569] 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。

[0570] 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 μ g/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。

[0571] 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激发开始后使用 Buxco Electronics BioSystem XA 系统测量通气参数（潮气量、呼吸速率、导出的分钟量）和增强暂停 Penh 持续 10 分钟的时间。一旦动物在室的基线之内,则记录这些值持续 1 分钟,之后醋甲胆碱、500 μ g/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。 $Penh = (\text{最大呼气流量} / \text{最大吸气流量}) * (\text{呼气时间} / \text{呼出 65\% 的呼气量的时间} - 1)$ 。

[0572] 在给药前的醋甲胆碱激发过程中未显示严重的急性支气管收缩的动物被更换。在给药后 2 小时显示基线 Penh 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。

[0573] 将认为是非生理学的的数据从进一步分析中排除。

[0574] 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）。

[0575] 表 8. 实验设计 ;每组 7 只雄性豚鼠。

[0576]

组的标识	沙丁胺醇 (0 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (6/25 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (12.5 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (25 $\mu\text{g}/\text{动物}$)
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 (Solus))	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性
6 (RDC1676-01)	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性

[0577]

组的标识	沙丁胺醇 (0 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (6/25 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (12.5 $\mu\text{g}/\text{动物}$)	沙丁胺醇 (25 $\mu\text{g}/\text{动物}$)
(20 ppm氧)				
7 (RDC1676-02 (40 ppm氧))	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性
8 (RDC1676-03 (60 ppm氧))	7只雄性	7只雄性	7只雄性	7只雄性

[0578] 结果:

[0579] 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影响。

[0580] 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效应的惊人的延长。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。

[0581] 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,并且增加了可以对患者进行治疗且响应于沙丁胺醇的治疗所经过的时段。

[0582] 实施例 11[0583] 测定细胞因子特征

[0584] 从单个健康的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)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 T3 抗原、或 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

[0585] 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。

[0586] 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 1 μ g/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™ 方案和平台对于所列出的细胞因子测定澄清的上清液。数字数据列于表 9 中，并且相应的柱形图描绘在图 38 中。显著地，在具有 T3 抗原的本发明的富含气体的培养基中的 IFN- γ 水平高于具有 T3 抗原的对照培养基，而在具有 T3 抗原的本发明的富含气体的培养基中的 IL-8 水平则低于具有 T3 抗原的对照培养基。此外，在具有 PHA 的本发明的富含气体的培养基中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平低于具有 PHA 的对照培养基，而具有 PHA 的本发明的富含气体的流体中的 IL-1 β 水平与具有 PHA 的对照培养基相比时则较低。在单独的本发明的富含气体的培养基中，IFN- γ 水平高于对照培养基。

[0587] 表 9

[0588]

样品	IFN	Il 10	Il 12p40	Il 12p70	Il 2	Il 4	Il 5	Il 6	Il 8	Il 1b	IP 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

[0589] 实施例 12

[0590] 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)

[0591] 如在图 48 中所示，与加压的、氧合的流体（压力罐）或去离子对照流体相比，当在本发明的富含气体的流体下培养时，反应于 MOG 抗原肽的淋巴细胞增殖增加。因此，本发明的富含气体的流体放大了淋巴细胞对之前首次免疫细胞的抗原的增殖性反应。

[0592] 合成了对应于已知的小鼠序列的髓鞘少突胶质细胞糖蛋白肽 35-55 (MOG 35-55) (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-O-V-H-L-Y-R-N-G-K) (SEQ ID NO:1; 参见公开号 US20080139674, 通过引用结合于此, 包括该 SEQ ID NO:1 的目的)。接着, 从之前用 MOG 免疫的 MOG T 细胞受体转基因小鼠中移出 5×10^5 个脾细胞, 并将其在用本发明的富含气体的流体重构的、加压氧合的水（压力罐水）重构的或用对照去离子水重构的 0.2ml TCM 流体中培养。用 MOG p35-55 分别培养脾细胞 48 小时或 72 小时。用 1Ci [3H]-胸苷对培养物加以脉冲, 并在 16 小时后收获。计算三份重复的培养物的 [3H] 胸苷掺入的平均 cpm。结果显示在图 48 中。

[0593] 实施例 13

[0594] 细胞因子的表达

[0595] 在具体的方面, 用处于本发明的电动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 、TFG- β 和 NGF 的改变。如从图 38 所看到的那样,所测试的促炎症细胞因子 (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。

[0596] 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。

[0597] 简言之,将雄性 Brown Norway 大鼠经腹膜内注射 0.5mL 的处于包含氢氧化铝 (Al(OH)₃) (200mg/mL) 的溶液中的卵白蛋白 (OVA) Grade V (A5503-1G, Sigma) (2.0mg/mL), 在第 1、2 和 3 天各一次。该研究是随机化 2x 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 Revalesio 专有装置处理的无菌盐水) 和 RDC1676-01 (通过添加了额外氧的 Revalesio 专有装置处理的无菌盐水) 处理一周。在每天一次的一周的处理结束时,将 2 个组一分为二并且每个组中 50% 的大鼠通过吸入接受盐水或 OVA 激发。

[0598] 具体而言,在开始的系列化后十四天,通过吸入将 12 只大鼠暴露于 RDC 1676-00 连续 7 天每天 30 分钟。将通过该系统的空气流速设定在 10 升 / 分钟。将全体 12 只大鼠排列在饼式室 (pie chamber) 中,所述饼式室具有雾化材料以进入并均等地分布到 Aeroneb 的 12 个子室的单入口。

[0599] 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。

[0600] 在最后的雾化处理后大约 2 小时,将 RDC 1676-00 组的 6 只大鼠再次用 OVA (盐水中的 1%) 激发,所述 OVA 是使用 Penn Century 微型喷雾器 (1A-1B 型) 通过气管内 (intratracheal) 灌注来递送的。RDC 1676-00 组的另外 6 只大鼠用盐水激发作为通过气管内 (intratracheal) 灌注递送的对照组。第二天,RDC 1676-01 组重复该程序。

[0601] 再次激发后二十四小时,通过超剂量的戊巴比妥钠使每组中的所有大鼠安乐死。从下腔静脉采集全血样品并置于两个不等的血液采集管中:Qiagen PAXgene™ 血液 RNA 管和 Qiagen PAXgene™ 血液 DNA 管。处理肺器官以获得支气管肺泡灌洗 (BAL) 流体和肺组织用于 RT-PCR 以评定已知与这个模型中肺部炎症有关的细胞因子表达的标志物的改变。采用单侧灌洗技术以便保存在肺的右侧的 4 个肺叶的完整性。灌洗左边的“大”肺叶,而将右侧 4 个肺叶扎起来并立即放入 TRIzol™ 中,均质化,并送到实验室做进一步处理。

[0602] 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激发时渗漏通过膜的血清组分）的水平和细胞死亡。专有的测试边示出比对照略少的蛋白。

[0603] 对第二等份支气管灌洗流体的总蛋白和 LDH 含量进行评估以及使其经历细胞学检查。处理组示出总细胞大于盐水对照组。此外，相比于对照组在处理组中存在嗜酸性粒细胞的增加。处理组相比于对照组也存在多形核细胞的略微不同。

[0604] 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 TRIzol™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℃。

[0605] 对于利用 Tri-Reagent (TB-126, Molecular Research Center, Inc.) 的 RNA 提取，将 0.2mL 的全血或血浆加到 0.75mL 的 TRI Reagent BD 中，每 0.2mL 的全血或血浆补充 20 μL 的 5N 乙酸。将管摇动并储存在 -80℃。利用 PAXgene™，将管在室温下孵育大约两小时。然后将管放置在它们一边并且储存在 -20℃冰箱中 24 小时，然后转移至 -80℃长期储存。

[0606] Luminex 分析。通过 Luminex 平台，利用微珠分析作为抗体相关结合反应的基质，其以光度单位读数并且可与量化标准进行比较。每个血液样品作为两份样品同时运行。测量的单位是光度单位并且将这些组分成 OVA 激发的对照、OVA 激发的处理和用专有流体的盐水激发的处理。

[0607] 对于 Agilent 基因阵列数据的产生，将肺组织分离并浸在 TRI Reagent (TR118, Molecular Research Center, Inc.) 中。简言之，将大约 1mL 的 TRI Reagent 加入到每个管内 50-100mg 组织中。使用玻璃 Teflon™或 Polytron™均质器使样品在 TRI Reagent 中均质化。将样品储存在 -80℃。

[0608] 血液样品：

[0609] 图 49-58 示出全血样品评估的结果。

[0610] 示例性的图 49 示出血液样品数据的基本亮度数据呈现形式。指明所测量的细胞因子身份的字母（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 RDC1676-00OVA 和 RDC1676-01OVA）是用卵白蛋白（OVA）通过吸入重激发的组，而最后两组（分别是 RDC1676-00OVA 和 RDC1676-01OVA）是只用盐水对照重激发的组。再一次，后缀 00 代表盐水处理，而后缀 01 代表本发明的电动流体处理组。

[0611] 将每个血液样品分为 2 份样品，并且 2 份样品同时运行。测量的单位是光度单位，这些组从左到右是：OVA 激发的对照；OVA 激发的本发明的电动流体处理；接着是盐水激发的盐水处理；和盐水激发的本发明的电动流体处理。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。

[0612] 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。

[0613] 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 激发的组) 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。

[0614] 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 激发的组) 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。

[0615] 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 激发的组) 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。

[0616] 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 激发的组) 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。

[0617] 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 激发的组) 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。

[0618] 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 激发的组) 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。

[0619] 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 激发的组) 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。

[0620] 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 激发的组) 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。

[0621] 支气管灌洗样品:

[0622] 图 59-68 示出支气管肺泡灌洗流体 (BAL) 样品评估的对应结果。

[0623] 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。

[0624] 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。

[0625] 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。

[0626] 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。

[0627] 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。

[0628] 总之,针对已知的敏化作用的炎症反应的这种标准测定至少在血液样品中产生显著的临床影响和血清学影响。另外,尽管大量的对照动物在这个过程中具有生理上的应激并且几乎死亡,RDC1676-01 处理组均未示出此类临床应激效应。然后这反映在细胞因子的循环水平中,其中在 OVA 激发组的 RDC1676-01 处理组与 RDC1676-01 处理组之间大约 30% 的差异。相比之下,在非 OVA 激发组的 RDC1676-01 处理组与 RDC1676-01 处理组之间的细胞因子、细胞和血清学概况上存在小的且相当不显著的改变,这可能只代表流体本身的最小基线改变。

[0629] 实施例 14

[0630] 缓激肽 B2 受体亲和力结合

[0631] 利用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器 Octet Rapid Extended Detection (forteBio™) 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。

[0632] 如图 69 所示,缓激肽 B2 膜受体被固定到氨丙基硅烷 (APS) 生物传感器上。在图 69 中指明了样品板装置,并且在图 70 中进行分析。接下来,根据如图 71 中所指明的样品装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 中所指明的装置进一步滴定与受体结合的缓激肽。

[0633] 如图 74 所表明的,缓激肽与 B2 受体的结合是浓度依赖性的,并且在本发明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。与 B2 受体结合的缓激肽的稳定示于图 75 中。

[0634] 实施例 15

[0635] (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、pStat5 和 Foxp3) 的调节和例如在 PBMC 中的类胰蛋白酶的调节中的作用)。

[0636] 通过辐射抗原提呈细胞并引入抗原和 T 细胞研究了本文公开的具体实施方案调节 T 细胞的能力。通常,这些受刺激的 T 细胞增殖。然而,在引入调节性 T 细胞时,通常的 T 细胞增殖被抑制。

[0637] 方法:

[0638] 简言之,在分选中使用的 FITC 缀合的抗 CD25 (ACT-1) 抗体购自

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

[0639] CD4+T 细胞是用 CD4+Rosette Kit(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+CD25^{hi}CD127^{lo}/nTreg 和 CD4+CD25 应答 T 细胞。

[0640] 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+CD25^{neg} 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(克隆 HIT3a 在 $5.0 \mu\text{g/ml}$)。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 1.0mCi 的 ³H-胸腺嘧啶核苷。使用 Tomtec 细胞收集器对板进行收集,并且使用 Perkin Elmer 闪烁计数器确定 ³H-胸腺嘧啶核苷的掺入。抗原提呈细胞(APC)由外周血单核细胞(PBMC)组成,使用 StemSep 人 CD3+T 细胞去除(StemCell Technologies)去除 T 细胞,紧接着 40Gy 的辐射。

[0641] 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 Permbuffer 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。

[0642] 使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。通过使用双尾、不成对的斯氏 t 检验对两个组作比较。通过使用单因子方差分析(1-way ANOVA)对三组作比较。认为小于 0.05 的 P 值是显著的(双尾)。如果 r 值大于 0.7 或小于 -0.7(双尾),通过斯皮尔曼系数确定两组之间的相关性在统计学上是显著的。

[0643] 结果:

[0644] 如在图 76 中所示,通过用柴油机排气颗粒物(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 ³H-胸腺嘧啶核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颗粒物,“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(propranolol),并且“DT”是 1:50 的 DT390。

[0645] 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。

[0646] 同样,用 G1TR、粒酶 A、XCL1、pStat5 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)。

[0647] 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影响,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。

[0648] 总之,图 76 的数据(示出在对照流体(无 Rev,无 Solis)中存在 PM 和 Rev 相比于 PM 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 Revera 关于 Treg 功能的活性。

[0649] 实施例 16

[0650] (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)

[0651] 综述。如以上实施例 14 中所示(例如使用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器、Octet Rapid Extended Detection(RED)(forteBio™)示出与 B2 受体结合的缓激肽的稳定作用的图 75),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 15 中所示,数据示出在对照流体(无 Rev,无 Solis)中存在 PM 和 Rev 相比于 PM 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 15 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)的效应表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙通道阻断影响电动产生的流体关于 Treg 和 PBMC 功能的活性。此外,实施例 18 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 CLDN3、5、7、8、9、10)、TJP1(紧密连接蛋白 1)的上调。此外,如实施例 23 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。

[0652] 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。

[0653] 材料和方法：

[0654] 将商购获得的人的主支气管上皮细胞 (BEC) (来自 Promocell, Germany 的 HBEpC-c) 用于这些研究。将大约 50,000 个细胞铺板于 12 孔板的每个孔中直至它们达到约 80% 的汇合。然后用生理盐水、对照流体 Solas 或 1 : 10 稀释 (在 1ml 的气道上皮生长培养基中的 100u1) 的测试流体 Revera 60 连同柴油机排气颗粒物 (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。

[0655] 结果：

[0656] 在图 115 和 116 中, DEP 代表暴露于单独的柴油机排气颗粒物 (PM, 标准的商品化来源) 的细胞, “NS” 代表暴露于单独的生理盐水的细胞, “DEP+NS” 代表用颗粒物在生理盐水的存在下处理的细胞, “Revera 60” 是指仅暴露于测试材料的细胞, “DEP+Revera 60” 是指在测试材料 Revera 60 的存在下用颗粒物处理的细胞。此外, “Solas” 和 “DEP+Solas” 分别代表暴露于单独的对照流体 Solas 或与颗粒物联合的细胞。

[0657] 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 受体的表达中的效应是一项重要发现, 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的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))。

[0658] 同样, 图 116 示出 Revera 60、Solas 和生理盐水对 DEP 介导的 MMP 9 的增加的影响。具体而言, Revera 60 抑制支气管上皮细胞中 DEP 诱导的细胞表面结合的 MMP9 水平大约 80%, 并且 Solas 具有大约 70% 的抑制效应, 而生理盐水 (NS) 具有约 20% 的降低的边际效应。MMP-9 是涉及哮喘中的气道炎症和支气管重塑的主要蛋白酶之一。最近, 已显示 MMP-9 的水平在患有稳定哮喘的患者中显著提高并且与健康的对照受试者相比在急性哮喘患者中甚至更高。MMP-9 在气道炎症细胞的浸润和气道高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 decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma (吸入的皮质类固醇通过调节哮喘中基质金属蛋白酶-9 和金属蛋白酶-1 的组织抑

制剂的表达的平衡来减少上皮下的胶原沉积), J Allergy Clin Immunol 104 :356-363, 1999 ;Simpson 等人, Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma(在嗜酸性和嗜中性哮喘中不同的蛋白水解酶活性), Am J Respir Crit Care Med 172 :559-565, 2005 ;Lee 等人, A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor(甲苯二异氰酸酯诱导的哮喘的鼠类模型可以用基质金属蛋白酶抑制剂处理), J Allergy Clin Immunol 108 :1021-1026, 2001 ;and 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)。

[0659] 因此,根据其他方面,本发明的电动产生的流体具有用于调节(例如降低)TSLP 受体表达和 / 或用于抑制 MMP-9 的表达和 / 或活性的大量的治疗效用,包括例如炎症和哮喘的治疗。

[0660] 实施例 17

[0661] (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)

[0662] 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影响的领域认可的模型,并且这个品系已被广泛地用作例如过敏性哮喘的模型。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改变相似(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。在卵白蛋白激发之前将卵白蛋白敏化的动物用布地奈德单独处理或者与测试材料 RDC 1676-03 组合处理 7 天。在激发后 6 小时和 24 小时,测量了总的血细胞计数和几种蛋白质及抗炎细胞因子的水平以及各种呼吸参数来估计施用该测试材料对各种炎症参数的任何有益的影响。

[0663] 材料和方法:

[0664] Bn/Cr1 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 ± 50 g。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。

[0665] 敏化。在实验的第 1 天,通过施用 1ml 腹膜内注射的新鲜制备的每 1ml 0.9%氯化钠 2mg 的卵白蛋白 /100mg 氢氧化铝的溶液对动物(每个处理组中 14 只动物)进行敏化,接着在第 3 天重复注射。

[0666] 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。

[0667] 卵白蛋白激发。在第 21 天,在用测试溶液处理后 2 小时,所有动物用 1%卵白蛋白雾化溶液激发 15 分钟(在全身室中以 2L/min 的气流)。

[0668] 样品采集。在卵白蛋白激发后 6 小时和 24 小时的时间点,采集血液样品用于总血细胞计数和分类血细胞计数以及用于测量各种蛋白质和抗炎细胞因子的水平。此外,在卵白蛋白激发后立即和在卵白蛋白激发后 6 小时及 24 小时,使用 Buxco Electronics BioSystem XA 系统测量增强的暂停 Penh 和潮气量持续 10 分钟的时段。

[0669] 结果:

[0670] 嗜酸性粒细胞计数: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 μ g/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)进行的处理相比在激发的动物中降低了总嗜酸性粒细胞计数。另外,而用本发明的流体“RDC1676-03”单独处理(画有少许交叉阴影线的条图)不显著降低嗜酸性粒细胞计数,尽管如此,它展示出在降低嗜酸性粒细胞计数中与布地奈德的明显协同效应(“RDC1676-03+ 布地奈德 750 μ g/Kg”,实心黑色条图)。类似地,在图 110 中,嗜酸性粒细胞%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 750 μ g/kg(画有浓密交叉阴影线的条图)对激发的动物中的嗜酸性粒细胞%计数并不具有显著效应,这二者结合显著地降低了嗜酸性粒细胞%(实心黑色条图)。

[0671] 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粒细胞计数(“嗜酸性粒细胞%”和总计数)的与布地奈德联合的明显协同效用。

[0672] 呼吸参数:

[0673] 图 111A-C 和 112A-C 显示在卵白蛋白激发后立即、6 小时和 24 小时所测量的测试流体对 Penh 和潮气量的观察到的作用。Penh 是从最大吸气流量、最大呼气流量和呼气时间获得的派生值,并且 penh 值的下降反映了肺功能有利的结果。

[0674] $Penh = (\text{最大呼气流量} / \text{最大吸气流量}) * (\text{呼气时间} / \text{呼出 65\% 的呼气量的时间} - 1)$ 。

[0675] 如从图 111A-C 中明显的,用布地奈德(以 500 μ g/kg 和 750 μ g/kg 二者)单独处理或与任何测试流体联合处理不能在激发后立即显著影响 Penh 值。然而,在激发后 6 小时,用 RDC1676-03 单独处理或与布地奈德 500 μ g/kg 或 750 μ g/kg 联合处理的动物显示 Penh 值的显著下降。尽管这种下降程度到激发后 24 小时减小,在这个时间点仍观察到布地奈德与 RDC 流体的协同效应的趋势。

[0676] 潮气量是在平静呼吸过程中吸气期间从终末呼气位置被吸入到肺中的空气的容积,所述空气在呼气期间被动地离开肺。如在图 112A-C 中所示,用布地奈德单独处理的动物示出在激发后即刻潮气量没有改变。然而,甚至在这个早期时间点单独的 RDC1676-03 对潮气量也没有显著刺激性作用。并且再次,与布地奈德(500 μ g/kg 和 750 μ g/kg)联合的 RDC1676-03 对这个时间点的潮气量测量具有更加显著的影响。在激发后六小时,单独的 RDC1676-03 足以引起潮气量的显著增加并且单独或组合地将布地奈德加入到处理方案中对潮气量没有添加的效应。然而,在这些早期时间点所观察到的任何效应到 24 小时的时间点消失了。

[0677] 综观来说, 这些数据显示 RDC1676-03 单独或与布地奈德联合一起提供了对气道炎症的显著缓解, 如通过在激发后 6 小时潮气量的增加和 Penh 值的减少所证明的。

[0678] 细胞因子分析:

[0679] 为了分析在以上讨论的生理学参数上看到的效应的机制, 在生理学测量之后立即测量了在激发后 6 小时和 24 小时所采集的血液样品中的许多蛋白质以及抗炎细胞因子。

[0680] 图 113A 和 113B 清楚地显示单独的 Rev 60 (或 RDC1676-03) 在激发后 6 小时和 24 小时都显著降低了 eotaxin 的血液水平。布地奈德 750 μ g/kg 在这两个时间点也降低血液 eotaxin 的水平, 而布地奈德 250 μ g/kg 在后面的时间点仅有值得注意的作用。然而, 单独的测试溶液 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 是已知积累和吸引嗜酸性粒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粒细胞的募集。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 与吸引嗜酸性粒细胞到哮喘性肺), 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 中关于嗜酸性粒细胞计数的结果。

[0681] 综观来说, 这些结果强烈地表明用 RDC1676-03 单独或与布地奈德组合进行的处理可显著地降低在卵白蛋白激发后 24 小时血液中的嗜酸性粒细胞的总计数和%。这与早在激发后 6 小时所观察到的血液中 eotaxin 水平的显著下降相关。

[0682] 作为 Rev 60 单独或与布地奈德组合处理的结果, 两种主要关键抗炎细胞因子 IL10 和干扰素 γ 的血液水平也在激发后 6 小时显著增强。图 113C 和 113D 分别示出对于干扰素 γ 和 IL10 的此类效应。从这些图中明显的是单独的 Rev 60 或与布地奈德 250 μ g/kg 联合的 Rev 60 在直至激发后 6 小时显著提高激发动物的 IL10 的血液水平。类似地, Rev 60 单独或与布地奈德 250 或 750 μ g/kg 联合在激发后 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激发后 6 小时在生理学呼吸参数上所看到的有益效应。在激发后 24 小时不再观察到对这些细胞因子的作用 (数据未示出)。

[0683] Rante 或 CCL5 是由循环 T 细胞表达的细胞因子并且对于 T 细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性细胞是趋化性的, 并且具有募集白细胞到炎症部位中的活性作用。Rante 也激活嗜酸性粒细胞来释放例如嗜酸性阳离子蛋白。它改变嗜酸性粒细胞的密度并且使它们低密度, 这被认为代表全身化的细胞激活状态。它也是对于嗜酸性粒细胞特异的氧化代谢的有力激活剂。

[0684] 如在图 114 中所示, 在用 Rev 60 单独或与布地奈德 250 或 750 μ g/kg 联合处理的动物中激发后 6 小时而不是 24 小时显著降低了 Rante 的全身水平。再一次, 具有这组数据中指出的布地奈德 750 μ g/kg 与 Rev 60 的清楚的协同效应。对于许多其他的促炎症细胞因子例如 KC 或 IL8、MCP3、IL1b、GCSF、TGFb 以及 NGF 来说, 在用 Rev60 单独或与布地奈德联合处理的动物中在激发后 6 小时或 24 小时观察, 观察到类似的向下趋势。

[0685] 实施例 18

[0686] (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)

[0687] 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。

[0688] 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。

[0689] 方法:

[0690] 气管内药物递送。根据具体的实施方案,将sCT配制在本发明的治疗性流体中并且使用气管内药物递送装置向给大鼠施用。在某些方面,使用为啮齿类气管内药物递送设计的Penn Century微型喷雾器装置,允许良好的肺部递送,但是如本领域所理解的,其中相对低的肺泡沉积导致肽的全身生物利用度不良。根据具体的方面,使用这种领域认可的模型系统来证实本发明的扩散器处理的治疗性流体具有调节(例如增强)细胞间紧密连接的实质效用,包括与多肽的肺部和全身递送及生物利用度相关的那些效用。

[0691] 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。在某些实施方案中,将sCT分别重溶在基础液和本发明的富集的基础液中,并且将各自的溶液在60分钟之内通过气管内灌注递送到各自的动物组(每只动物递送200 μL中的10 μg sCT)。

[0692] 测定。在具体的方面,采集血液样品(例如200 μL)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。

[0693] 对于Agilent基因阵列数据的产生,将肺组织分离并浸没在TRI Reagent(TR118, Molecular Research Center, Inc.)中。简言之,将大约1mL的TRI Reagent加入到每个管内的50-100mg组织中。使用玻璃Teflon™或Polytron™均质器使样品在TRI Reagent中均质化。将样品储存在-80°C。

[0694] 结果:

[0695] 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氧合的无菌盐水。

[0696] 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。

[0697] 实施例 19

[0698] (本发明的治疗性流体具有调节一氧化氮水平的实质效用)

[0699] 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/或相关酶的实质效用。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 NOS 3、Nostrin 和 NOS1AP 的下调(图 93、94)。

[0700] 实施例 20

[0701] (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))

[0702] 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)。

[0703] 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 复杂且非线性流体动态的相互作用产生输出材料 102,其中复杂的动态紊流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。

[0704] 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作用。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。

[0705] 材料:

[0706] 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,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。

[0707] 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 Pico Scope 3000™的电池供电的便携式电脑运行示波器的应用)的输入。

[0708] 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 60Hz 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 Pico Scope 3000 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。

[0709] 方法:

[0710] 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)。

[0711] 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。

[0712] 通过该装置的流体流速是约 1L/min。

[0713] 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。

[0714] 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。

[0715] 结果:

[0716] 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)。

[0717] 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/流体室灌注流体,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。其他的实验揭露电压脉冲的波幅(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)。

[0718] 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/或电流和/或电流脉冲)有助于产生电动产生的流体联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)。

[0719] 实施例 21

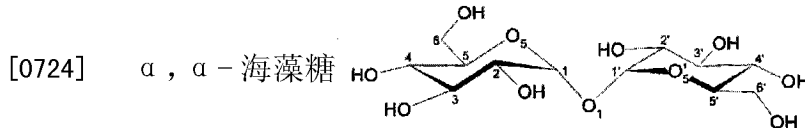
[0720] (相对于非电动产生的对照流体,本发明的电动产生的流体示出在溶解的溶质 α , α -海藻糖的 ^{13}C NMR 分析中差别地影响线宽)

[0721] 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（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 Treg 和 PBMC 功能的活性。

[0722] 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。

[0723] 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，采用一种非超级氧合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。



[0725] 材料和方法：

[0726] 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。

[0727] 核磁共振谱的采集。谱是在华盛顿大学 NMR 设备室使用装有 Bruker BBO:X{1H} 探针和运行的 XWINNMR 3.5 的 500MHz 或 300MHz Bruker Avance 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 (line broadening 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，采用外部氙锁定。使用来自 Mestrelab Research 的 iNMR 软件 v. 2.6.4 处理 NMR 数据。

[0728] 结果：

[0729] 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，Solias 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）。

[0730] 线宽的测量。以下表 10 示出对于 Solias 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 Solias 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 Solias 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。

[0731] 表 10. 在 Solias & 生理盐水 ^{a, b} 中 α, α -海藻糖的 ^{13}C NMR 线宽

[0732] 测试流体 (温度 · 度 K)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	丙酮
[0733] Solias (277)	8.4	8.22	8.3	8.15	8.3	11.1	5.1
[0734] 生理盐水 (269.9)	15.4	16.1	15.8	14.9	15.4	21.7	5.1
[0735] Solias (293)	9.52	8.7	9.28	9	8.9	11.25	5.63
[0736] 生理盐水 (292.9)	10.33	10.23	10.23	9.93	10.23	13.13	5.63
[0737] Solias (310)	2.28	2.03	2.18	2.19	2	2.55	0.67
[0738] 生理盐水 (309.9)	1.17	0.99	1.1	1.02	0.97	1.42	0.67

[0739] ^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非均一性。这通过从生理盐水的线宽中减去丙酮峰在对应的 Solias 盐水波谱中被加宽的量而完成。

[0740] ^b线宽测量中的误差估计将在 +/-0.30Hz 之内

[0741] 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 Solias 和生理盐水中的 α, α -海藻糖的 ^{13}C NMR 线宽。总之，Solias 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。

[0742] 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。

[0743] 实施例 22

[0744] （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）

[0745] 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。

[0746] 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。

[0747] 在这个实施例中。申请人已在这个实施例中进行伏安法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该有电活性的类别的浓度改变。

[0748] 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。

[0749] 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,使用了超级氧合的电动产生的流体(Revera)和非超级氧合的本发明的电动产生的流体(Solas)二者。

[0750] 材料和方法:

[0751] 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 μ L 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。

[0752] 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。

[0753] 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。

[0754] 结果:

[0755] 方波伏安法。如从图 98 中所明显的,在 -0.14V、-.47V、-1.02V 和 -1.36V 的电流特征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。

[0756] 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波谱,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 流体的波谱中不存在的特征峰。

[0757] 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在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。

[0758] 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在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。

[0759] 实施例 23

[0760] (在灌注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“鸡尾酒”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)

[0761] 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。

[0762] 综述。如以上实施例 14 中所示(例如使用 Bio-Layer Interferometry 生物传感器、Octet Rapid Extended Detection(RED)(forteBio™)示出与 B2 受体结合的缓激肽的稳定作用的图 75),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 15 中所示,数据示出在对照流体(无 Rev,无 Solis)中存在 PM 和 Rev 相比于 PM 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)的特征的背景下,数据示出暴露于本公开的流体(“PM+Rev”)导致类似于盐水和培养基对照的类胰蛋白酶水平的显著降低。另外,在实施例 15 和图 76-83 中示出的白喉毒素(DT390)的效应表明 β 阻断、GPCR 阻断和钙通道阻断影响电动产生的流体关于 Treg 和 PBMC 功能的活性。此外,实施例 18 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。

[0763] 进行膜片钳研究来进一步调查和证实所述效用。

[0764] 材料和方法:

[0765] 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。

[0766] 利用膜片钳技术来评定测试材料(RNS-60)对上皮细胞膜的极性和离子通道活性的作用。具体而言,在由以下组成的浴溶液中对支气管上皮细胞系 Calu-3 进行全细胞电压

钳:135mM NaCl、5mM KCl、1.2mM 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灌注到细胞上。

[0767] 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显微控制仪(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。

[0768] 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。

[0769] 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±100mV之间的电压阶跃(500ms/阶跃)进行刺激。在采集对照条件下的全细胞电流后,使相同的细胞通过浴槽灌注测试流体,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。

[0770] 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。

[0771] 药物和化学品。无论何时指出,用包含8-Br-cAMP(500mM)、IBMX(异丁基-1-甲基黄嘌呤,200mM)和福尔马林(10mM)的cAMP刺激性鸡尾酒(混合物)刺激细胞。从水溶液中的25mM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)。

[0772] 膜片钳的结果:

[0773] 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,紧接着在灌注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。

[0774] 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个细胞的平均值。左侧的描记是对照,紧接着在灌注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。

[0775] 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 $\pm 100\text{mV}$ 的方案。代表的描记是 $n = 12$ 个细胞的平均值。左侧的描记是对照,紧接着在灌注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 δ 。从电流与电压的关系获得的全细胞电导在两种条件下均是高度线性的并且反映了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。

[0776] 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 $\pm 100\text{mV}$ 的方案。代表的描记是 $n = 12$ 个细胞的平均值。左侧的描记是对照,紧接着在灌注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 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。

[0777] 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 $\pm 100\text{mV}$ 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灌注。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 δ 。在顶部的描记是从 0mV 电压方案获得的描记和下面的那些是在 -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)。

[0778] 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灌注。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 δ 。在顶部的描记是从 -60mV 电压方案获得的描记和下面的那些是在 -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)。

[0779] 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 、 -40 、 -60 、 -120mV 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,左上面板)。然而在 cAMP 激活的情况中,药物敏感的电流要高得多,并且对施加的电压方案敏感。电流与电压的关系是高度非线性的。这也在减去的电流(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。

[0780] 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灌注 cAMP 刺激的“鸡尾酒”(这急剧提高全细胞电导)也进行了实验。令人感兴趣的是,这个方案也提高了全细胞电导的药物敏感部分,其比在基础条件下所观察到的高十倍。另外,在 cAMP 刺激的存在下,药物对于各种电压方案示出不同的作用,表明所述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)。

[0781] 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通道上产生改变。

[0782] 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信号传导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,并且可维持对例如个体通信组分的半衰期等的依赖性。

[0783] 将会理解的是可以进行组合化合物的施用:(1) 以处于共制剂中的化合物的组合同时施用或(2) 交替地施用,即连续地、相继地、平行地或同时地以独立的药物制剂递送化合物。在交替疗法中,例如,在施用第二种,任选地第三种活性成分时的延迟不应丧失活性成分的协同疗效的益处。根据利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案,该组合理想地应使施用达到最有效的结果。在利用(1)或(2)任一种施用方法的特定实施方案中,该组合理想地应使施用达到每种活性成分的血浆峰值浓度。通过施用组合的共制剂的每天一次一丸的方案对于一些遭受炎性神经变性疾病的患者可能是可行的。根据特定实施方案,该组合的活性成分的有效血浆峰值浓度大约为 0.001 μ M 至 100 μ M。最佳的血浆峰值浓度可通过为具体患者所开的制剂和剂量方案来实现。还应当理解的是,本发明的流体和乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗或其任一种的生理学功能性衍生物,不论同时或序贯地提供,均可单独施用,多次施用或其任意组合。一般而言,在交替疗法(2)期间,连续地施用有效剂量的每种化合物,而在共制剂疗法(1)中,一同施用有效剂量的两种或两种以上化合物。

[0784] 本发明的组合可方便地提供为以单位剂型中的药物制剂。方便的单位剂型包括每个单位剂型 1mg 至 1g 范围内任何量的活性成分,例如但不限于:10mg 至 300mg。本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗组合的协同效应可在例如 1:50 至 50:1(本发明流体:格拉替雷,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗)的较大比率范围内实现。在一个实施方案中,该比率可在约 1:10 至 10:1 的范围内。在另一实施方案中,在共同配制组合剂型(例如丸剂、片剂、囊片或胶囊)中,本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗的重量比为约 1,即本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗的量大致相等。在其他示例性的共制剂中,存在或多或少的本发明流体与乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗。在一种实施方案中,每种化合物将以当单独使用时展示抗炎活性时的量在组合中使用。所述组合的化合物的其他比率和量包括在本发明的范围内。

[0785] 单一剂型可进一步包括本发明的流体和乙酸格拉默,干扰素 β ,米托蒽醌和/或那他珠单抗或它们任一种的生理学功能性衍生物和药学可接受的载体。

[0786] 本领域技术人员将会理解到的是需要用于治疗的本发明的组合中活性成分的量根据各种因素而变化,各种因素包括待治疗的病症的性质和患者的年龄和状况,并且最后由主治医师或保健医生来判断。待考虑的因素包括施用途径、制剂的性质、动物的体重、年龄和一般状况以及待治疗的病症的性质和严重性。

[0787] 将单一剂型中活性成分中的任意两种组合用于与第三种活性成分同时或相继地施用也是可能的。三组分组合可同时或相继地施用。当相继地施用时,该组合可进行两次或三次施用。根据特定实施方案,本发明的流体和乙酸格拉默、干扰素 β 、米托蒽醌和 / 或那他珠单抗的三组分组合可以任何顺序施用。

[0788] 实施例 24

[0789] (对灌注了本发明电动产生的流体 (RNS-60 和 Solas) 的 Calu-3 细胞进行的膜片钳分析表明 (i) 暴露于 RNS-60 和 Solas 使得全细胞电导率增加, (ii) 孵育 15 分钟时证明, 细胞暴露于 RNS-60 使非线性电导率增加, 和 (iii) 细胞暴露于 RNS-60 使 RNS-60 盐水对钙离子可通透通道产生作用)

[0790] 综述在本实施例中, 进行膜片钳研究, 以进一步证实本文中所描述的本发明电动产生的盐水流体 (RNS-60 和 Solas) 的效用 (包括调节全细胞电流的效用)。进行了两组实验。

[0791] 第一组实验数据的总结表明, Solas 盐水中获得的全细胞电导率 (电流 - 电压关系) 在两个孵育时间 (15 分钟, 2 小时) 和所有的电压方案中都是高度线性的。但是, Solas 中孵育较长时间 (2 小时) 使全细胞电导率增加是明显的。如 δ 电流 (Rev 减去 Sol) 所示, 细胞暴露于 RNS-60 使非线性电导率增加, 这仅在孵育 15 分钟时是明显的。而孵育 2 小时时, RNS-60 对此非线性电流的作用消失, 反而是高度线性的。如之前所观察到的, 非线性全细胞电导率的贡献是电压敏感性的, 尽管其存在于所有的电压方案中。

[0792] 第二组实验的数据总结表明, RNS-60 盐水对非线性电流有作用, 其在外部溶液钙离子浓度较高时很明显。非线性全细胞电导率的贡献存在于所有的电压方案中, 尽管其是电压敏感性的, 并且其显示 RNS-60 盐水对钙离子可通透通道产生作用。

[0793] 第一组实验 (电导率增加; 和非线性电压调节的电导率的活化)

[0794] 第一组实验的方法:

[0795] 常规的膜片钳方法见实施例 23。在下列第一组实验中, 利用 Calu-3 细胞在基础条件下并利用从 0mV 保持电位、-120mV 或者 -60mV 阶跃的方案进行膜片钳研究, 以进一步证实本发明电动产生的盐水流体 (RNS-60 和 Solas) 调节全细胞电流的效用。

[0796] 在各种情况下, 从孵育 15 分钟或 2 小时的细胞中获得电流 - 电压关系中, 并从该关系中得到全细胞电导率, 以进一步证实实施例 23 的结果。在本研究中, 对于 Solas 或 RNS-60 盐水, 在特定时间获得数据组。所获得的数据以 5-9 个细胞中全细胞电流的平均值 \pm SEM 表示。

[0797] 结果:

[0798] 图 117A-C 显示一系列膜片钳实验的结果, 所述实验在两个时间点 (15 分钟 (左组) 和 2 小时 (右组)) 和不同的电压方案中 (A, 从 0mV 阶跃; B, 从 -60mV 阶跃; C, 从 -120mV 阶跃) 评价电动产生的流体 (例如 RNS-60 和 Solas) 对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。该结果表明, RNS-60 (实心圆) 比 Solas (空心圆) 对全细胞电导率具有较大作用。在实验中, 在 3 种电压方案中以及 15 分钟和 2 小时 2 个孵育时间点均观察到了相似的结果。

[0799] 图 118A-C 显示在 3 种电压方案中 (“ δ ” 电流) (A, 从 0mV 阶跃; B, 从 -60mV 阶跃; C, 从 -120mV 阶跃) 和 2 个时间点 (15 分钟 (空心圆) 和 2 小时 (实心圆)), RNS-60 电流数据减去 Solas 电流数据所得到的结果图。这些数据表明, RNS-60 在 15 分钟的时间点时

具有非线性电压依赖性分量,而在 2 小时时间点则没有。

[0800] 在之前的实验中,“正常”盐水的的数据作为参照显示出非常一致的且时间非依赖性的电导率。通过将数据组与 Solas 或 RNS-60 盐水配对,得到本结果,并且该结果表明使 Calu-3 细胞暴露于 RNS-60 盐水在基础条件下(无 cAMP,或者任何其他刺激)产生了时间依赖性效应,其与孵育时间较短(15 分钟)时电压调节的电导率的活化相一致。该现象在 2 小时的孵育时间点并不明显。如本文另外所描述,当电导率在用 cAMP “cocktail”刺激下增加时,线性分量更加明显。但是对于 RNS-60 和 Solas,孵育 2 小时均表现出更高的线性电导率,并且在这种情况下,与单独的 Solas 相比,RNS-60 盐水的电导率加倍。该证据表明,至少全细胞电导率的两个贡献受到 RNS-60 盐水的影响,即非线性电压调节之电导率的活化以及线性电导率,所述影响在孵育时间较长时更加明显。

[0801] 第二组实验(对钙离子通道的作用)

[0802] 第二组实验的方法:

[0803] 常规的膜片钳方法见实施例 23。在下列第二组实验中,利用 Calu-3 细胞在基础条件下并利用从 0mV 或 -120mV 保持电位阶跃的方案进行附加的膜片钳研究,以进一步证实本发明电动产生的盐水流体(RNS-60 和 Solas)调节全细胞电流的效用。

[0804] 在各种情况下,从在每种盐水中孵育 15 分钟的细胞中获得电流-电压的关系中,并从该关系中得到全细胞电导率。为了确定钙离子通道对全细胞电导率是否有贡献以及在 RNS-60 盐水中孵育是否影响这部分全细胞电导率,孵育期后细胞在正常盐水中钳接(patch) (使外部溶液中 NaCl 浓度较高,而内部溶液含有高浓度 KCl)。随后用以 CsCl 替换了 NaCl 的溶液替代外部盐水,以确定替换了主要的外部离子后电导率是否发生变化。在这些条件下,随后使相同的细胞暴露于浓度逐渐增加的钙离子中,以使钙离子进入的步骤更加明显。

[0805] 结果:

[0806] 图 119A-D 显示一系列膜片钳实验的结果,所述实验利用不同的外部盐水和在不同的电压方案中(A 和 C 组显示从 0mV 的阶跃,而 B 和 D 组显示从 -120mV 的阶跃)评价电动产生的流体(例如 Solas(A 和 B 组)和 RNS-60(B 和 D 组))对上皮细胞膜极性和离子通道活性的作用。在这些实验中使用 15 分钟的单个时间点。对于 Solas(A 和 B 组),结果表明:1) 与对照(菱形符号)相比,利用 CsCl(方形符号)而非 NaCl 作为外部溶液使全细胞电导率以线性方式增加;和 2) 20mM CaCl_2 (圆形符号)和 40mM CaCl_2 (三角形符号)均使全细胞电导率以非线性方式增加。对于 RNS-60(B 和 D 组),结果表明:1) 与对照(菱形符号)相比,利用 CsCl(方形符号)而非 NaCl 作为外部溶液对全细胞电导率几乎没有作用;和 2) 40mM CaCl_2 (三角形符号)使全细胞电导率以非线性方式增加。

[0807] 图 120A-D 显示对于 Solas(A 和 B 组)和 RNS-60(B 和 D 组),在 2 种电压方案中(A 和 C 组,从 0mV 阶跃;以及 B 和 D 组,从 -120mV 阶跃)从 20mM CaCl_2 (菱形符号)和 40mM CaCl_2 (方形符号)电流数据中减去 CsCl 电流数据(显示于图 119 中)所得到的结果图。结果表明,Solas 和 RNS-60 均能够活化钙诱导的非线性全细胞电导率。RNS-60 的作用更显著(显示出剂量反应性),并且 RNS-60 的作用仅在钙浓度较高时增加。此外,电压方案使得钙浓度较高时非线性钙依赖性电导率也增加了。

[0808] 对于 Calu-3 细胞中获得的全细胞电导率数据,第二组实验的数据进一步表明了

RNS-60 盐水和 Solas 盐水的作用。数据显示,在任一盐水中孵育 15 分钟对全细胞电导率产生不同作用,所述作用在 RNS-60 中以及当外部钙离子增加时最为明显,并且进一步表明 RNS-60 使全细胞电导率的钙依赖性非线性分量增加。

[0809] 累计证据表明了 Revalesio 盐水对离子通道的活化作用,其对基础细胞电导率产生不同的贡献。

[0810] 纵观考虑申请人的其他数据(例如申请人其他工作实施例的数据),本发明的具体方面提供了调节细胞内信号转导(包括调节膜结构、膜电位或膜电导率、膜蛋白或受体、离子通道、脂质组分,或者细胞可交换的细胞内组分(例如信号传导途径,如钙依赖性细胞信号传导系统)中的至少一种)的组合物和方法,包括利用本发明电动产生的溶液使膜结构(例如膜和/或膜蛋白、受体或其他膜组分)发生电化学和/或构象变化,所述膜结构包括但不限于 GPCR 和/或 g 蛋白。根据附加的方面,这些作用调节基因表达,并且可以例如维持对个体通信组分等的半衰期的依赖性。

[0811] 实施例 25

[0812] (对本发明电动产生的流体(RNS-60)的原子力显微镜(AFM)测定表明疏水性表面纳米气泡的存在和/或形成,所述纳米气泡基本上比对照“压力罐”(PNS-60)流体中存在的纳米气泡小)

[0813] 综述申请人利用原子力显微镜(AFM)测定对本发明电动流体(RNS-60)中的疏水性纳米气泡进行表征。

[0814] 材料和方法:

[0815] AFM 研究 AFM 研究在本领域认可的 Nanotech User Facility (NTUF) 处进行。对于 AFM 研究,将非常小并且灵敏的探针浸入到置于疏水性表面的水滴中。随后探针在例如~15 分钟中以 1mm^2 的速率下扫描水/表面界面。探针记录表面几何学的任何缺陷,并且足够灵敏以记录小气泡的存在。

[0816] 利用 Trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-全氟辛醇)硅烷)制备水滴置于其上的硅基板,产生的疏水性表面使水起泡并具有大约 95 度的接触角。这种涂布技术用于很多 AFM 研究中,部分地由于其特别耐用。

[0817] 溶液的制备 研究了两种测试溶液:RNS-60 和 PNS-60。RNS-60 是包含 60ppm 氧的本发明电动流体,而 PNS-60 是包含 60ppm 氧的非电动对照流体,其通过常规暴露于加压氧喷头(即压力罐氧合流体)而制备。每种测试溶液最初通过加入少量的中性磷酸盐缓冲液(pH 7)进行缓冲,并将大约 60-70 μL 经缓冲的每种测试溶液(大约 22°C)置于之前制备的硅板上。

[0818] 结果:

[0819] 在 AFM 中,RNS-60 水滴显示在 1mm^2 的区域内分布大约 20 个疏水性纳米气泡,其具有~20nm 宽和~1.5nm 高的大小或者更小(图 121A)。相反地,在 AFM 中,PNS-60 水滴显示在 1mm^2 的区域内分布大约 5 个疏水性纳米气泡,其具有~60nm 宽和~5nm 高的大小(图 121B)。因此,与 RNS-60 水滴相比,PNS-60 水滴具有较少并且较大的疏水性纳米气泡。

[0820] 因此,根据具体的方面,RNS-60 和 PNS-60 测试溶液之间疏水性表面纳米气泡的大小和分布具有显著差异,其中纳米气泡最初存在于和/或在 AFM 测定过程中形成于测试流体中。

[0821] 如本文另外所讨论的,根据本发明的具体方面,本发明电动改变的流体是包含电荷稳定的含氧纳米结构的一种离子水溶液,所述纳米结构大体上具有小于大约 100 纳米的平均直径,并且在离子水溶液中稳定形成,当该流体与活细胞接触时,所述纳米气泡的数量足以调节细胞膜电位和细胞膜电导率的至少一种。

[0822] 但是,申请人指出,疏水性气泡(形成于疏水性表面),例如在 AFM 实验中所观察到的,可能与本文公开所发明的具有生物活性、电荷稳定的纳米结构从根本上不同。因此,根据具体的方面,基于疏水性气泡形成的大小和分布,本工作实施例中的 AFM 实验表明本发明电动流体(例如 RNS-60)与非电动对照流体从根本上不同,疏水性气泡可能与本文另外详细描述电荷稳定的含氧纳米结构不同,和/或来源于所述纳米结构。在任何情况下,相对于本发明电动流体,对照压力罐氧合流体不包含能够调节细胞膜电位和细胞膜电导率的至少一种的电荷稳定的含氧的纳米结构。

[0823] 实施例 26

[0824] (在多发硬化(MS)的经典急性实验性变态反应性(自身免疫性)脑脊髓炎(EAE)大鼠 MBP 模型中,本发明电动流体以剂量响应方式显示是实质有效的)

[0825] 综述:

[0826] 在本工作实施例中,在经典髓鞘碱性蛋白 MBP 诱导的急性实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)大鼠模型中,同时在预防性施用和治疗性施用方案的两个剂量水平评价本发明电动流体 RNS-60。本发明电动流体 RNS-60 以剂量响应方式显示是实质有效的。无论是治疗性(伴随注射 MBP 开始每日施用 RNS-60)还是预防性(在注射 MBP 七天前开始每日施用 RNS-60)的 RNS-60 施用方案显示出临床评分的显著减少和延迟发生(在高剂量组)。因此,根据本发明的具体方面,本发明电动组合物对于在人 MS 的经典大鼠模型中治疗,包括改善和预防 EAE 症状有实质效用。因此,根据本发明进一步的方面,本发明电动组合物对于在受累的哺乳动物(优选人)中治疗,包括改善和预防 MS 症状有实质效用。在进一步的方面,本发明电动组合物穿越血脑屏障(BBB),从而为治疗中枢神经系统炎症性疾病提供新方法。

[0827] 多发硬化(MS) 多发硬化(MS)是中枢神经系统(CNS)的脱髓鞘性疾病,是青壮年中最常见的致残性神经疾病之一。这种病的主要特征是局灶性脱髓鞘和炎症。病程是不可预测的和终身的,女性发病比男性更常见。本病的病因似乎是遗传和环境因素的影响。在周围神经系统,抗原通过 MCH II 结合到抗原提呈细胞(APC)。Th0 细胞与抗原结合,并经过活化和分化。粘附分子和基质金属蛋白酶(MMPs)帮助 Th1 细胞结合并穿透血脑屏障(BBB)。一旦越过血脑屏障进入中枢神经系统,Th1 细胞促使抗原组织相容性复合物和生产在中枢神经系统导致损伤的促炎症细胞因子。自身免疫系统将髓鞘蛋白识别为外来物,并开始攻击。从历史上看,虽然 Th1 细胞被认为在此疾病的病理学中是发挥主导作用,但最近的证据表明,Th17 细胞的促炎级联、IL-6 和 TGF- β 在 EAE 和 MS 的发病机制中起着关键作用。

[0828] 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE) 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的,也称为实验性变态反应性脑脊髓炎,是多发硬化(MS)的非人类动物模型。虽然不是 MS,但 EAE 的不同形式和阶段在多种方式上与 MS 的各种形式和阶段相类似。更具体地说,EAE 是一种急性或慢性复发的,后天的,炎性的和脱髓鞘自身免疫性疾病。给动物注射构成髓鞘的各种蛋白质(如髓鞘碱性蛋白(MBP),蛋白脂蛋白(PLP)和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG))的

全部或部分,其中髓鞘为是神经细胞(神经元)的绝缘保护套,以诱导对动物自身髓鞘的自体免疫反应,类似于人类 MS。已经能够在不同的动物物种诱发 EAE,包括小鼠,大鼠,豚鼠,兔,猴,猕猴和狨猴。由于包括免疫工具的数量、可用性、动物的寿命和繁殖力、以及诱发疾病 MS 相似之处等各种原因,小鼠和大鼠是最常用的种系。急性大鼠 EAE 模型具有较强的炎症成分,因此是研究针对 MS 免疫事件治疗的潜力药物的适当模型。

[0829] MBP 的诱导 EAE 在 Lewis 大鼠中的一剂 MPB 之后会导致复发,其特征是后肢麻痹为主。Lewis 大鼠接受 MBP 注射作为第 0 天。该病在 12-16 天之间发展,18-21 天之间疾病完全恢复。该模型是自限性的,不显示脱髓鞘。

[0830] 材料和方法:

[0831] 测试流体(RNS-60)的制备和表征过滤除菌的 RNS-60 由申请人根据 US2008/0219088(2008 年 9 月 11 日公开)、US2008/0281001(2008 年 11 月 11 日公开)和 WO2008/052143(2008 年 5 月 02 出版)介绍的方法制备,其全部内容通过引用并入本文,特别是关于制备申请人的本发明电动流体的装置和/或方法的所有方面。所用的 RNS-60 中的溶解氧浓度是 59ppm,由温克勒(Winkler)滴定测定(Y. C. Wong & C. T. Wong. New Way Chemistry for Hong Kong A-Level Volume 4, Page 248. 或 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 20th Edition ISBN 0-87553-235-7)。将 RNS-60 流体标记上测试项目(TI)的数字,收到日期,贮存条件和有效期。储存条件和处理 RNS-60 的方法按照申请人的说明书,以确保在测试过程中测试装置的稳定性。流体在不使用时保存在 2-8°C 冷藏。包含流体的样品瓶用作一次性容器。

[0832] 载体对照流体载体对照流体为 Hospira 公司的用于注射的正常生理盐水(0.9%)。

[0833] 地塞米松地塞米松购自 Sigma 公司(货号 D1756;批号 096K1805)。在施用,将地塞米松(白色粉末)在乙醇稀释至浓度为 1 毫克/毫升,然后用蒸馏水再次稀释到 0.1 毫克/毫升的剂量浓度。

[0834] EAE 诱导项目:

[0835] MBP 抗原剂 MBP 为来自豚鼠的髓鞘碱性蛋白(Des-Gly-77, Des-His-78)-MBP(68-84);Cat. No. H-6875;MD Bioscience 提供)。将 MBP 以 2mg/ml 的浓度溶解在生理盐水中;

[0836] CFA 致敏剂完全弗氏佐剂(CFA)获自 MD Biosciences Division of Morwell Diagnostics GmbH 公司(Cat. No. IMAD-4)。所提供的 CFA 混悬液浓度为 4mg/ml,包含热杀死的结核分枝杆菌 H37Ra;以及

[0837] MBP/CFA 乳剂(抗原/增敏剂)在研究的第 0 天开始单独接种之前,想将一体积 MBP 溶液与等体积的 4mg/ml 的 CFA 通过两个由 Luer 过滤器连接的注射器混合,彻底混合成乳剂混合物,等于 100 μ l/动物的总剂量。以 2x50 μ l 的施用剂量皮下注射(SC)至双爪区域。

[0838] 实验动物:大鼠。从 Harlan Laboratories Israel, Ltd 获得六十(60)只雌性 Lewis 大鼠(研究开始时为 6-7 周龄)。在治疗初始时,动物的体重变化不应超过 20%的平均重量。实验动物到达后即对本研究中所用动物的健康状态进行检查。只驯化身体健康的动物使其适应实验室条件并在研究中使用。在研究开始之前,先将动物驯化至少 5 天。在驯

化和整个研究期间,动物被安置在限制啮齿类进出的设施内,每组最多 5 只大鼠,放入聚丙烯笼中,装上坚实的底部和无菌填充木屑作为衬底材料。向动物随意提供商购啮齿动物饮食,并且动物能够自由饮水,其中水通过带有不锈钢吸管的聚乙烯瓶向每个笼子提供。研究中使用的饮食饲料分析包含在研究数据中。水是定期监测的。研究室自控环境条件设置在保持温度为 20-24℃,相对湿度 (RH) 为 30-70% 光照明暗周期为 12 : 12 小时,换气 15-30 次 / 小时。温度和相对湿度每天监测。使用时钟控制光照明暗周期。动物在尾巴上做记号,分别给予独特的动物识别标志。这个数字也出现在笼卡上,在每个笼前可见。笼卡还包含了研究和组号码,施用方法,性别,品系和所有与治疗组相关的细节。

[0839] 表 11. 测试组的组成以及剂量水平,列出包含本研究的 6 个实验组:

[0840]

组号	组规模	测试材料	施用途径	剂量水平 (mg/kg/动物)	施用体积 (ml/kg)	方案
1F	n=10	载体对照	IV	0	350 g 大鼠 2 ml	疾病诱导前 7 天 直至研究结束
2F	n=10	地塞米松	IP	1	10	研究第 0 天起每天一次
3F	n=10	RNS-60	IV		350 g 大鼠 1 ml	疾病诱导前 7 天 直至研究结束
4F	n=10	RNS-60	IV		350 g 大鼠 2 ml	疾病诱导前 7 天 直至研究结束
5F	n=10	RNS-60	IV		350 g 大鼠 1 ml	研究第 0 天起每天一次
6F	n=10	RNS-60	IV		350 g 大鼠 2 ml	研究第 0 天起每天一次

[0841] 急性 EAE 鼠模型的测试程序和原则实验性变态反应性脑脊髓炎 (EAE) 的是一种中枢神经系统 (CNS) 的自身免疫性脱髓鞘疾病,其模拟多发性硬化症 (MS) 的许多临床和病理特点。急性大鼠模型由致敏期组成,致敏期通过在研究第 0 天一次性皮下注射 (SC) 乳化在完全弗氏佐剂 (CFA) 中的髓鞘碱性蛋白 (MBP) 诱导形成。

[0842] EAE 诱导和治疗方案的示意图描述见图 123。

[0843] EAE 诱导:

[0844] MBP/CF A 正如在图 123 所示的示意图描述,在研究的第 0 天 (研究开始时),所有动物接受单次接种注射,该注射剂由 MBP 和 CFA 的均质乳剂混合物组成 (注射 MBP/CFA 致脑炎乳剂接种物 (100 μ g MBP/200 μ g CFA) 的总剂量体积为 100 μ l / 动物,并且以 2x50 μ l 的施用剂量皮下注射 (SC) 至双爪底区域)。

[0845] 治疗:

[0846] 治疗方案和程序 每天都由一人新配制所有化合物,该人不同于给动物记分的

人。记分的人接受到的只是标记有组号的样品瓶,而对治疗不知情。

[0847] 施用途径:(i)RNS-60(IV);(ii)载体对照:(IV);以及(iii)阳性对照:(IP)。

[0848] 剂量水平和体积剂量:(i)RNS-60:350g低剂量2ml;350g高剂量4ml;(ii)载体对照:0;以及(iii)阳性对照组(地塞米松):1mg/kg。

[0849] 支持治疗 适当的支持治疗将逐一进行,除非在研究过程中测定,一旦EAE的实验效果可预计到和/或观察到(单次脑炎接种约8-12天后),或当动物们表现出从先前测量的体重减少大于15%,或从初始体重减少大于20%。

[0850] 喂食和喂水 将由碎颗粒或仅由啮齿动物饲料组成的、浸泡在饮水中的额外水源放置在笼子底部,爬行/非移动的动物面前。

[0851] 脱水 动物可能会受到皮下(SC)5%葡萄糖溶液的补充液体疗法,每日至少两次,用量达2ml/每只动物/每日,直到体重恢复到初始的10%之内。

[0852] 排尿对动物进行腹部触诊,以帮助排尿,观察动物是否可以清空自己的膀胱。

[0853] 其他特别的照顾如需要,在动物的肛门周围区域和后腿用湿纱布垫清洗。

[0854] 观测和检查:

[0855] 临床体征在整个21天的研究中,除了EAE临床评分和评价(见下文)外,每日至少一次仔细进行临床检查和记录。观察包括皮肤,毛皮,眼睛,粘膜的变化,分泌物和排泄物(如腹泻)和自主活动(例如,流泪,流涎,竖毛,瞳孔大小,不寻常的呼吸模式),步态,姿态和反应,以及是否存在不寻常的行为,震颤,抽搐,睡眠和昏迷。

[0856] 体重下降可能是引发疾病的最初迹象,而突然明显增重往往伴随对EAE症状缓解。因此,在研究第0天(研究开始)诱发EAE之前的短时间内就先确定初始体重,在整个21天的观察期间每天测定基础体重。

[0857] EAE的临床评分和评价最初,在诱导EAE之前(研究第0天),检查所有动物的神经反应和症状的体征,其后在整个21天的观察期中每日检查。为了避免实验偏差,尽可能地由一个不知道具体所用治疗的工作人员以双盲的方式测定EAE反应。根据经典的公认的严重性升序排序的0-5分对EAE反应进行评分和记录,如下表12所示:

[0858] 表12. 根据经典的公认的严重性升序排序的0-5分对EAE反应进行评分和记录。

	<u>等级</u>	<u>体征/症状</u>
	0	无异常
	0.5	远侧一半尾巴虚弱
	1	近侧一半尾巴虚弱
[0859]	1.5	一只后爪虚弱
	2	两只后爪虚弱
	2.5	一只前爪瘫痪
	3	两只前爪瘫痪
	4	全部瘫痪
[0860]	5	死亡

[0861] 血液样品 在研究终止的那天（第 21 天），注射后另所有动物流血 1 小时。收集研究第 0（仅预防组）、7、14、21 天的样品。将血浆收集在肝素化的小瓶里并存放于 -20°C 。储存 $300\ \mu\text{l}$ 体积用于血液计数分析，储存和使用 $100\ \mu\text{l}$ 用于通过 Luminex Technology 进行进一步细胞因子分析。于第 0、7、14、21 天进行血液计数分析。

[0862] 组织收集 在研究结束时，给动物灌注 4% PFA。收集脑和脊髓并存放于 4% PFA 中。

[0863] 人道终结 对发现在垂死状态的动物和 / 或表现出剧烈疼痛和严重痛苦的持久迹象的动物进行人道安乐死。

[0864] 统计和数据评价：评价主要是基于神经症状和体重的相对记录变化，表现为在所有治疗组相对于那些载体对照组获得的绝对值、百分比（%）变化和平均组值。通过适当的统计方法对数据进行分析，以确定治疗效果的显著性。

[0865] 动物护理和使用声明：

[0866] 本研究是在提交给合适的实验动物护理及使用的伦理准则委员会的申请表被批准后开始进行的，并且本实验遵守设置的规则和规定。

[0867] 结果：

[0868] 研究结果如图 122 所示，其中 X 轴为时间（注射 MBP 后的天数），Y 轴为“临床评分”（参见上述“材料和方法”）。

[0869] 图 122 显示，本发明电动流体（RHS-60）对于在多发性硬化（MS）的经典实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）大鼠模型中有实质效用（参见上述“材料和方法”）。具体来说，与的载体对照组（实心菱形）相比在 17 天内，无论是治疗性（伴随注射 MBP 开始每日施用 RNS-60）还是预防性（在注射 MBP 七天前开始每日施用 RNS-60）的 RNS-60 施用方案显示出临床评分的显著减少和延迟发生（在高剂量组）。

[0870] 低剂量（每天注射 1cc）RNS-60 治疗组的临床评分约为载体对照组的二分之一（ $1/2$ ），而高剂量（每天注射 2cc）RNS-60 治疗组的临床评分不仅约为载体对照组的五分之一（ $1/5$ ）至十分之一（ $1/10$ ），而且还表现出延迟发生。

[0871] 低剂量（每天注射 1cc）RNS-60 预防组的临床评分约为载体对照组的三分之一（ $1/3$ ），而高剂量（每天注射 2cc）RNS-60 预防组的临床评分在整个 16 天中不仅为零（没有可检测的临床评分），由此显示基本上延迟发生，而且当第 17 天时，在同一时间点可观察到小于载体对照组的十分之一（ $1/10$ ）。

[0872] 因此，根据本发明的具体方面，本发明电动组合物对于在人 MS 的经典大鼠模型中治疗，包括改善和预防 EAE 症状有实质效用。

[0873] 根据具体方面以及如其他在本文工作实施例中描述的那样，本发明电动组合物对于减少炎症有实质效用。例如，不被作用机制所约束，如本文所讨论的，IL7R 与细胞因子受体样因子 2 基因（CRLF2）二聚化，形成 TSLP 受体（Al Shami 等（2004）*J. Exp. Med.* 200 : 159-168）。TSLP 是一种 IL7- 样细胞因子，其在体外驱动未成熟 B 细胞发育，并且在髓系树突状细胞中能促进幼稚 CD4+T 细胞分化成 T 辅助 2 型（Th2）表型，以及促进 CD4+Th2 记忆细胞的扩增（Huston 等（2006）*Curr. Allergy Asthma Rep.* 6 :372-376）。TSLP 被认为是树突状细胞介导的 Th2 型炎症反应的触发剂，并且被认为是变态反应性炎症的总开关（Koyama 等（2007）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 :99-104），该变态反应性炎症与 MS 的病因有

关（参见例如 Gregory 等 Nature Genetics, 39 :1083-1091 ;2007 年 7 月 29 日网上出版, 通过引用并入本文 ;与 M. S. 的 IL7R α 等位基因关联）。在进一步的方面, 本发明电动组合物对于调节（例如降低）基质金属蛋白酶 9(MMP-9) 有实质效用。在多发硬化 (MS) 中, 组织中基质金属蛋白酶 (MMP) 的活性是 MMP 及其组织抑制剂 (TIMP) 之间平衡的结果。MMP-9 主要在急性 MS 病灶占优势, 并且被 TIMP-1 抑制, 而 MMP-2 很可能在例如慢性病中参与细胞外基质 (ECM) 的重塑, 并且被 TIMP-2 抑制（参见例如 Avolio 等, J NeuroImmunol, 136 : 46-53, 2003, 通过引用并入本文）。

[0874] 因此, 根据本发明进一步的方面, 本发明电动组合物对于在受累的哺乳动物（优选人）中治疗, 包括改善和预防 MS 症状有实质效用。

[0875] 还根据进一步的方面, 本发明电动组合物能够与至少一种如本文他处所述的其他 M. S. 治疗剂一同施用。

[0876] 因此, 根据本发明进一步的方面, 本发明电动组合物对于在受累的哺乳动物（优选人）中治疗, 包括改善和预防炎性神经变性疾病（例如本文他处所定义的阿尔茨海默病 (Alzheimer's)、帕金森病 (Parkinson's)、淀粉样变性病) 的症状有实质效用。

[0877] 通过引用并入。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。

[0878] 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案, 而不背离本发明的精神和范围, 如由下列权利要求所定义的那样。因此, 意图在于下列权利要求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案。

[0879] 上述实施方案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, 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。

[0880] 尽管已经对本发明的具体实施方案进行了显示和描述, 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的方面, 因此, 所附的权利要求在其范围之内涵盖如本发明的真正精神和范围之内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（例如所附权利要求的主体）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

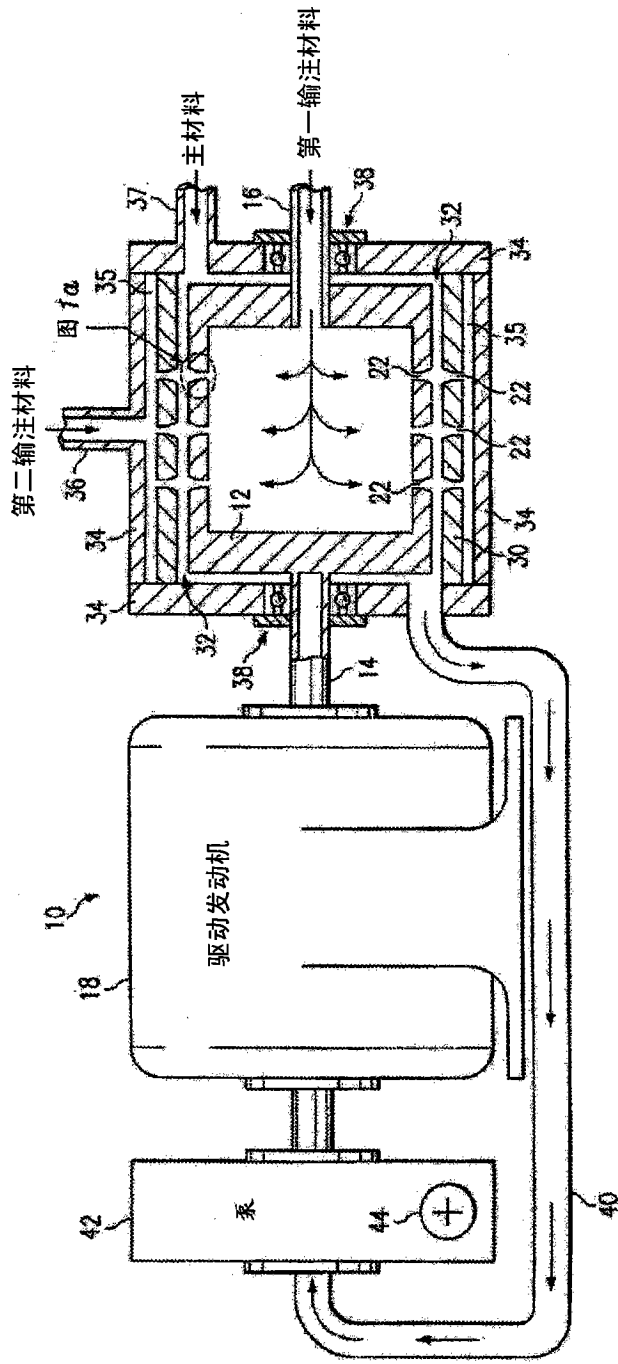
(an)”介绍一项权利要求陈述内容将包含这种介绍的权利要求陈述内容的任何具体的权利要求限制成仅包含一项这种陈述内容的发明,即使当相同的权利要求包括介绍性短语“一种或多种”或“至少一种”和不定冠词例如“(a)”或“(an)”时(例如,“(a)”或“(an)”通常应该解释为表示“一种或多种”或“至少一种”);对于用来介绍权利要求陈述内容的定冠词的使用同样也是如此。此外,即使明确地陈述介绍的权利要求陈述内容的具体数目,本领域的熟练技术人员也会认识到这种陈述应通常被解释为表示至少所陈述的数目(例如,没有其他修饰语的“两个陈述内容”的单纯陈述通常表示至少两个陈述内容或两个或多个陈述内容)。据此,除了被所附的权利要求限制之外,本发明不被限制。

[0001]

序列表

- <110> 利发利希奥公司
- <120> 治疗多发性硬化的组合物和方法
- <130> 83535-100
- <140> PCT/US2009/041852
- <141> 2009-04-27
- <150> 61/048, 332
- <151> 2008-04-28
- <150> 61/048, 347
- <151> 2008-04-28
- <150> 12/256, 774
- <151> 2008-10-23
- <150> PCT/US2008/081021
- <151> 2008-10-23
- <150> PCT/US2008/081202
- <151> 2008-10-24
- <150> 12/258, 210
- <151> 2008-10-24
- <160> 1
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白肽 35-55
- <220>
- <221> 变体

[0002]



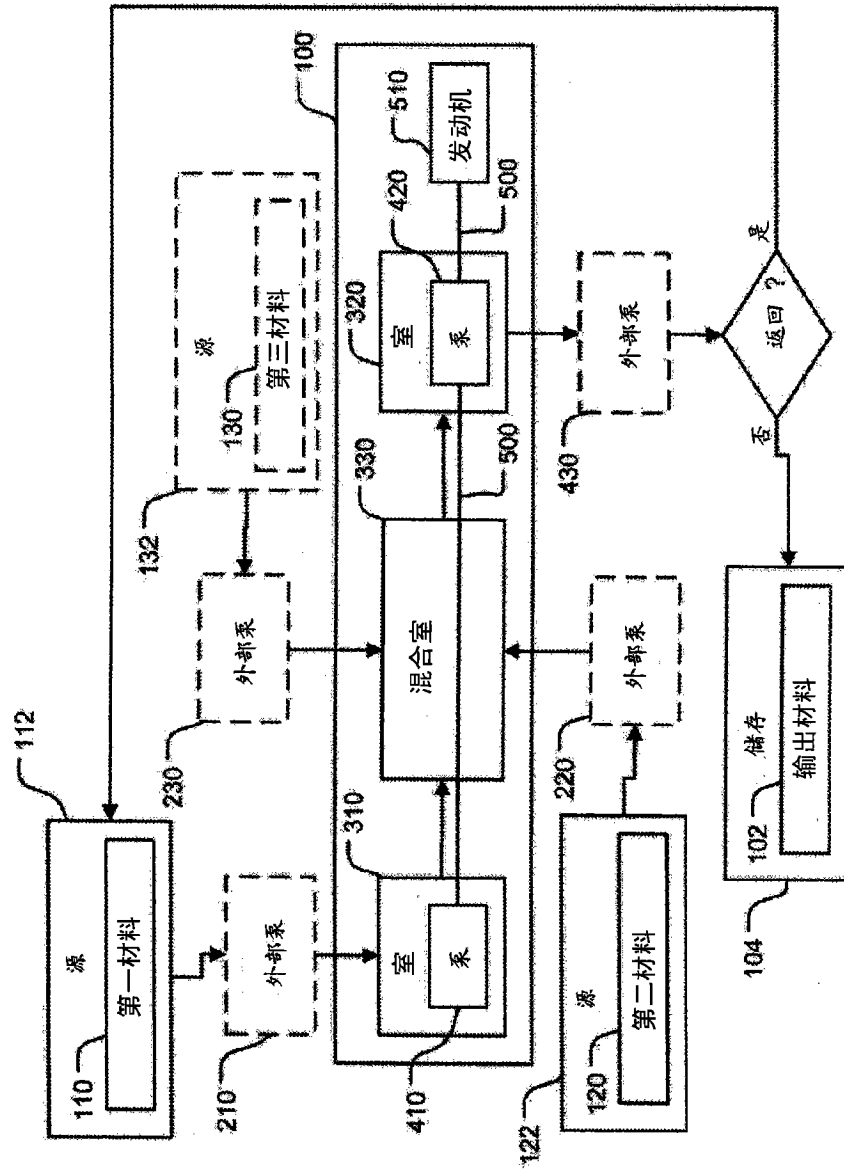


图 2

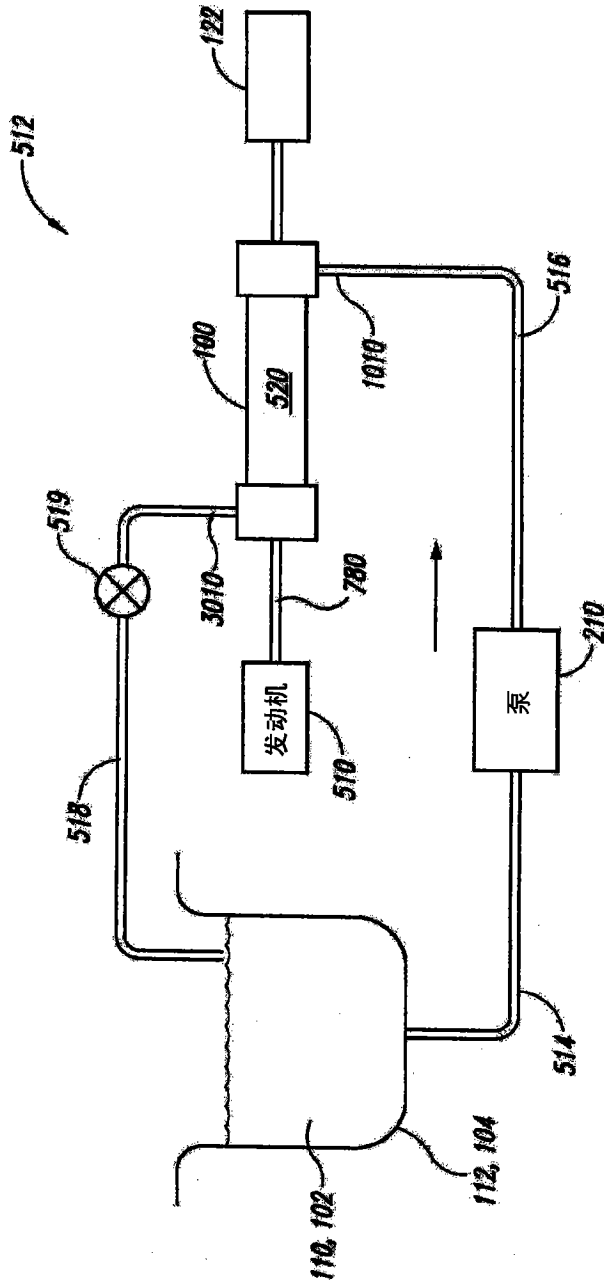


图 3

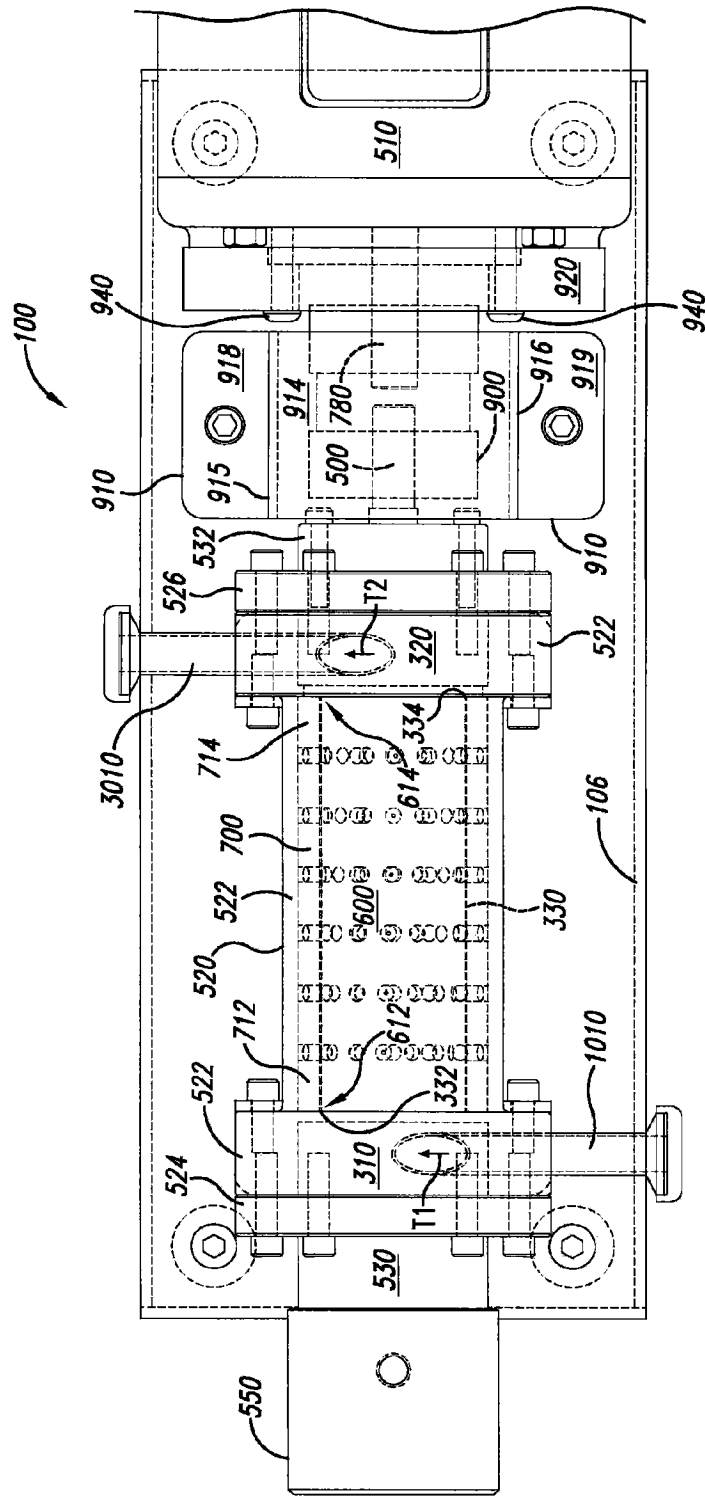


图 4

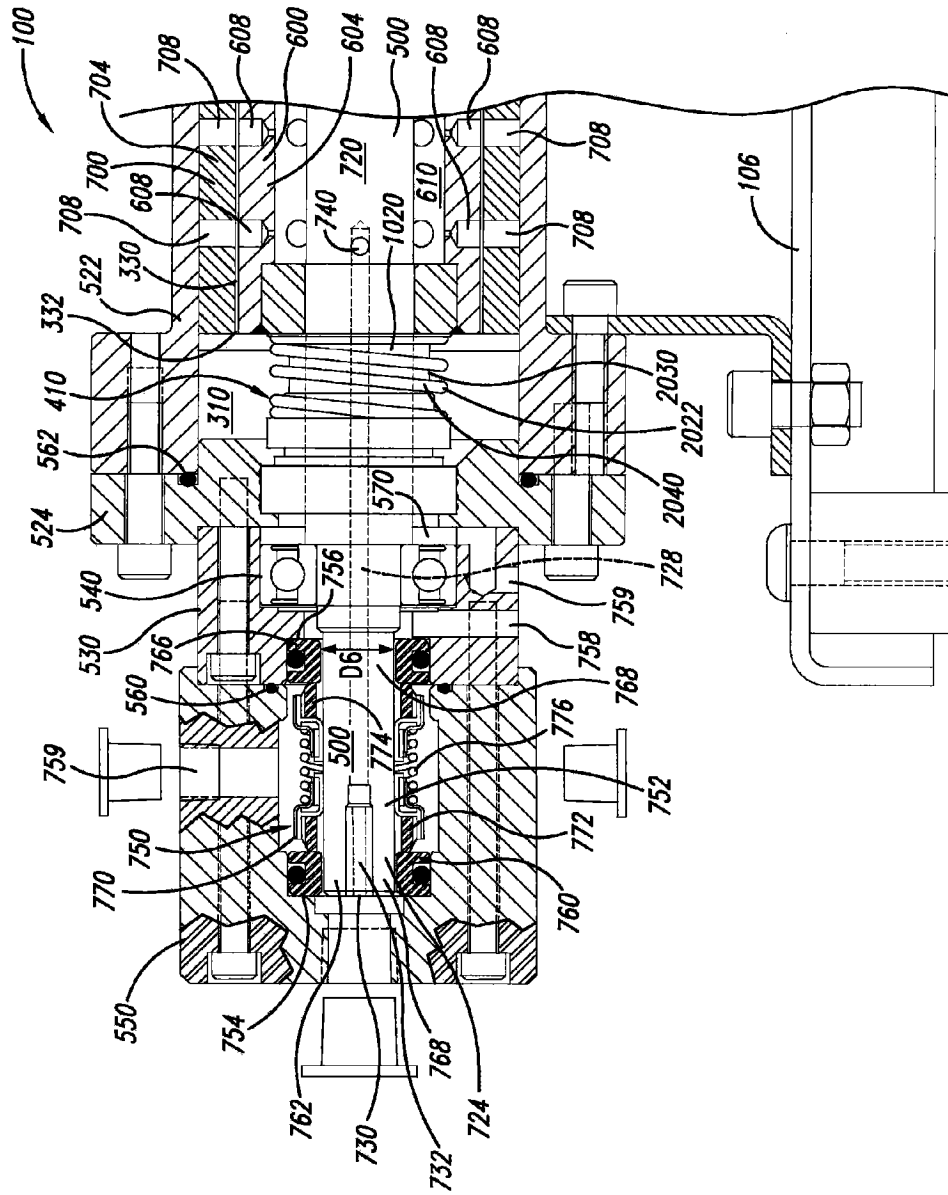


图 5

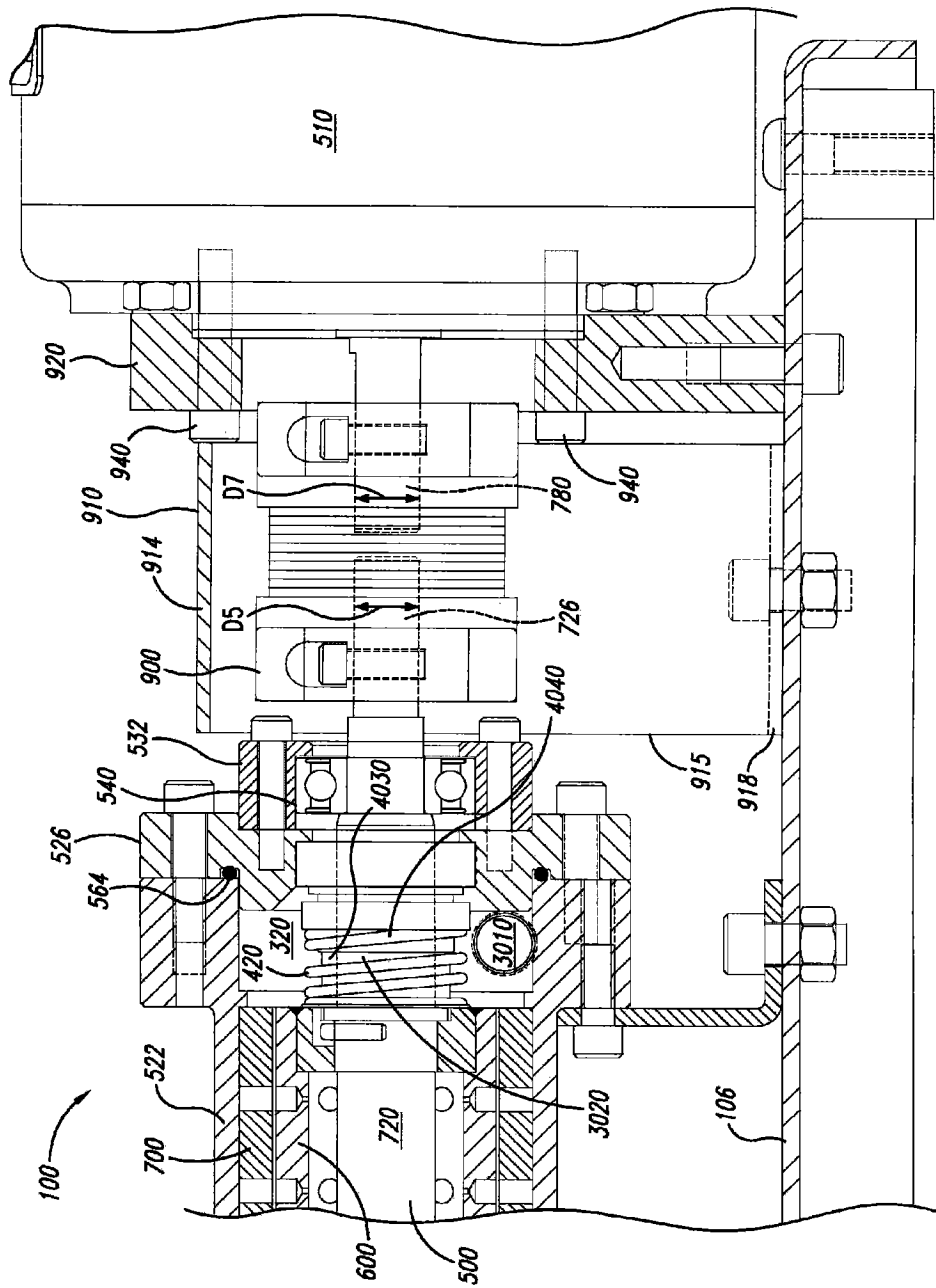


图 6

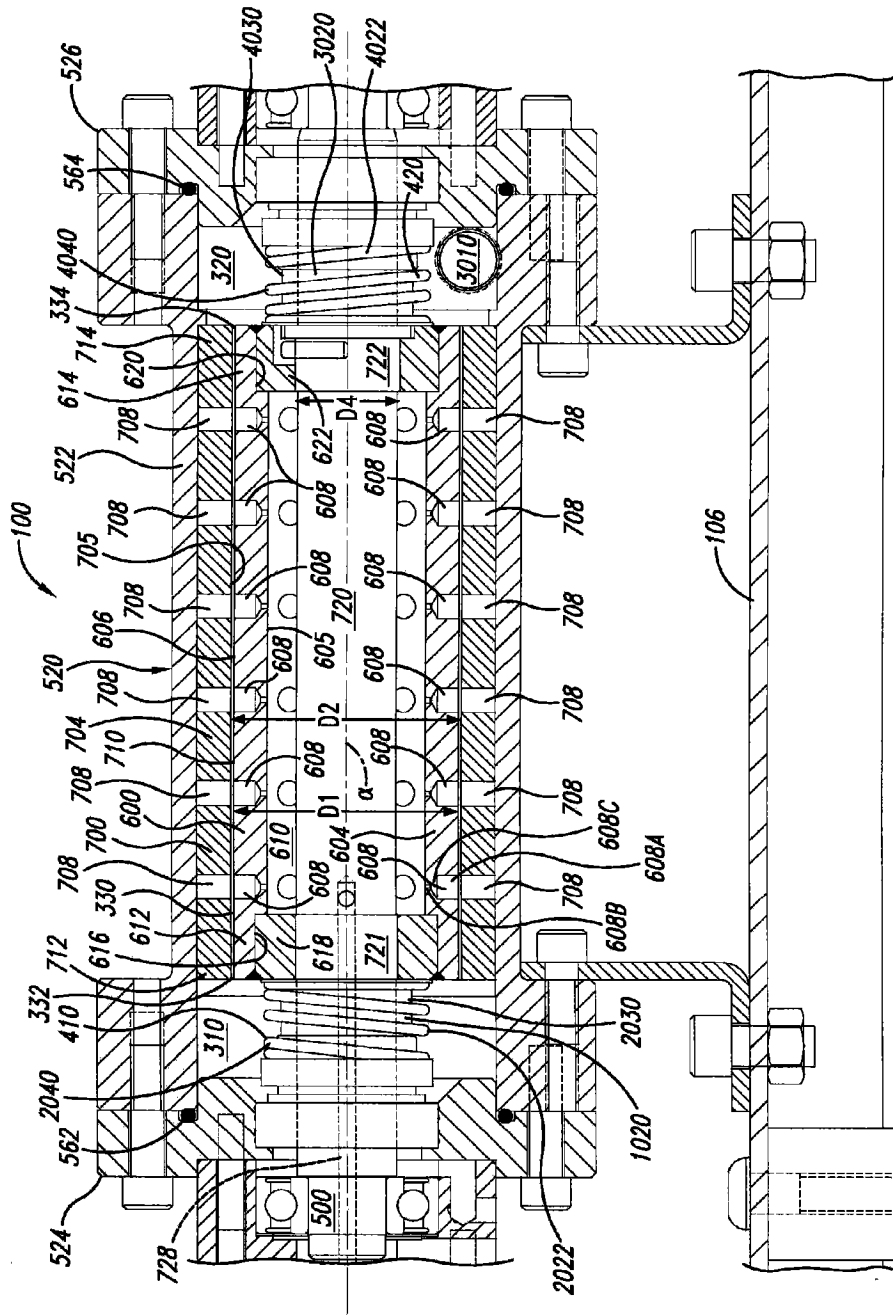


图 7

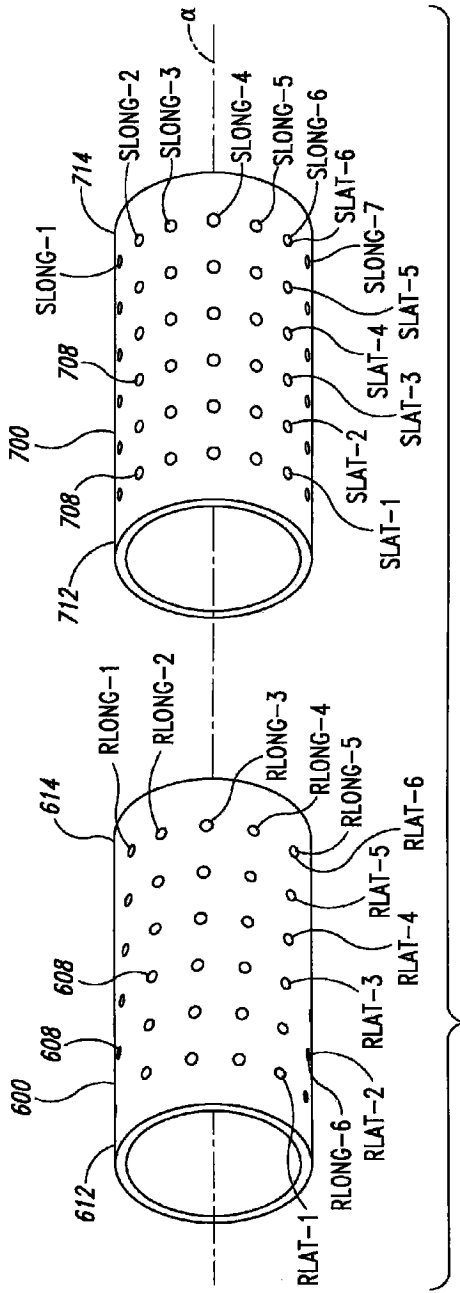


图 8

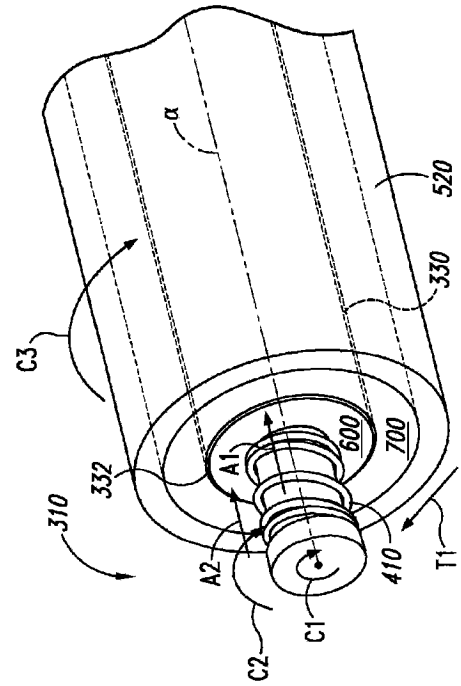


图 9

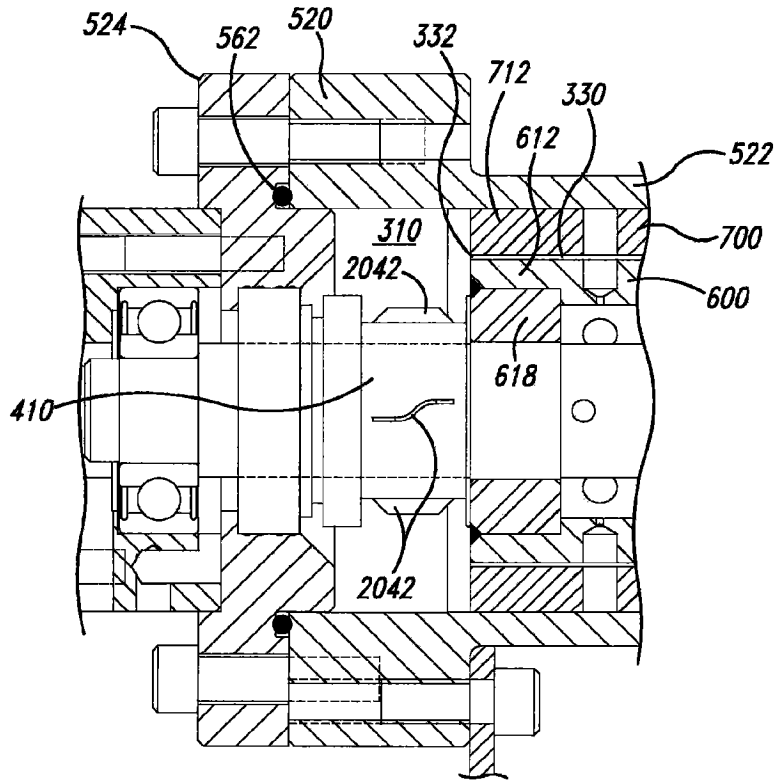


图 10

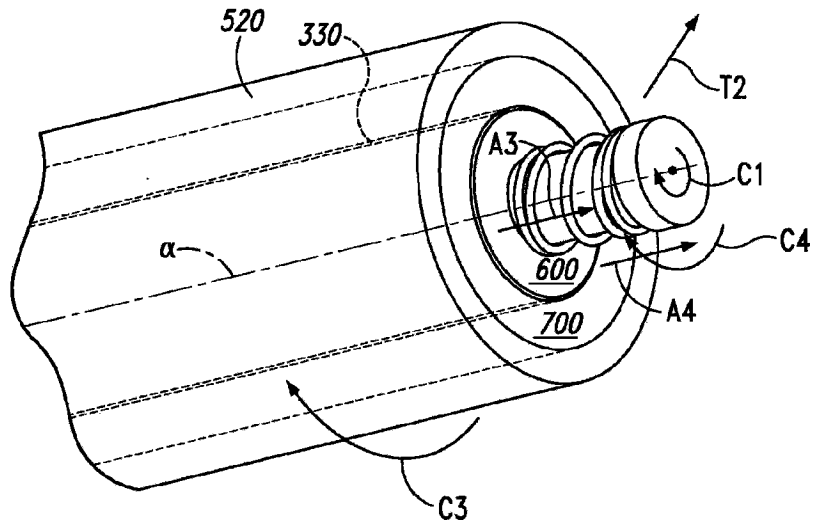


图 11

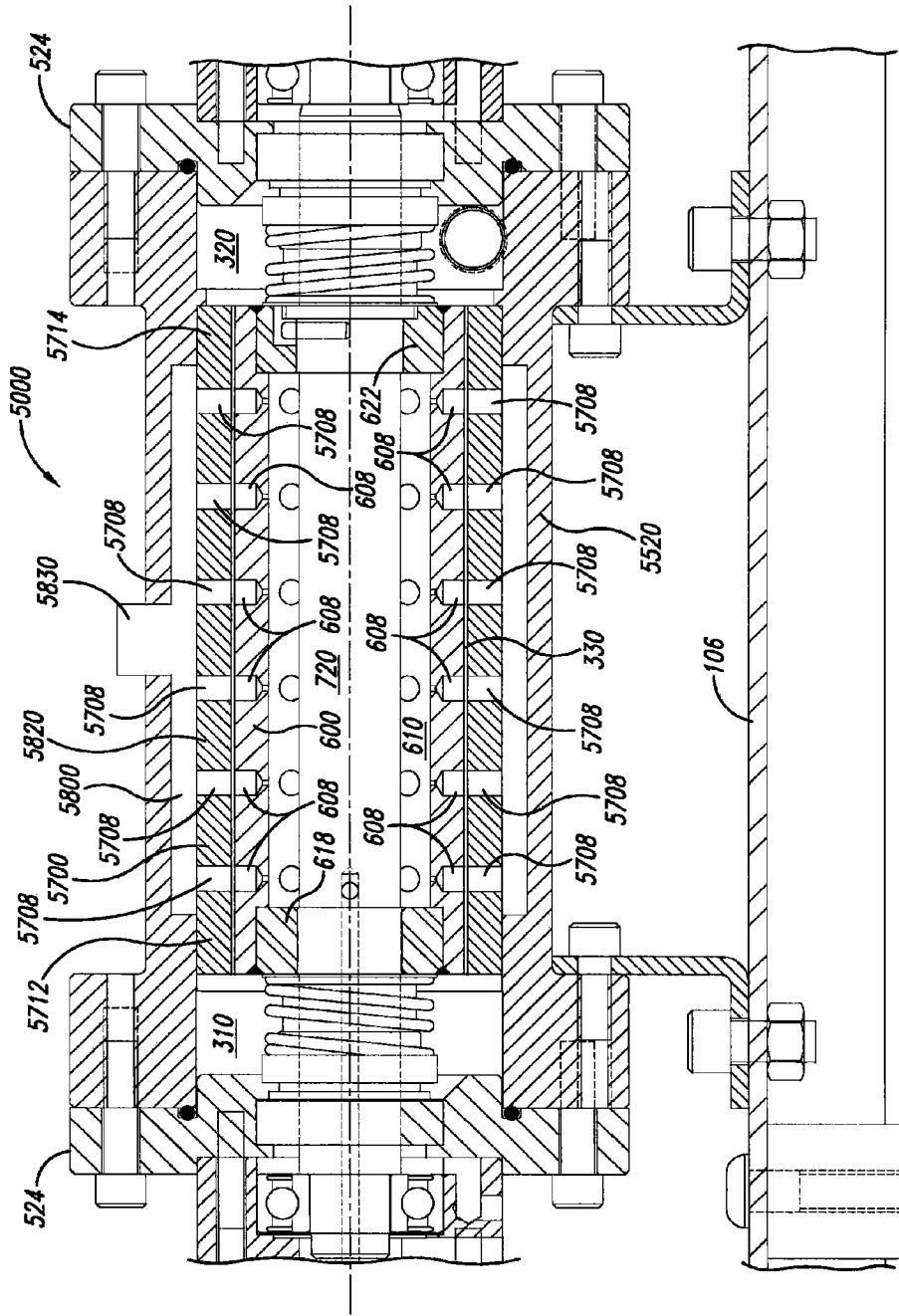


图 12

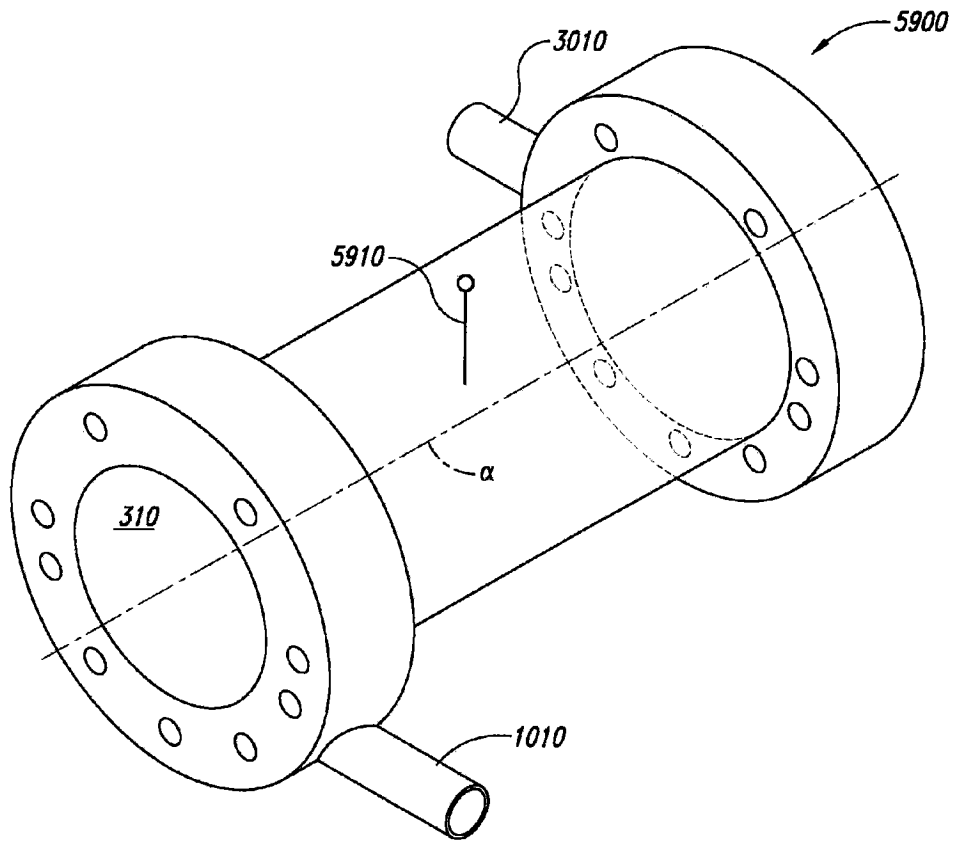


图 13

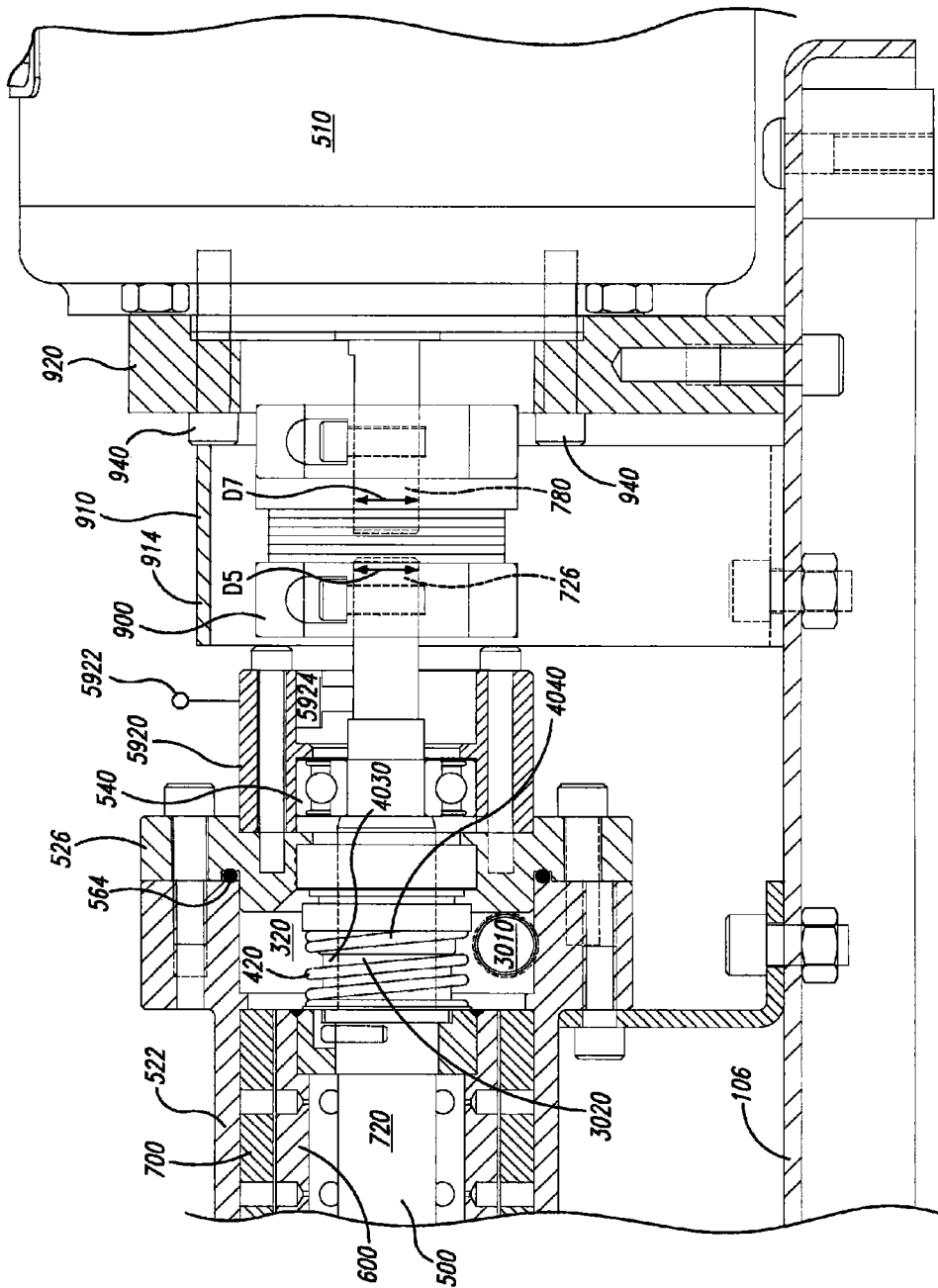


图 14

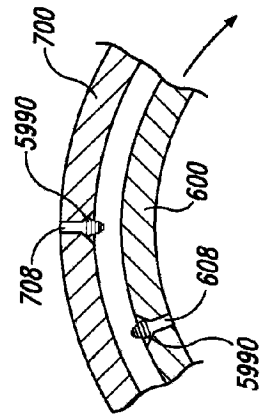


图 15

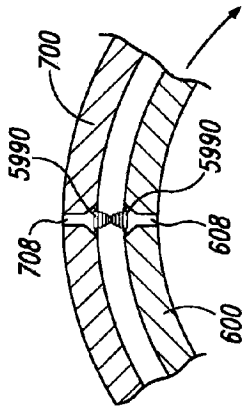


图 16

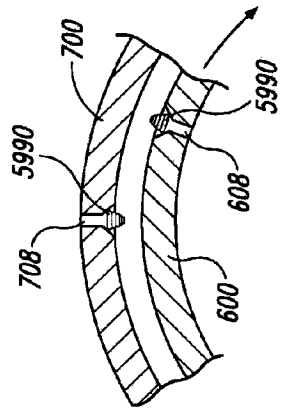


图 17

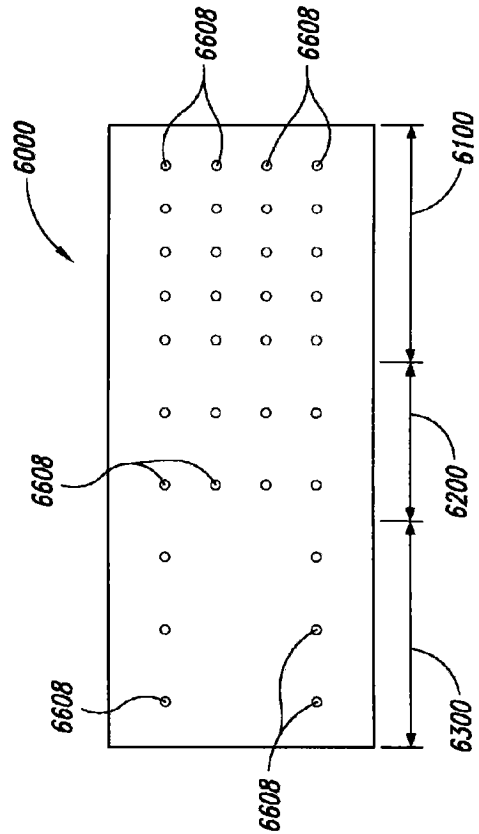


图 18

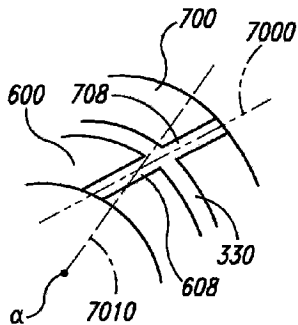


图 19

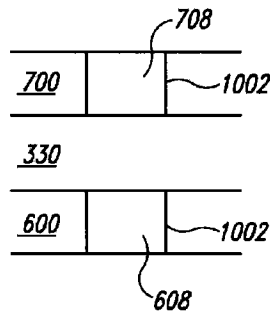


图 20

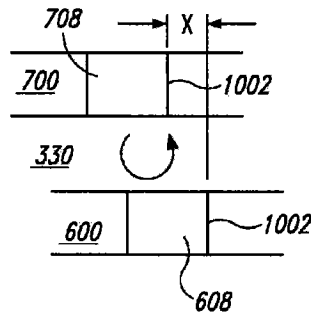


图 21



图 22

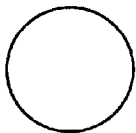


图 23

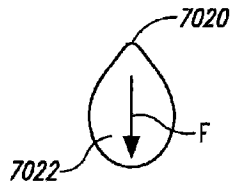


图 24

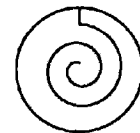


图 25

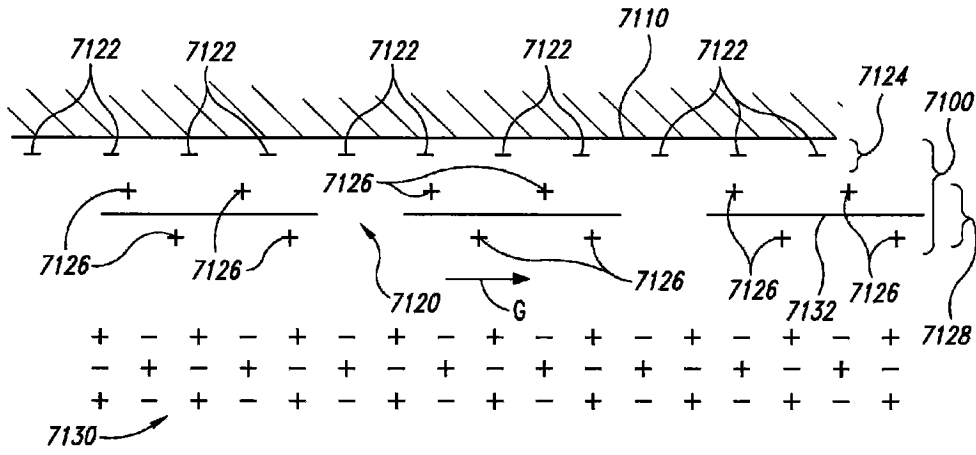


图 26

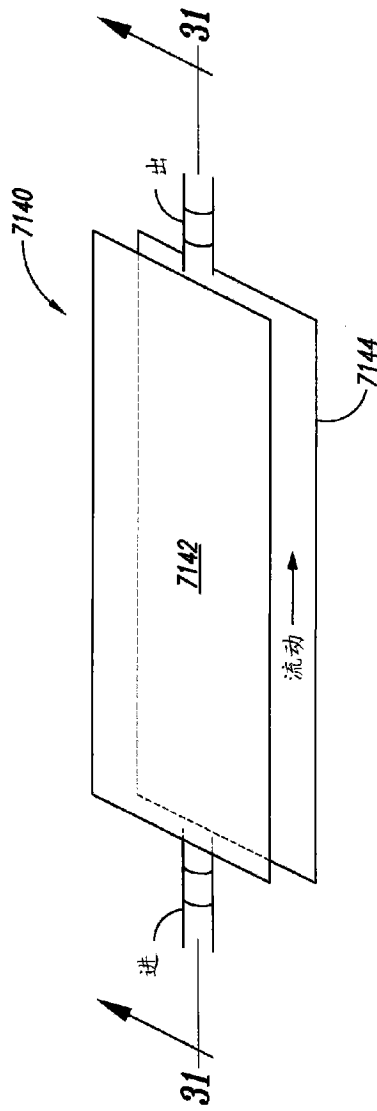


图 27

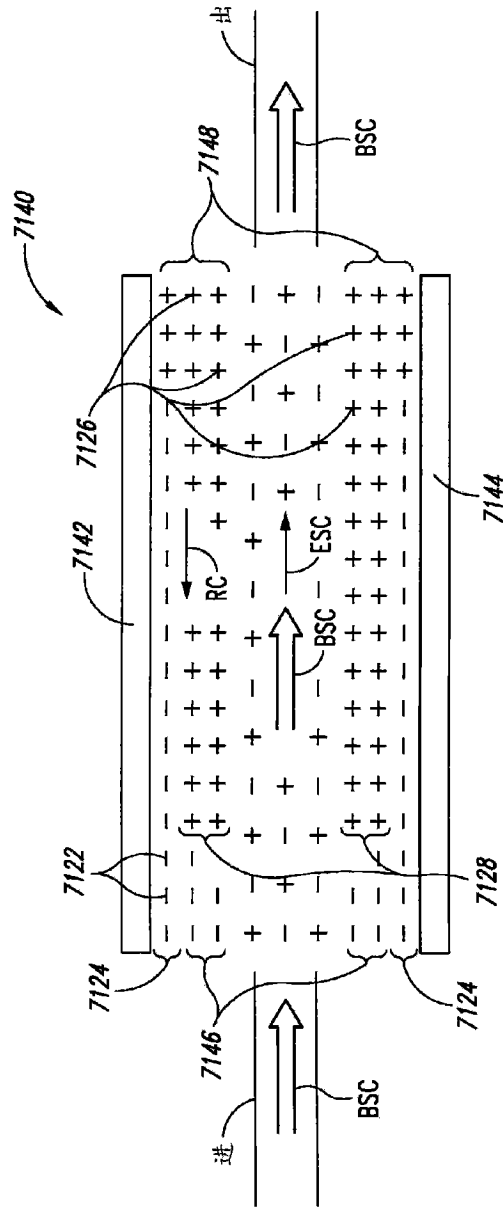


图 28

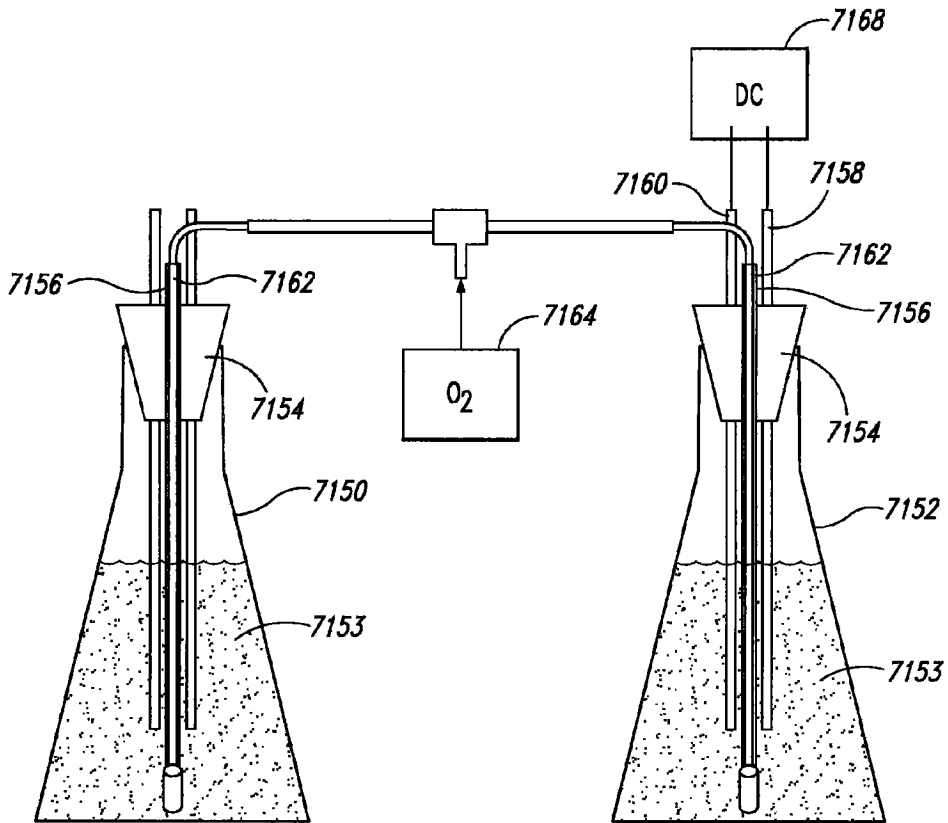


图 29

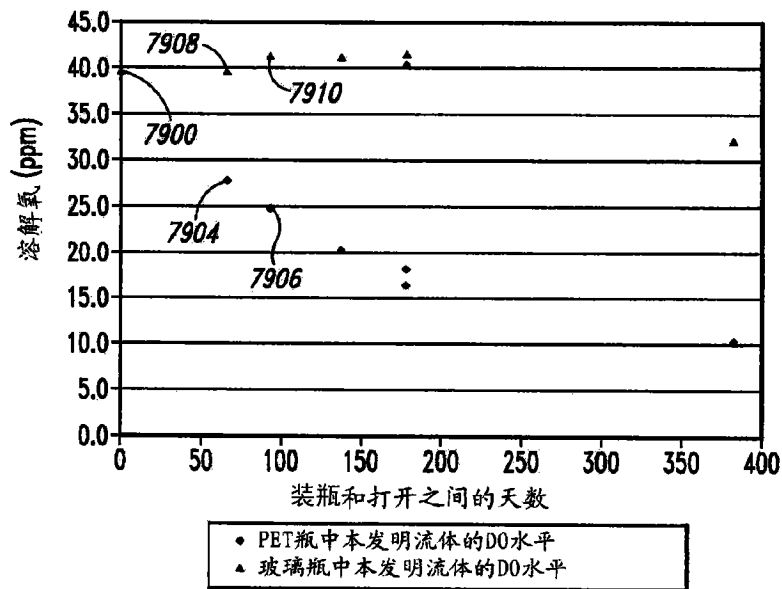


图 30

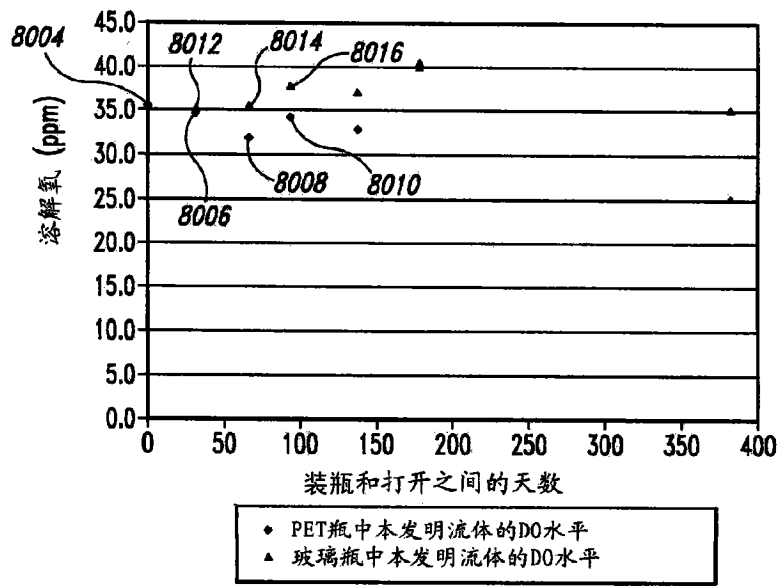


图 31

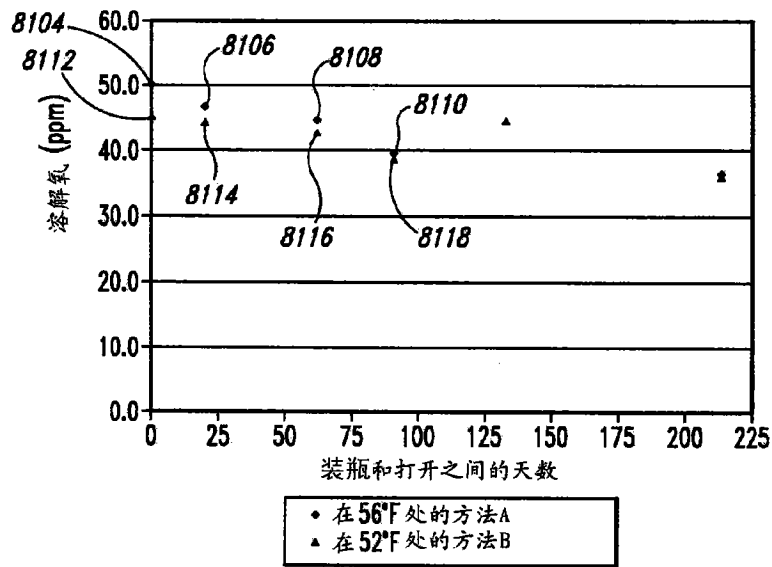


图 32

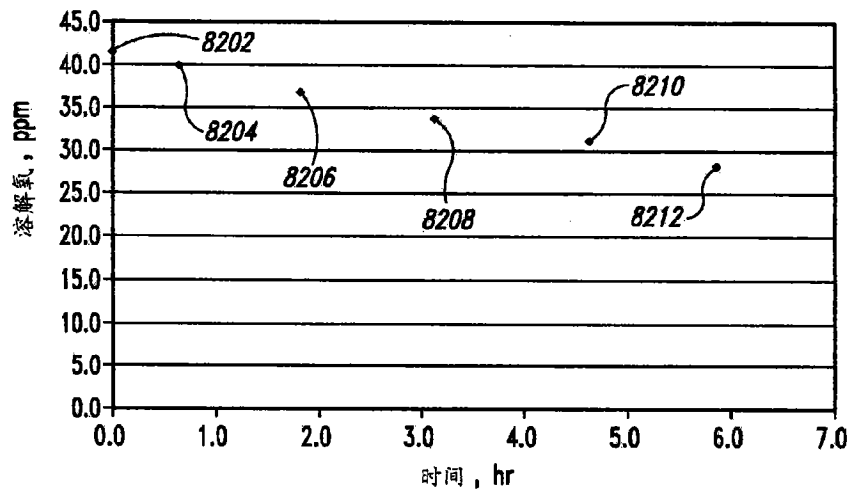


图 33

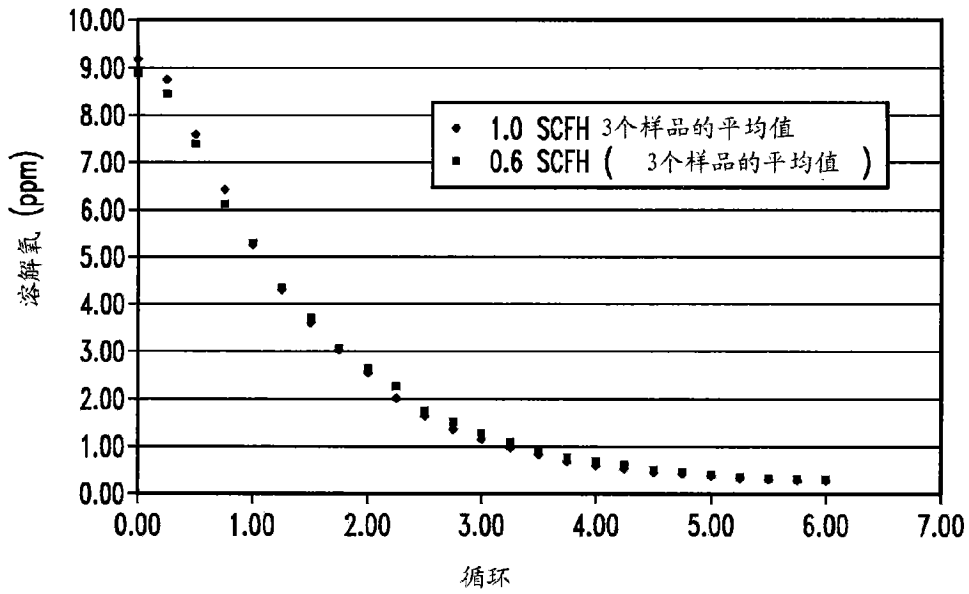


图 34

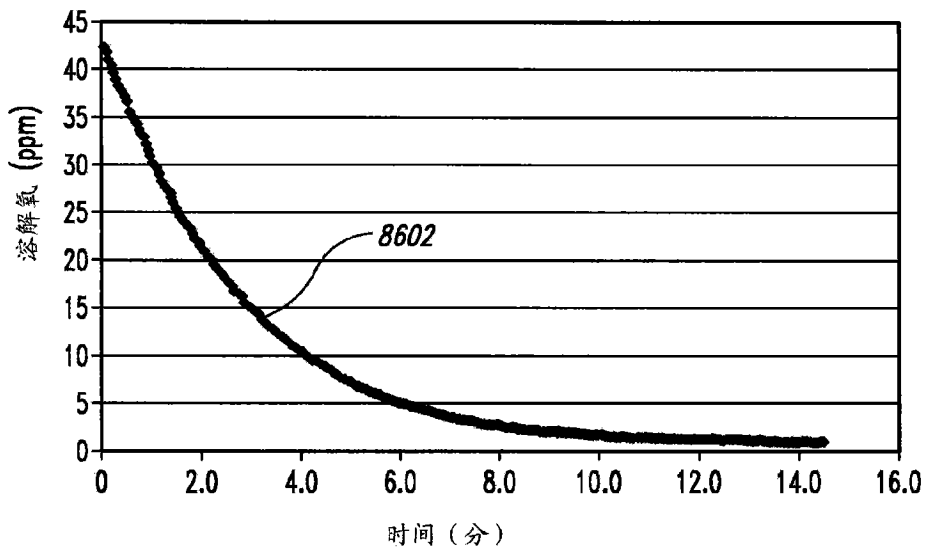


图 35

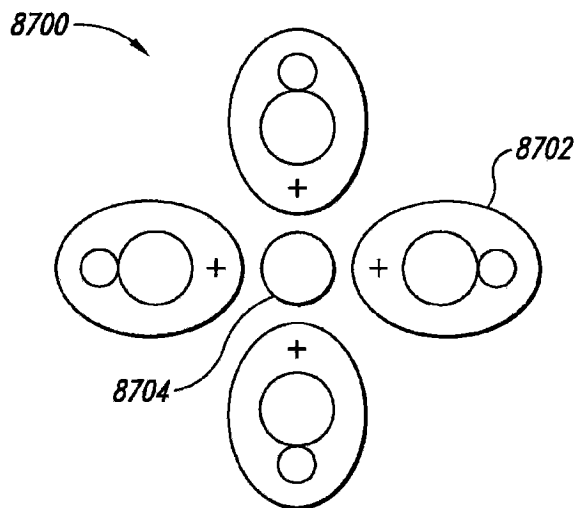


图 36

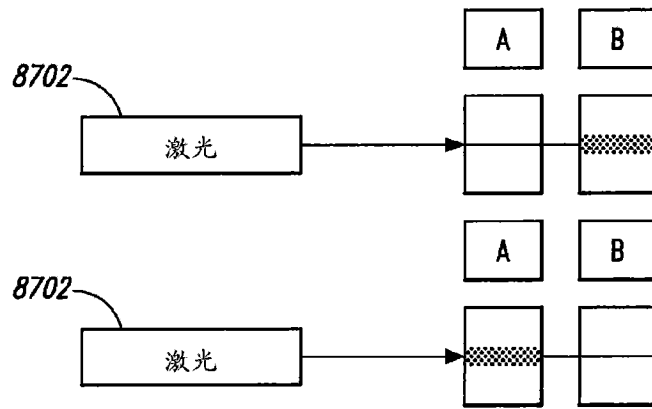


图 37A

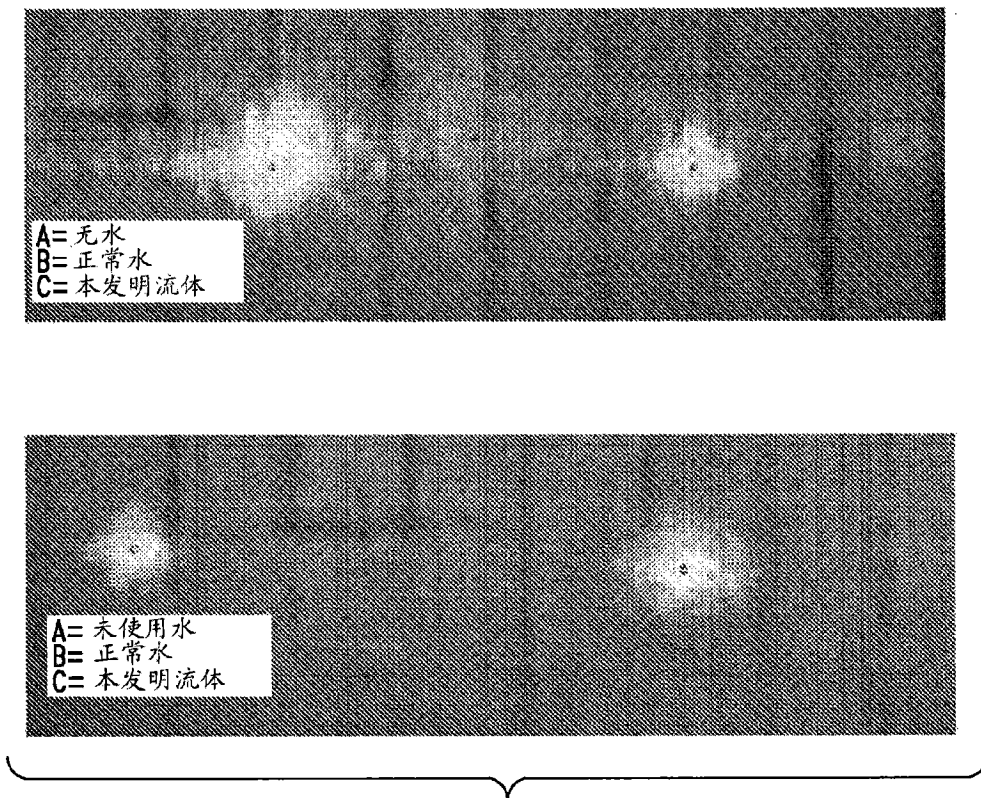


图 37B

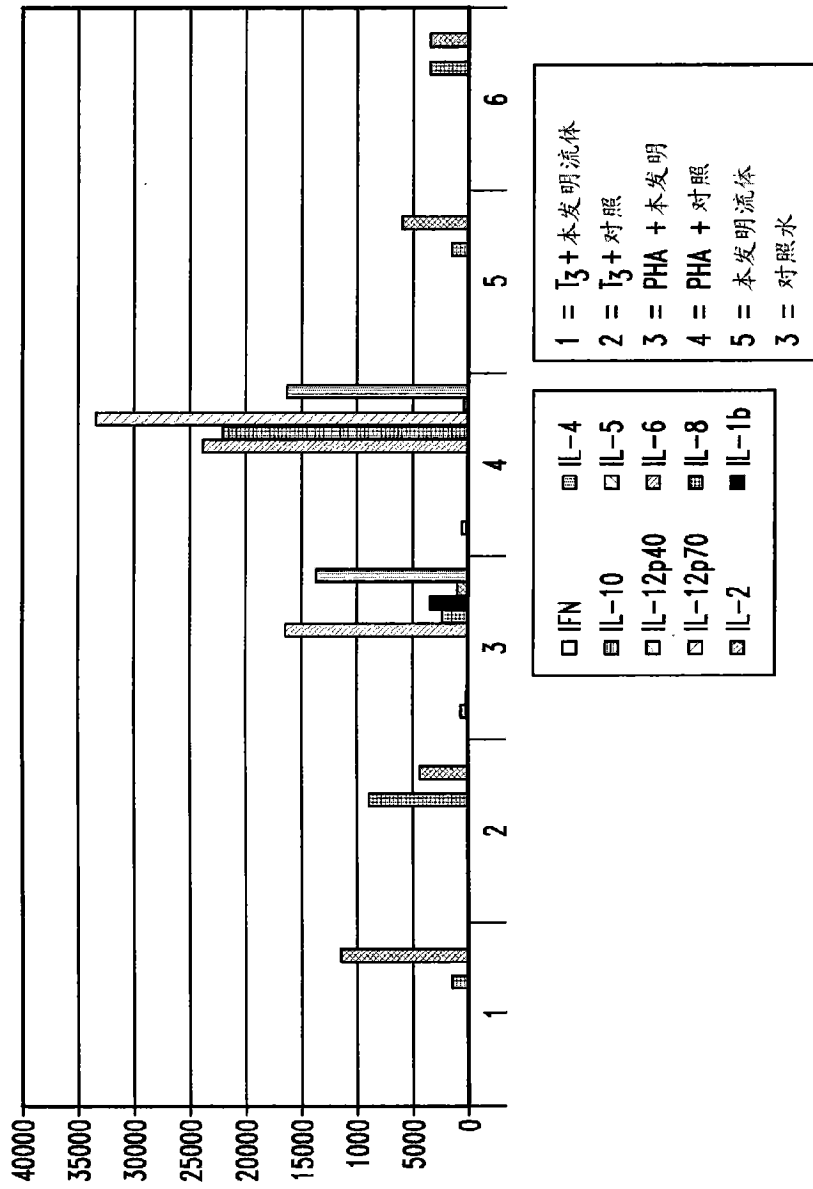


图 38

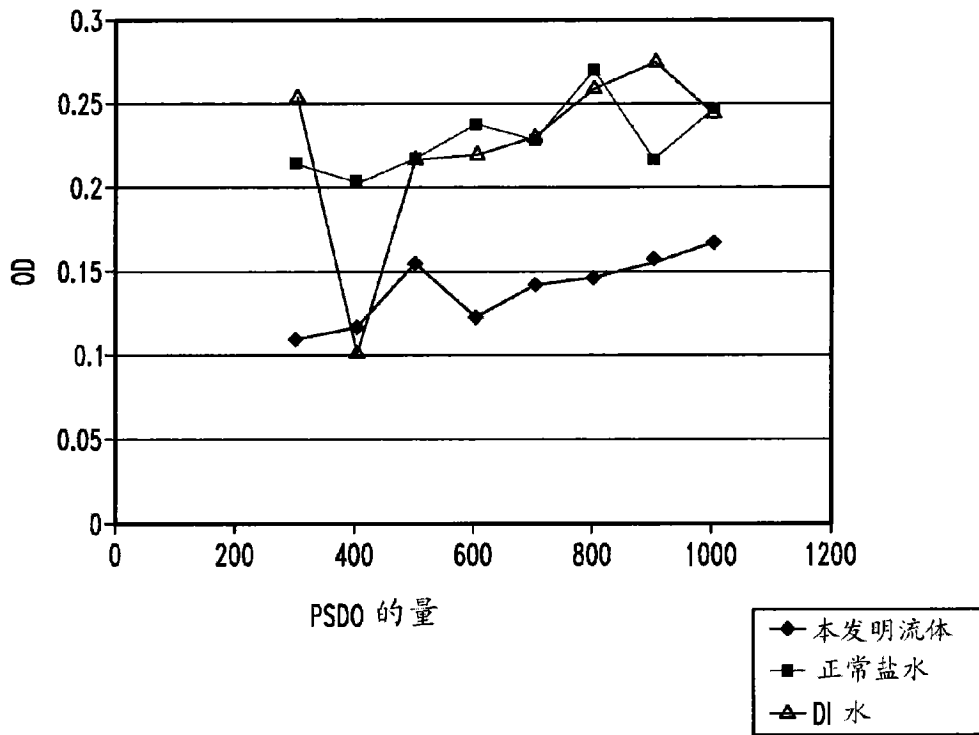


图 39

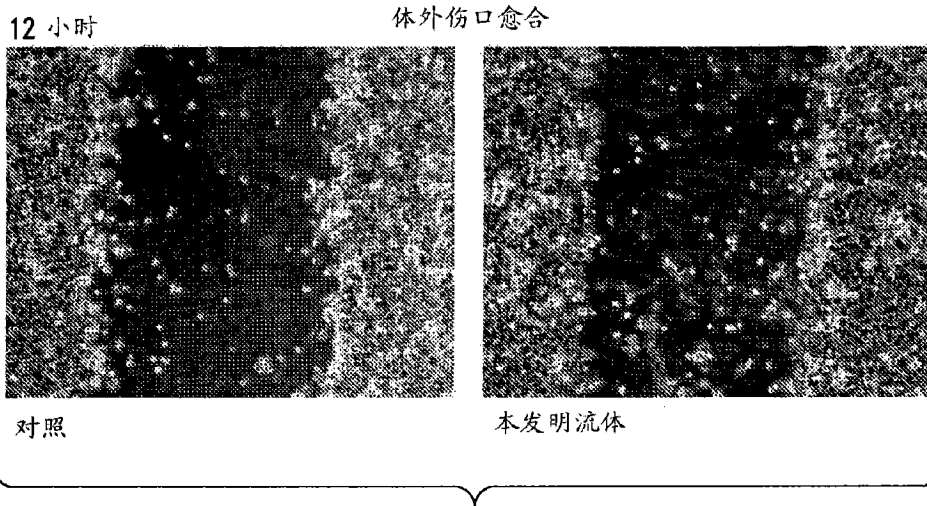


图 40A

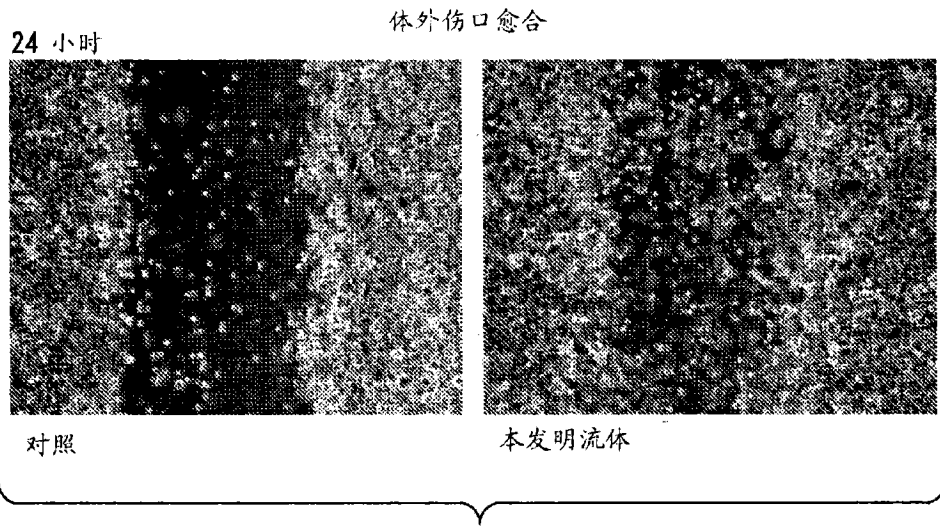
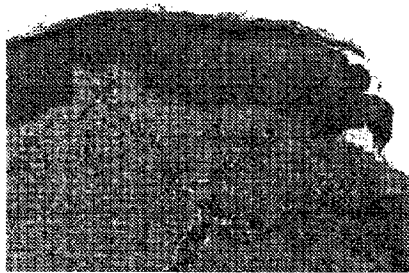


图 40B



受伤后一天对照显示表皮 / 真皮增厚和轮廓损失

图 41A



受伤后一天使用本发明流体的试验组显示正常的表皮 / 真皮厚度和正常的轮廓

图 41B



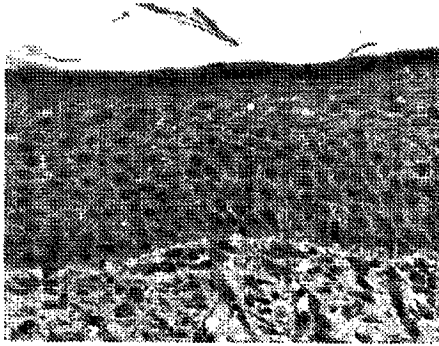
对照第 4 天显示 600 微米的表皮突出物

图 41C

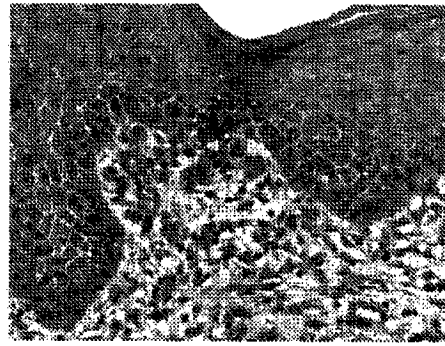


使用本发明流体的试验组第 4 天显示 1200 微米的表皮突出物

图 41D



对照第 16 天显示具有表皮 / 真皮轮廓损失的较低分化的表皮



使用本发明流体的试验组显示更加分化的表皮和更正常的表皮 / 真皮轮廓

图 41E

图 41F

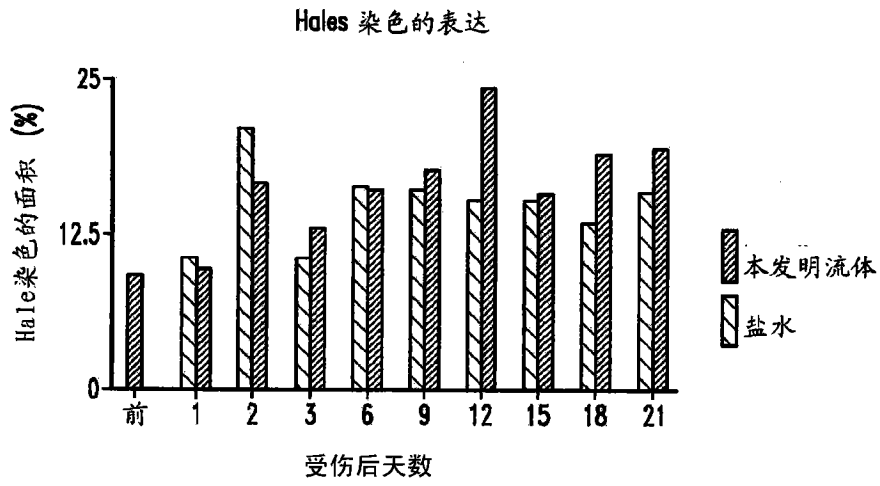


图 42

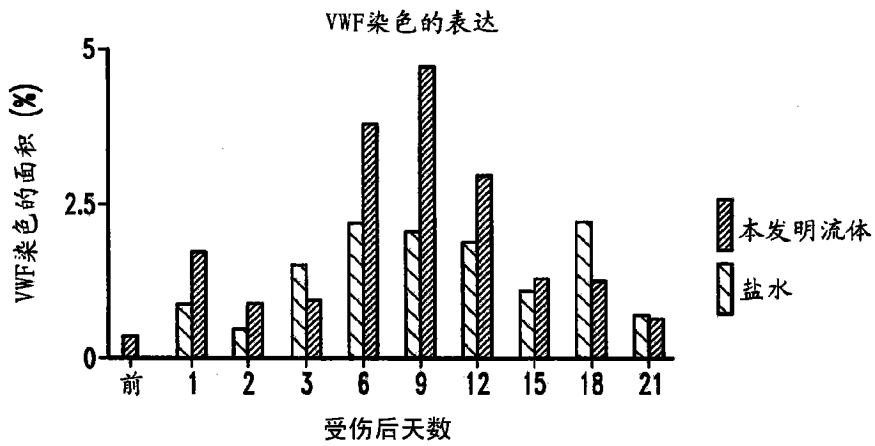


图 43

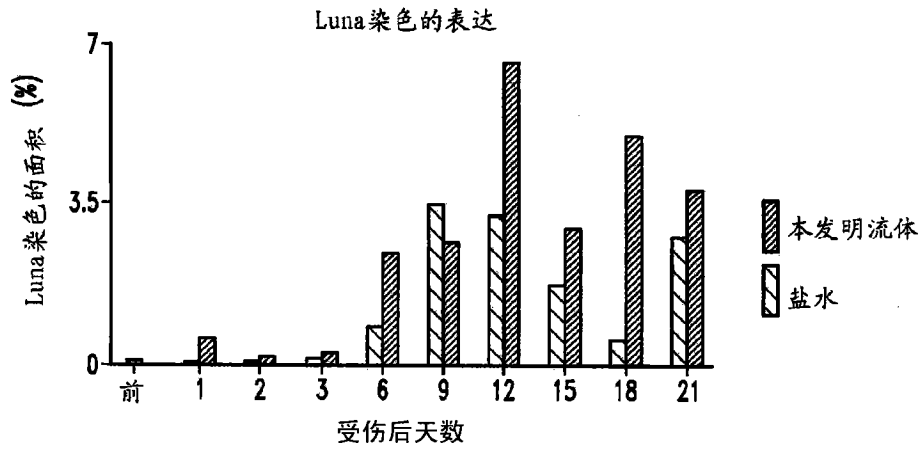


图 44

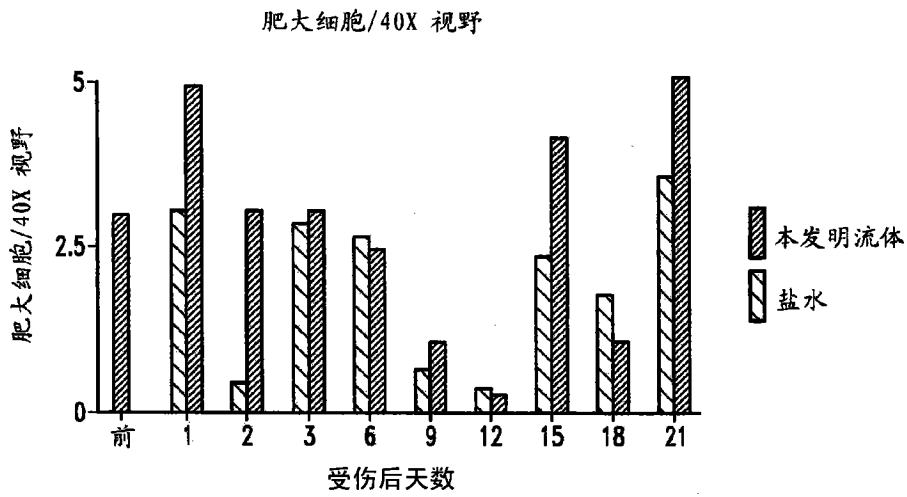


图 45

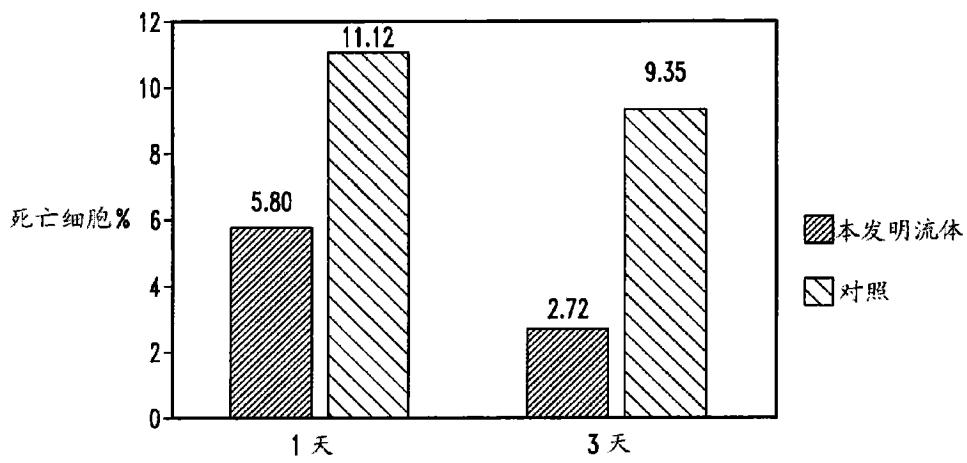


图 46

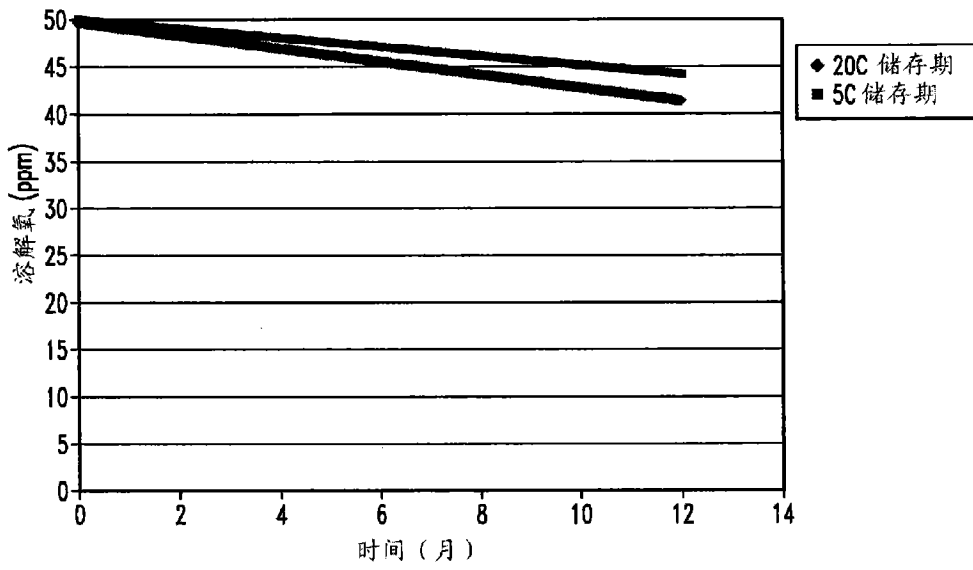


图 47

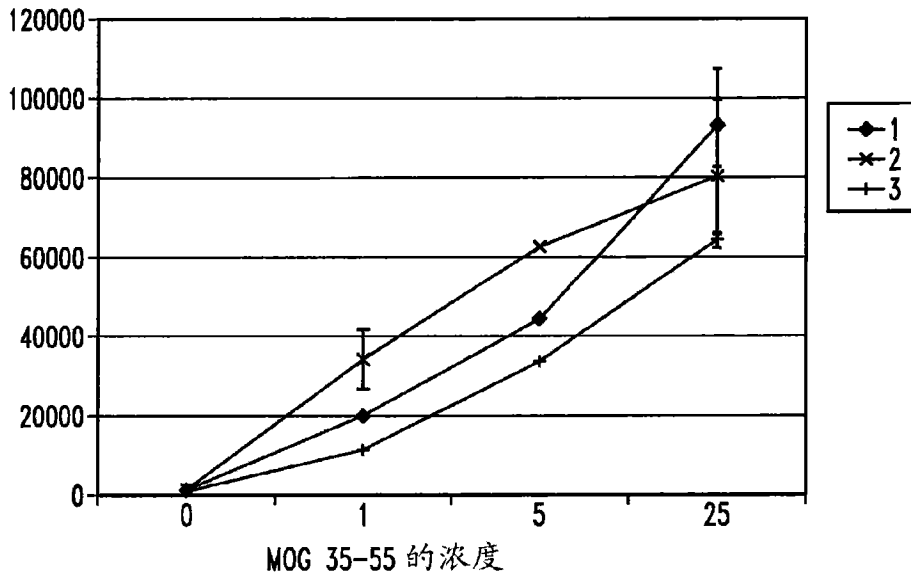


图 48

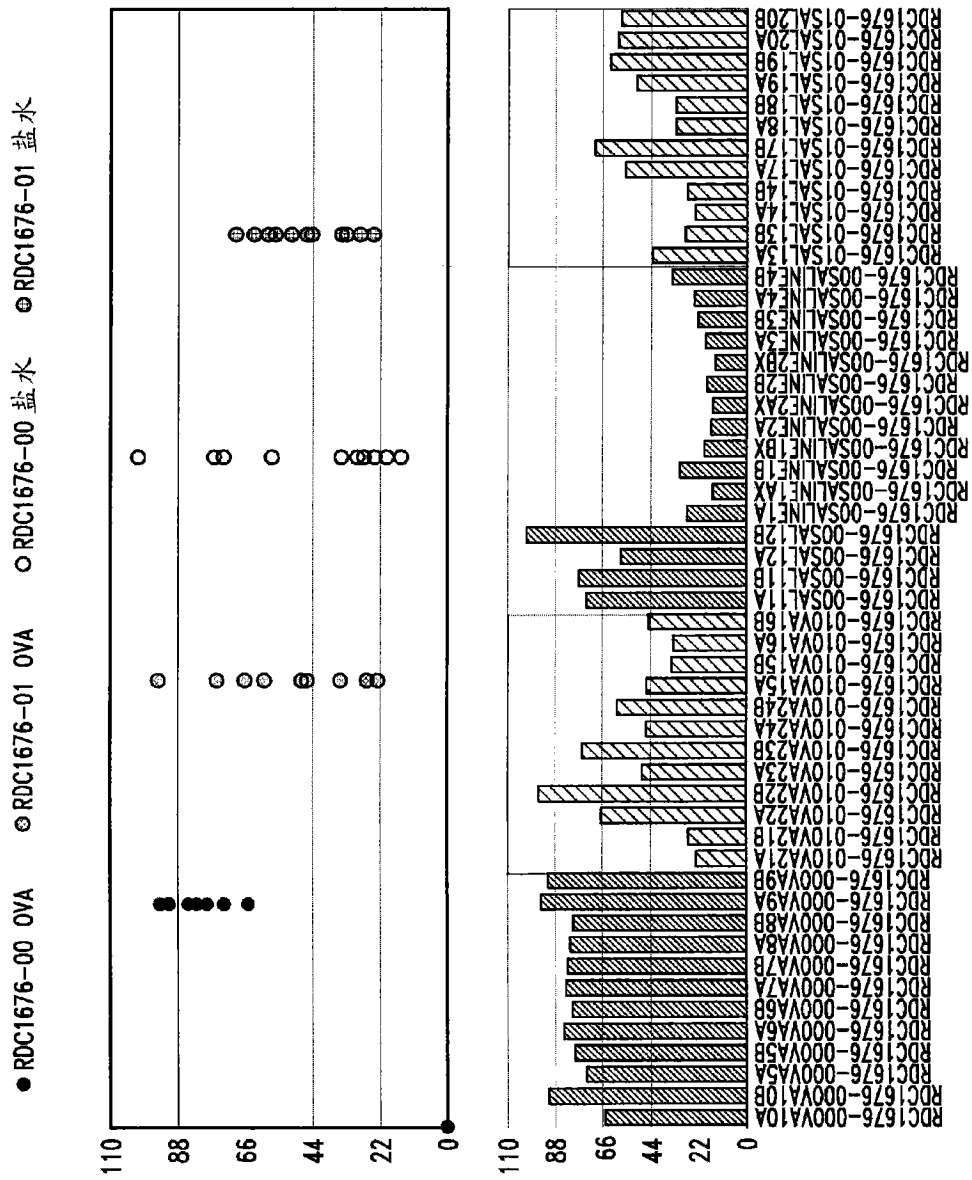


图 49

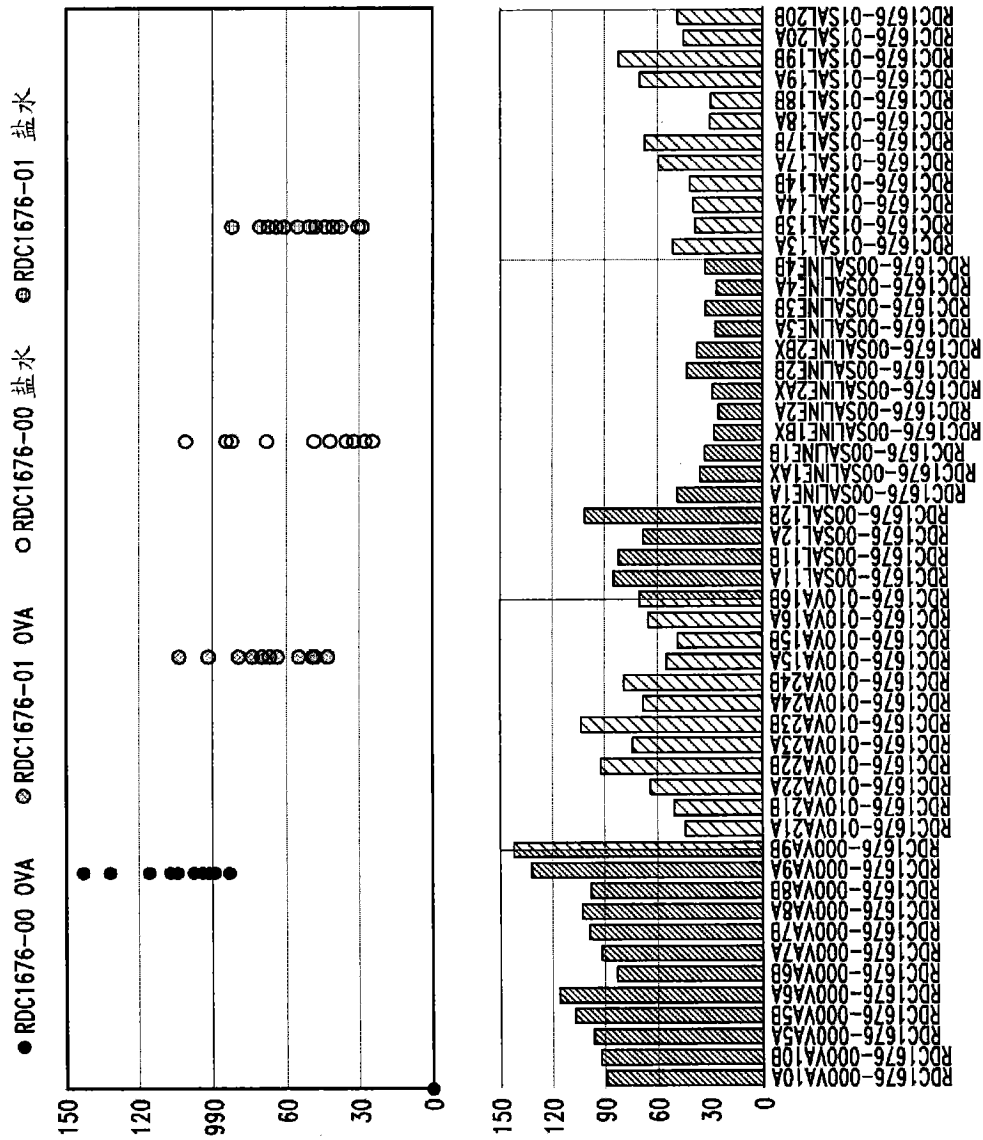


图 50

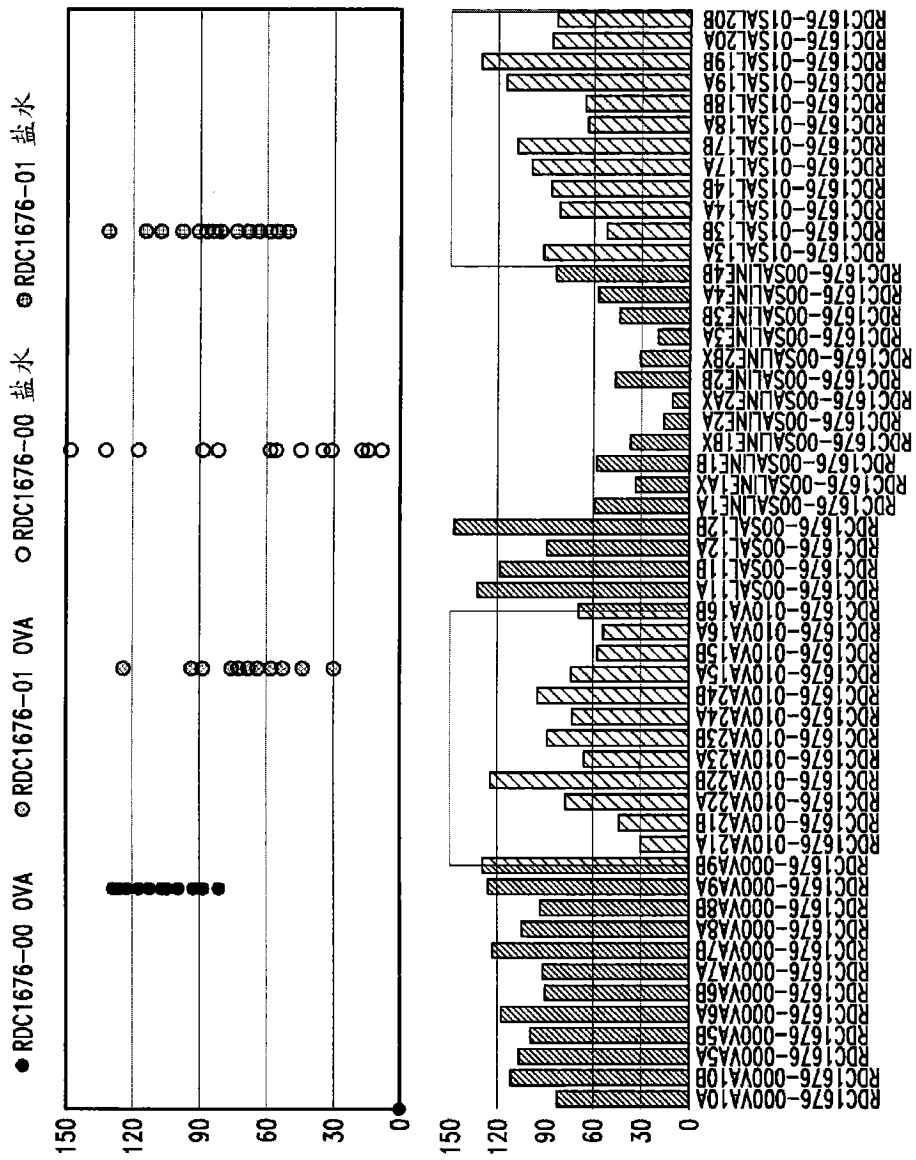


图 51

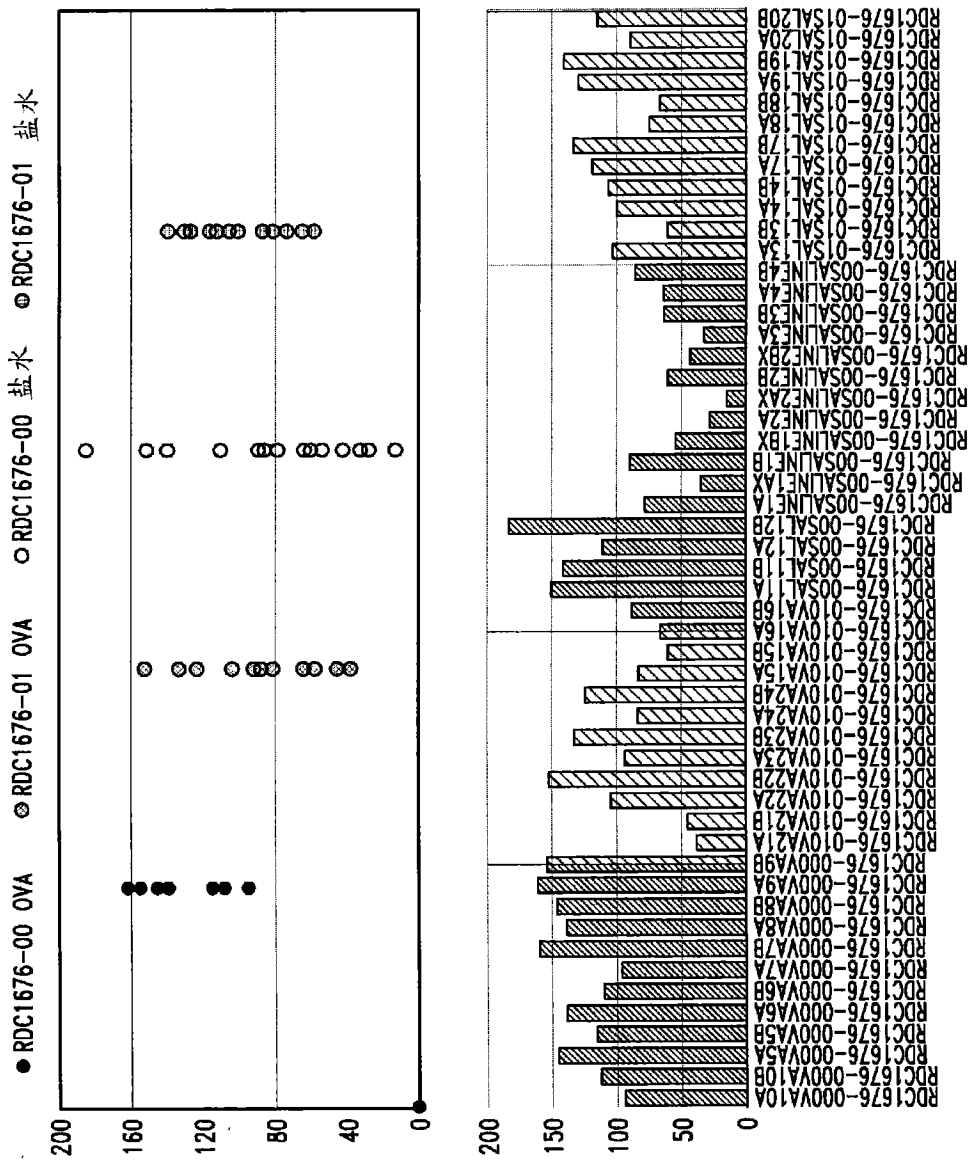


图 52

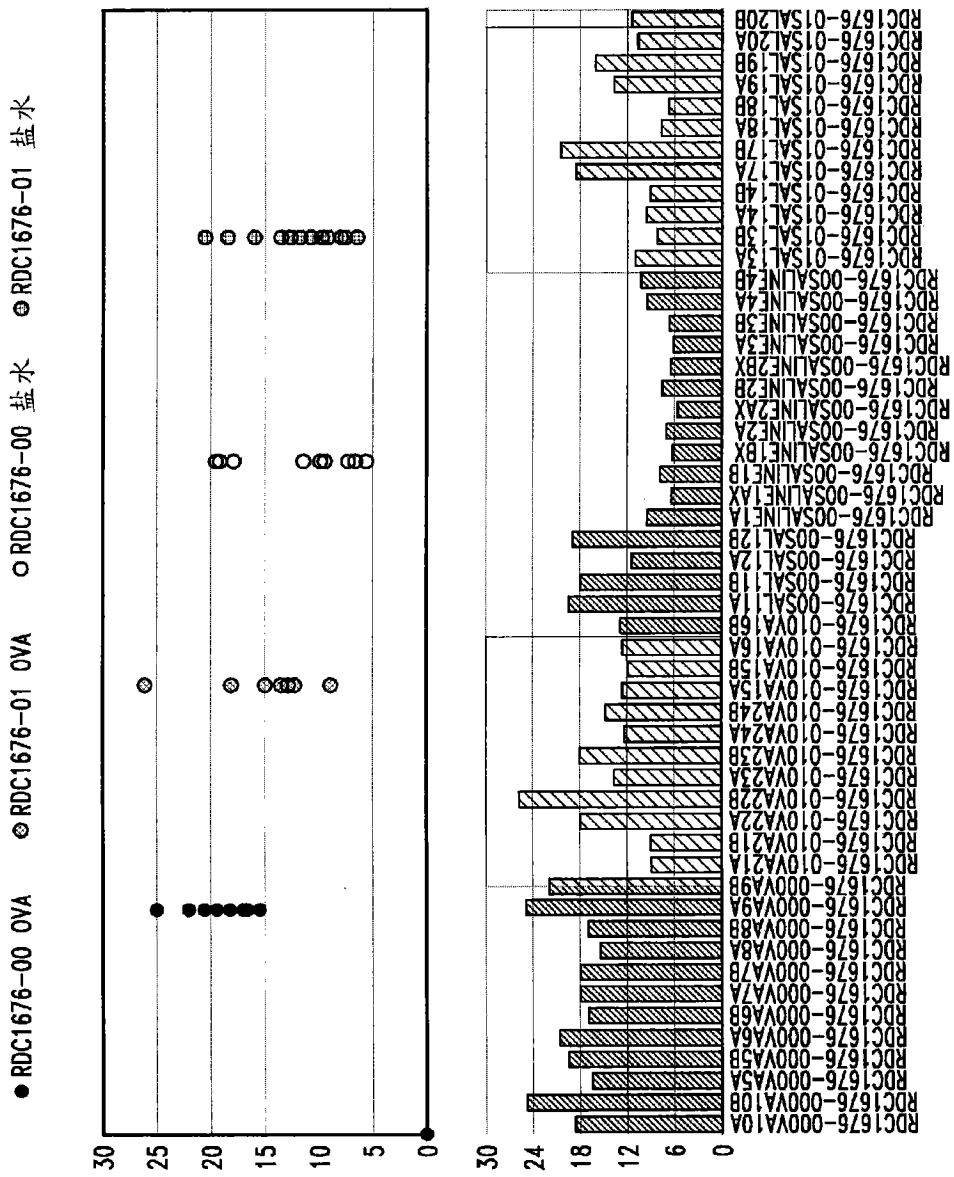


图 54

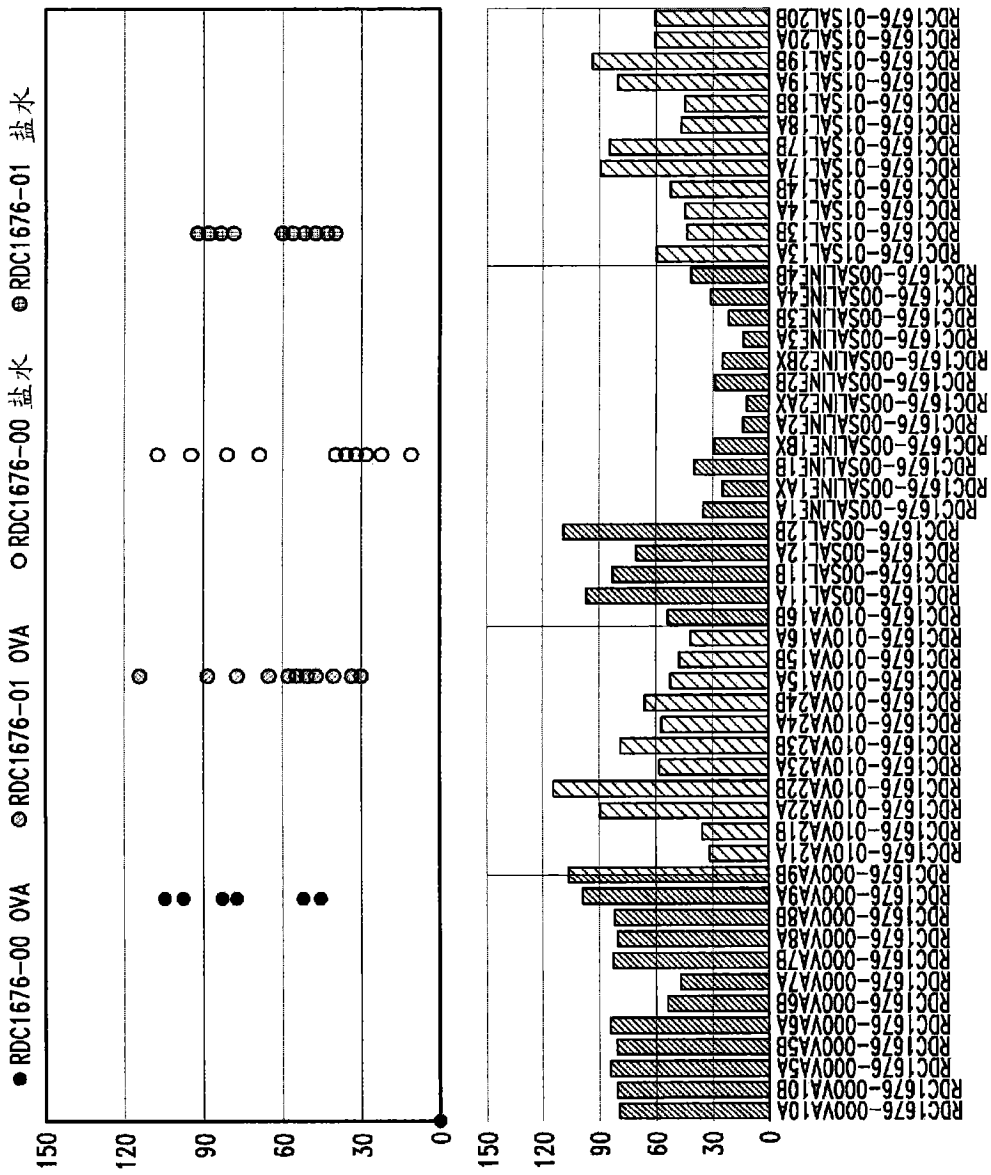


图 55

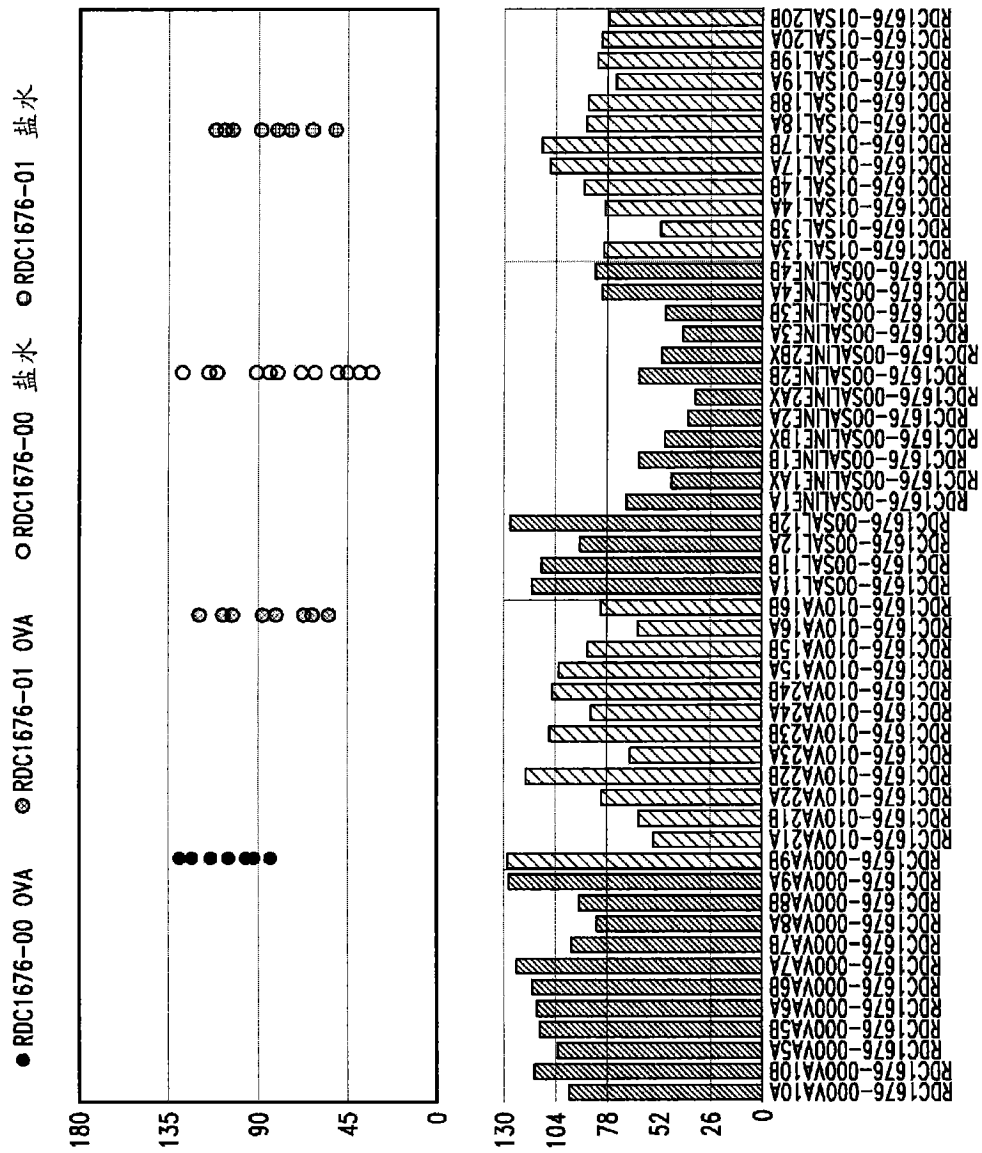


图 56

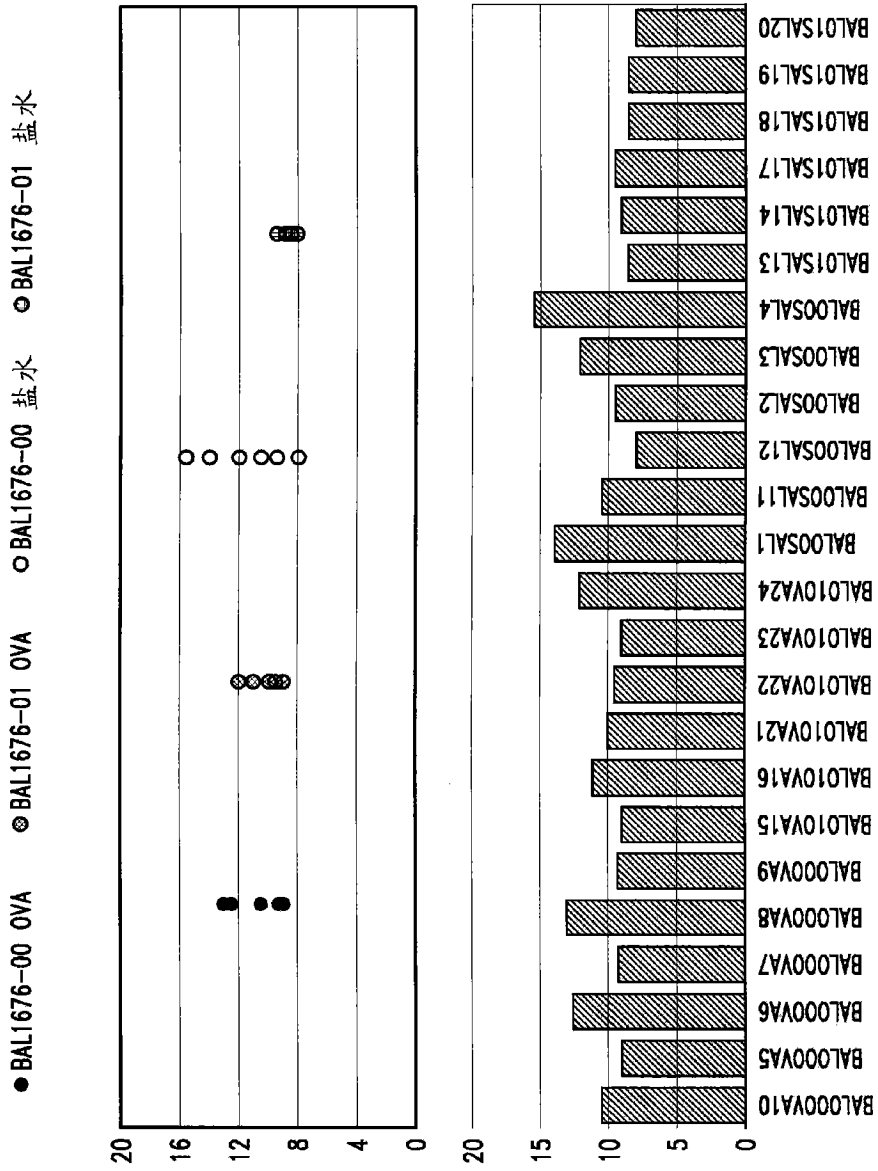


图 59

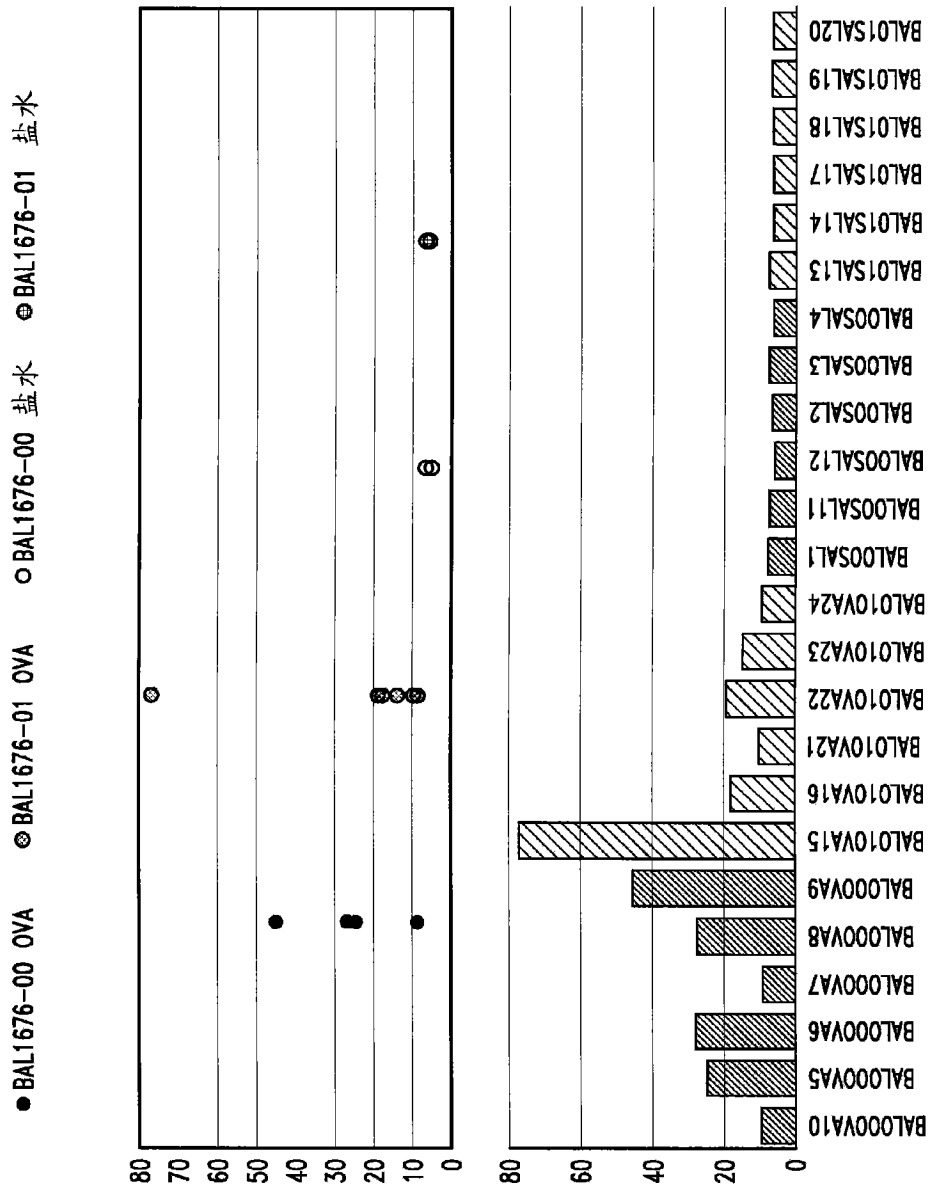


图 60

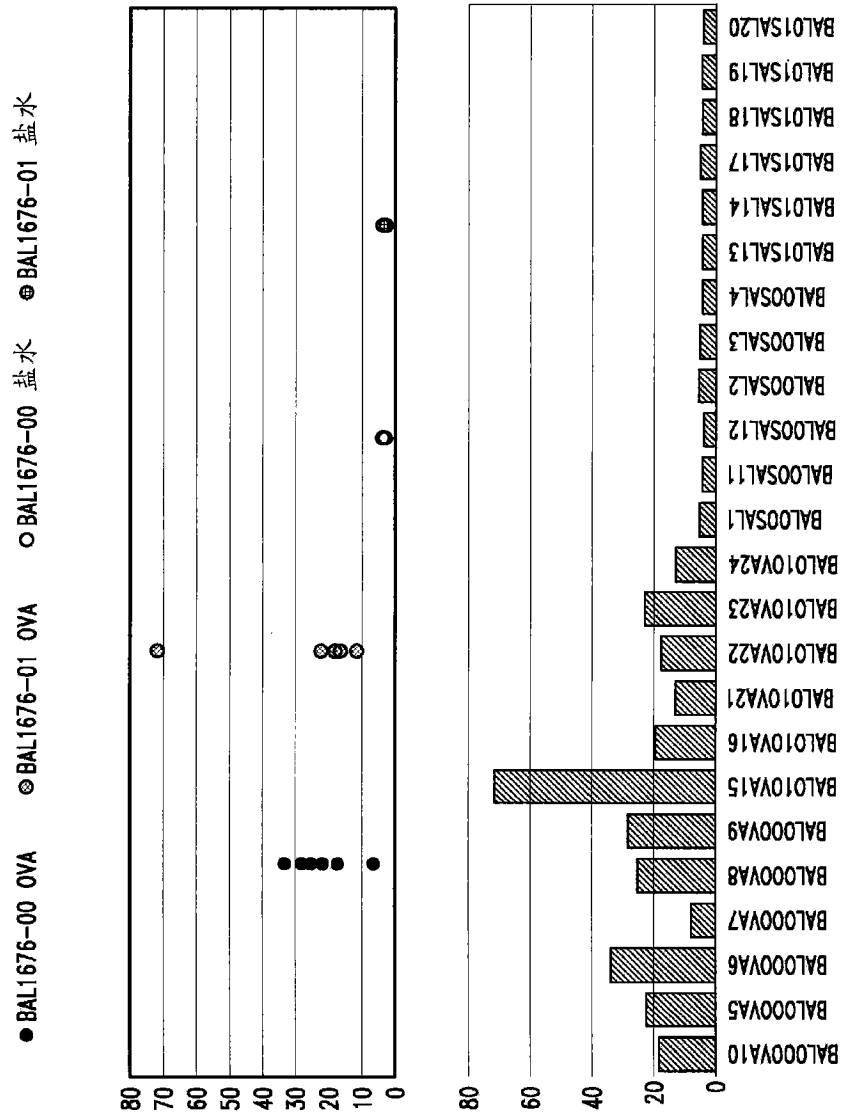


图 61

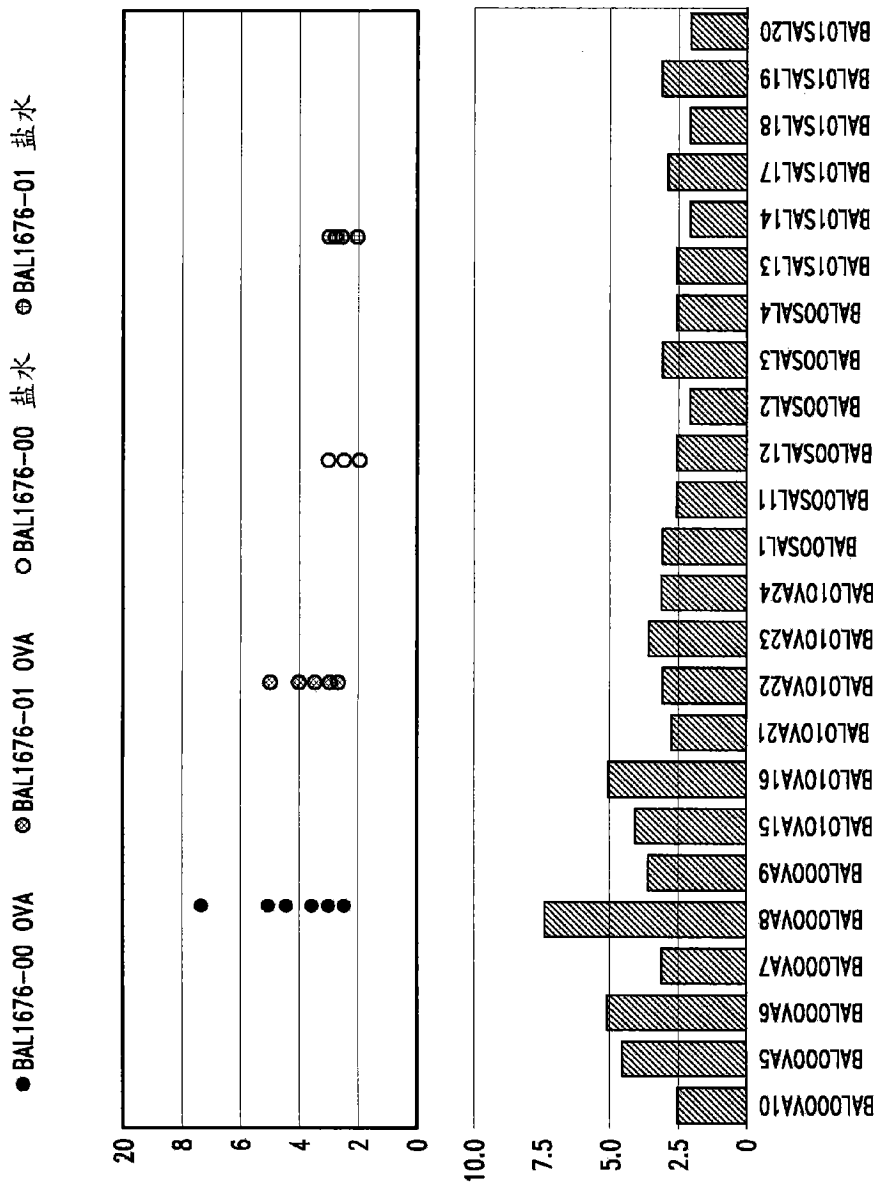


图 62

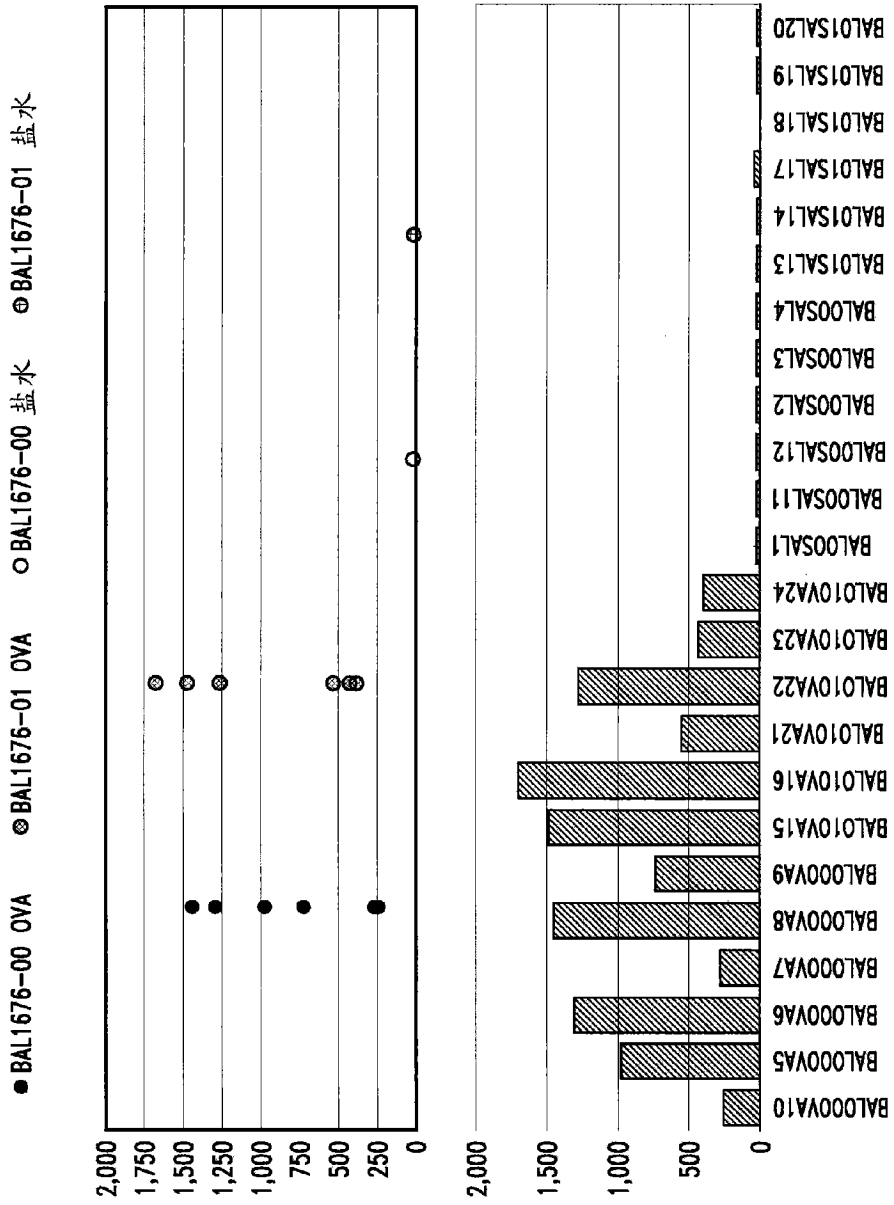


图 63

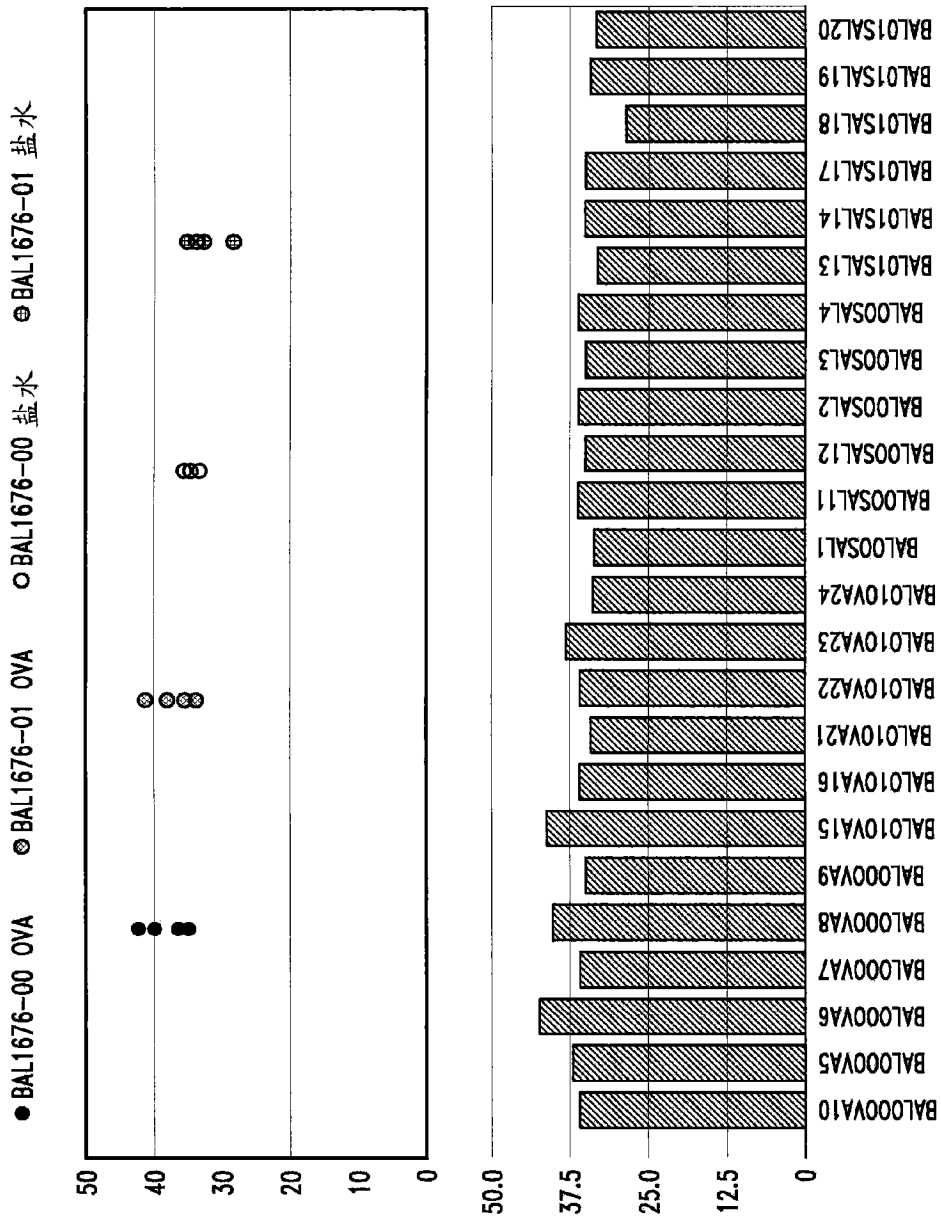


图 64

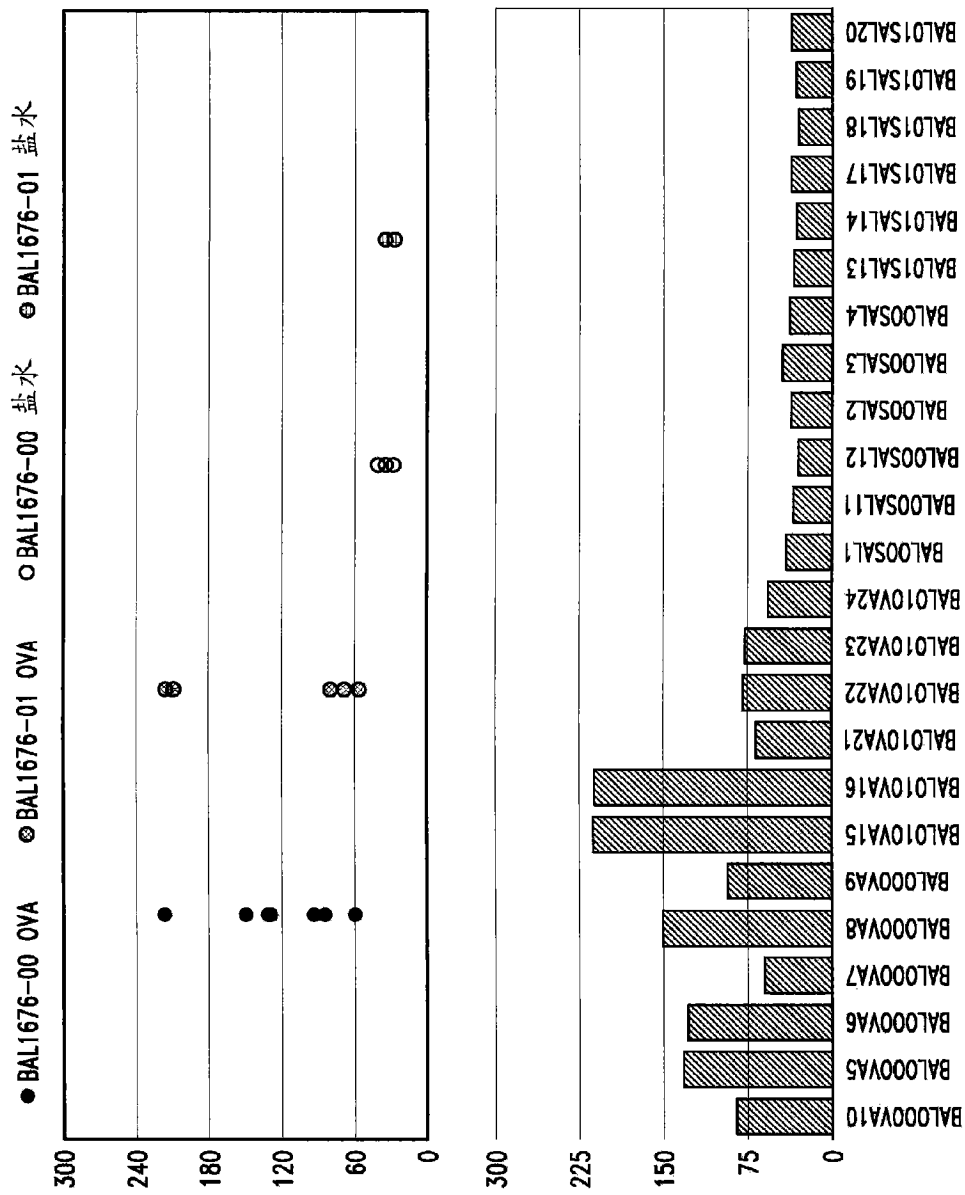


图 66

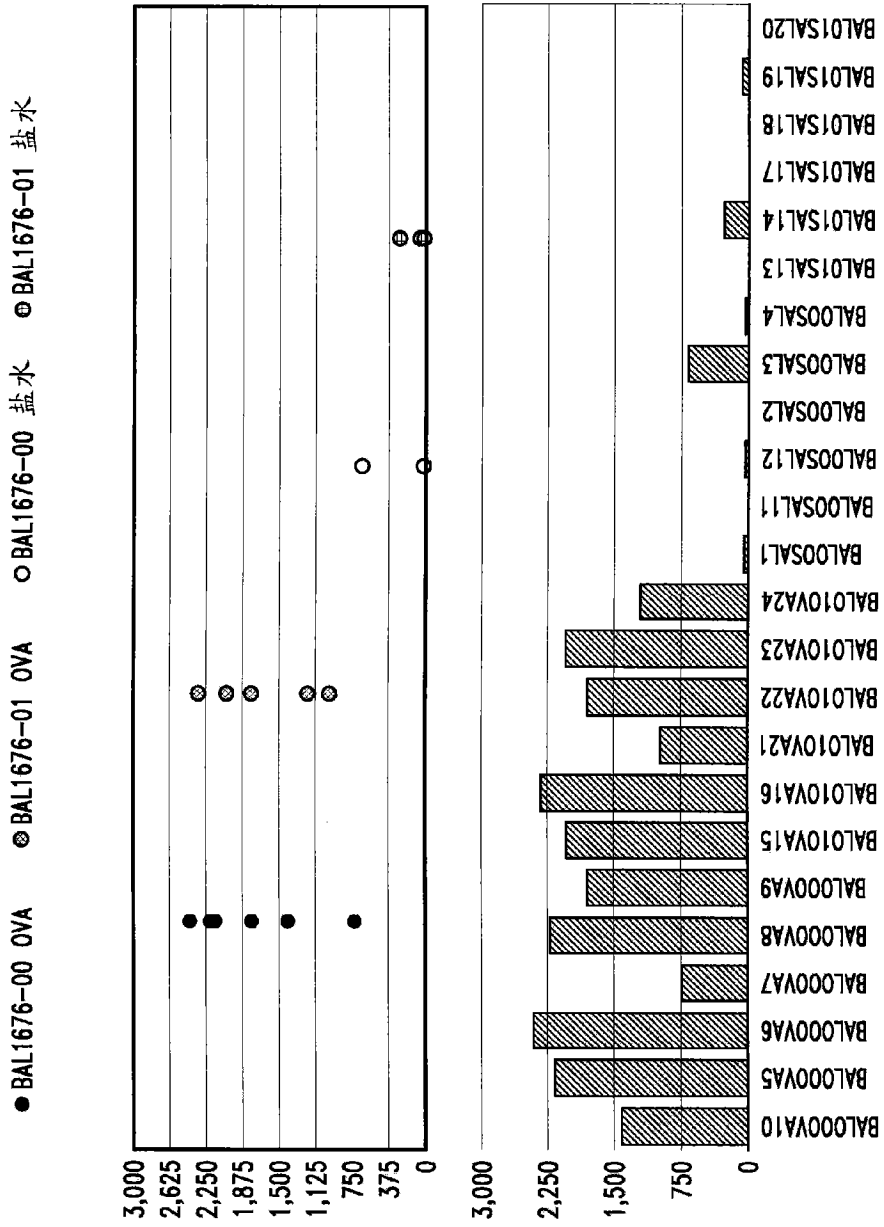


图 67

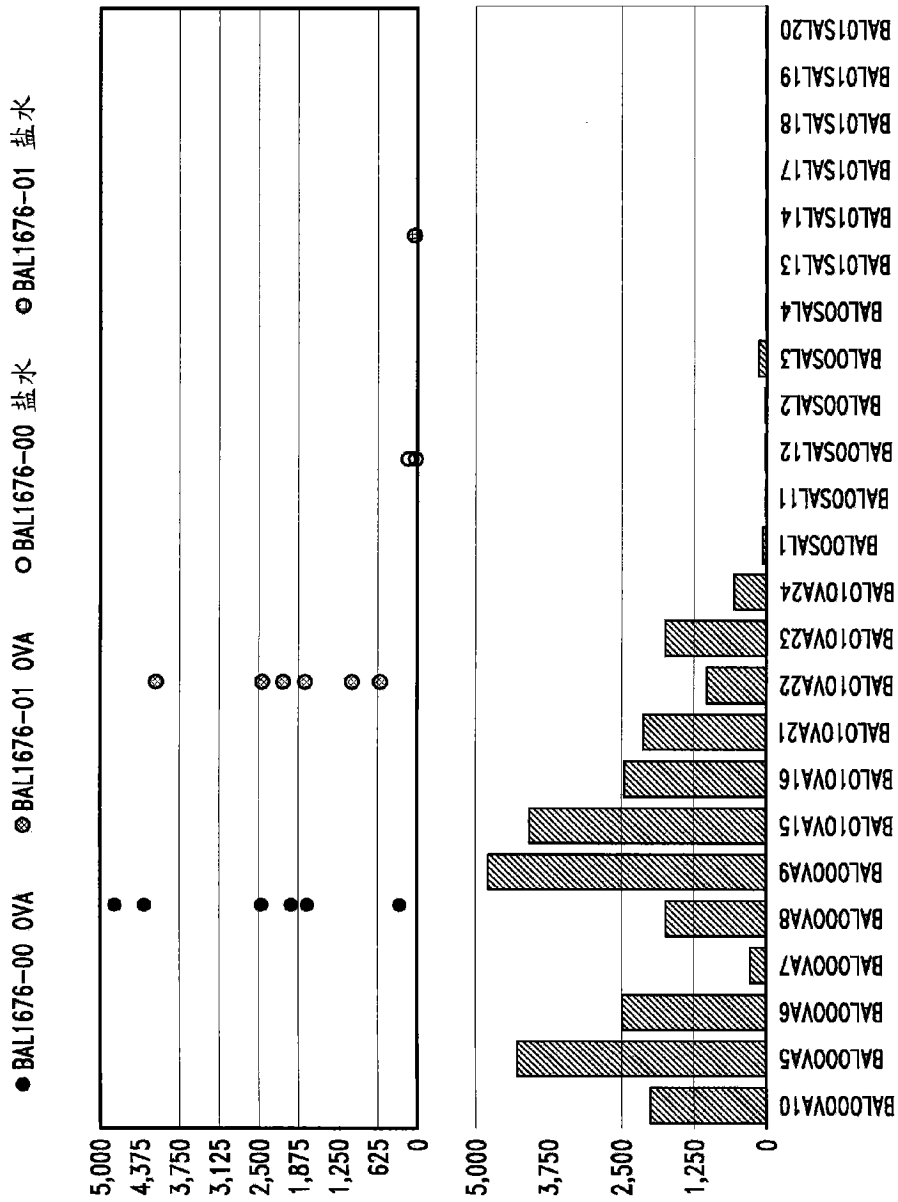


图 68

添加 除去 检测 步骤

传感器板

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

样品板

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
B	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
C	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
D	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
E	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
F	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
G	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
H	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

样品: A12

步骤 数据 设置

数据名	检测时间	流速	类型
Def Assoc.	900	1000	Assoc.
Def Dissoc.	900	1000	Dissoc.
Def 基线	No Fl...	0	基线
Def 上载	No Flow	0	上载
Def 激活	600	1000	激活
Def 淬灭	600	1000	淬灭
Def 再生	30	1000	再生
基线 1	30	1000	基线
上载	400	1000	上载
基线 2	60	1000	基线
缓激肽	600	1000	Assoc.
解离	900	1000	Dissoc.

检测 步骤 列表

检测	传感器	样品	步骤数据
1	Col 1	Col 1	Def 再生
	Col 1	Col 1	基线 1
	Col 1	Col 2	上载
	Col 1	Col 3	基线 2
	Col 1	Col 4	缓激肽
	Col 1	Col 3	解离

样品板 设置

1: 盐水

2: 盐水中的受体B2 (50ug/mL)

3: A-D revsoline; E-H 盐水

4: A-D 在revsoline中的缓激肽1.25mM, 125uM 12.5uM

E-H 在盐水中的缓激肽1.25mM, 125uM, 12.5uM

添加 除去 时间 in (sec), 流速 in (rpm)

图 69

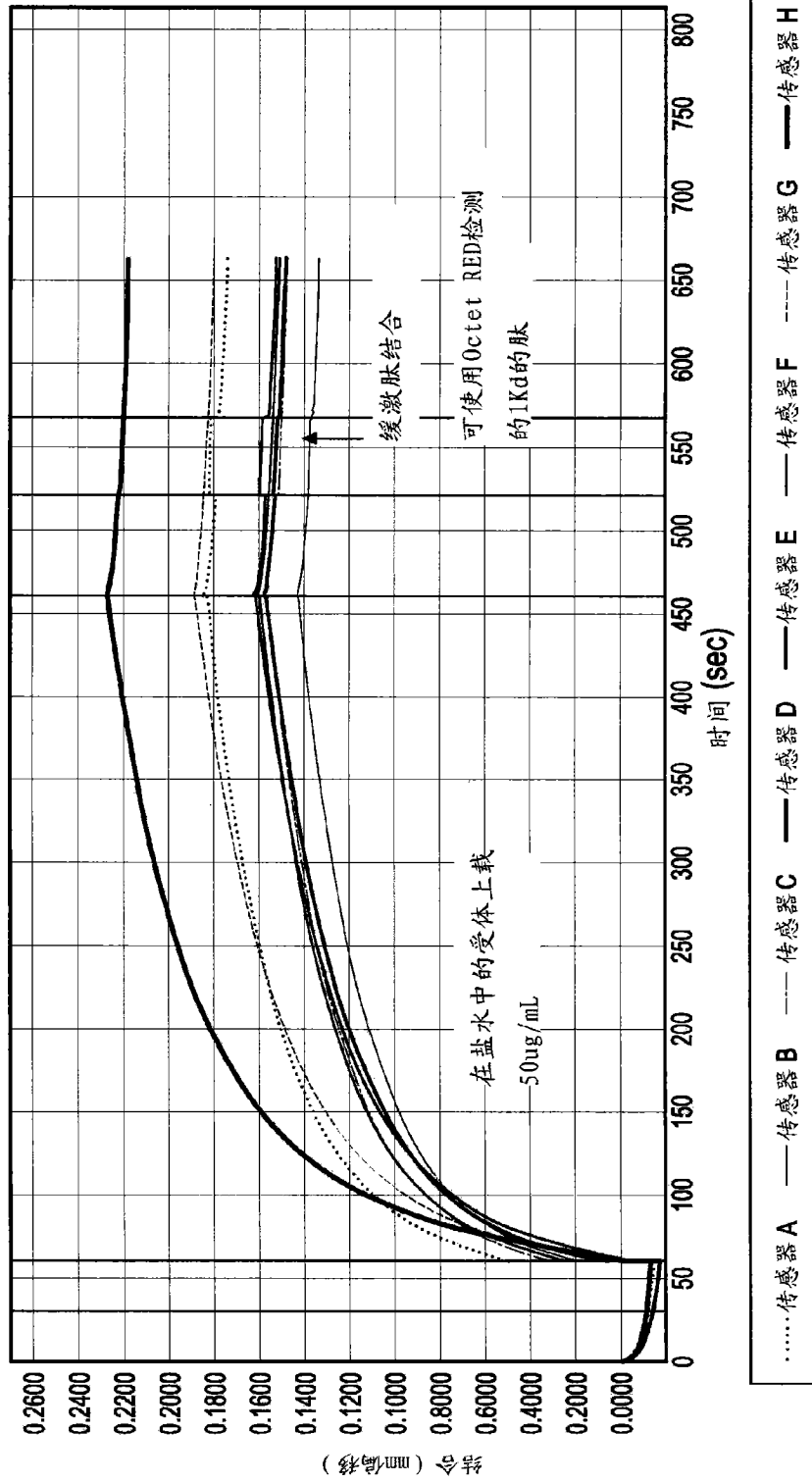


图 70

添加 除去 检测 步骤

传感器板

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

样品板

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
B	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
C	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
D	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
E	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
F	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
G	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
H	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

步骤 数据 设置

数据名	检测时间	流速	类型
⊗ Def Assoc.	900	1000	Assoc.
⊗ Def Dissoc.	900	1000	Dissoc.
⊗ Def 基线 No Fl...	600	0	基线
⊗ Def 加载 No Flow	900	0	加载
⊗ Def 激活	600	1000	激活
⊗ Def 淬灭	600	1000	淬灭
⊗ Def Regeneration	30	1000	再生
⊗ 基线 1	30	1000	基线
⊗ 加载 2	400	1000	加载
⊗ 基线 2	60	1000	基线
⊗ 缓激肽	600	1000	Assoc.
⊗ 解离	600	1000	Dissoc.

检测 步骤 列表

检测 #	传感器	样品	步骤数据
1	⊗ Col 1	⊗ Col 1	⊗ 基线
	⊗ Col 1	⊗ Col 2	⊗ 承载器
	⊗ Col 1	⊗ Col 3	⊗ 基线 2
	⊗ Col 1	⊗ Col 4	⊗ B2
	⊗ Col 1	⊗ Col 3	⊗ 解离

样品板 设置

栏 1: 盐水
 栏 2: 盐水中的受体B2 (50ug/mL)
 栏 3: A-D rev 盐水; E-H 盐水
 栏 4: A-D 在 rev 盐水中的缓激肽 12.5uM, 1.25uM 12.5nM
 E-H 在盐水中的缓激肽 12.5uM, 1.25uM 12.5nM

添加 除去 时间 in (sec), 流速 in (rpm)

图 71

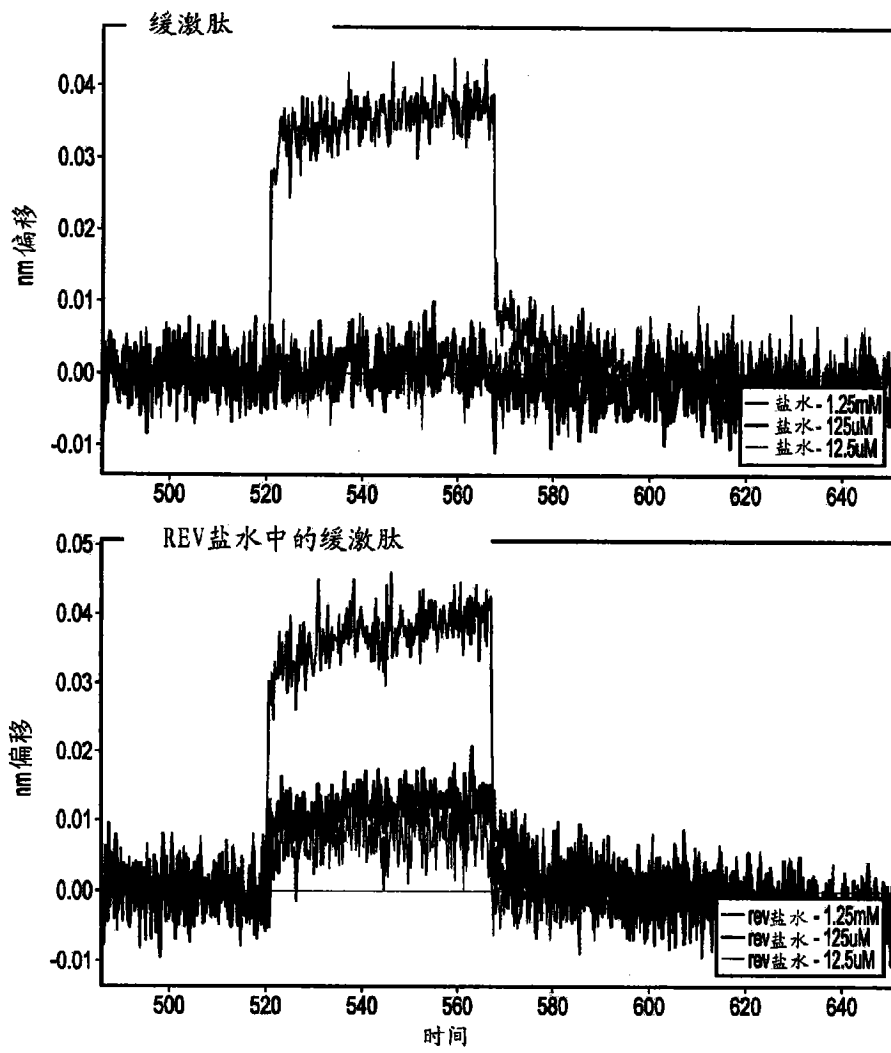


图 72

添加 除去 检测 步骤

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C	D	E	F	G	H				

传感器板

样品板

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C	D	E	F	G	H				

样品: A12

步骤 数据 设置

数据名	检测时间	流速	类型
<input checked="" type="checkbox"/> Def Assoc.	900	1000	Assoc.
<input type="checkbox"/> Def Dissoc.	900	1000	Dissoc.
<input type="checkbox"/> Def 基线	No Fl...	0	基线
<input type="checkbox"/> Def 上载	No Flow	0	上载
<input type="checkbox"/> Def 激活	600	1000	激活
<input type="checkbox"/> Def 淬灭	600	1000	淬灭
<input type="checkbox"/> Def 再生	30	1000	再生
<input type="checkbox"/> 基线 1	30	1000	基线
<input type="checkbox"/> 上载 2	400	1000	上载
<input type="checkbox"/> 基线 2	60	1000	基线
<input type="checkbox"/> 缓激肽	600	1000	Assoc.
<input type="checkbox"/> 解离	900	1000	Dissoc.

检测 步骤 列表

检测 #	传感器	样品	步骤数据
1	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 1	<input type="checkbox"/> Def 再生
	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 1	<input type="checkbox"/> 基线 1
	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 2	<input type="checkbox"/> 上载
	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 3	<input type="checkbox"/> 基线 2
	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 4	<input type="checkbox"/> 缓激肽
	<input type="checkbox"/> Col 1	<input checked="" type="checkbox"/> Col 3	<input type="checkbox"/> 解离

样品板 设置

1: 盐水
 2: 盐水中的受体B2 (50ug/mL)
 3: A-D rev 盐水; E-H 盐水
 4: A-D 在 rev 盐水中的缓激肽 1.25mM, 625uM 313uM 156uM
 E-H 在盐水中的缓激肽 1.25mM, 625uM 313uM 156uM

图 73

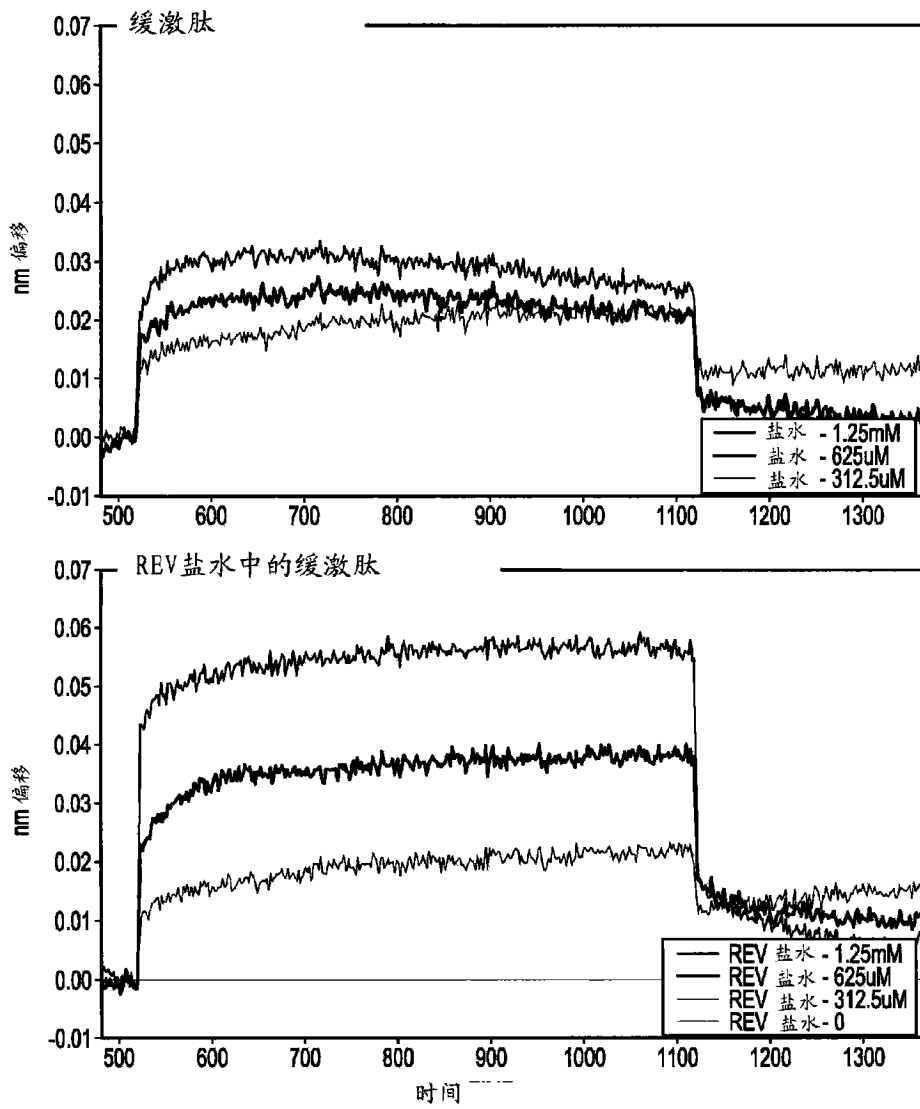


图 74

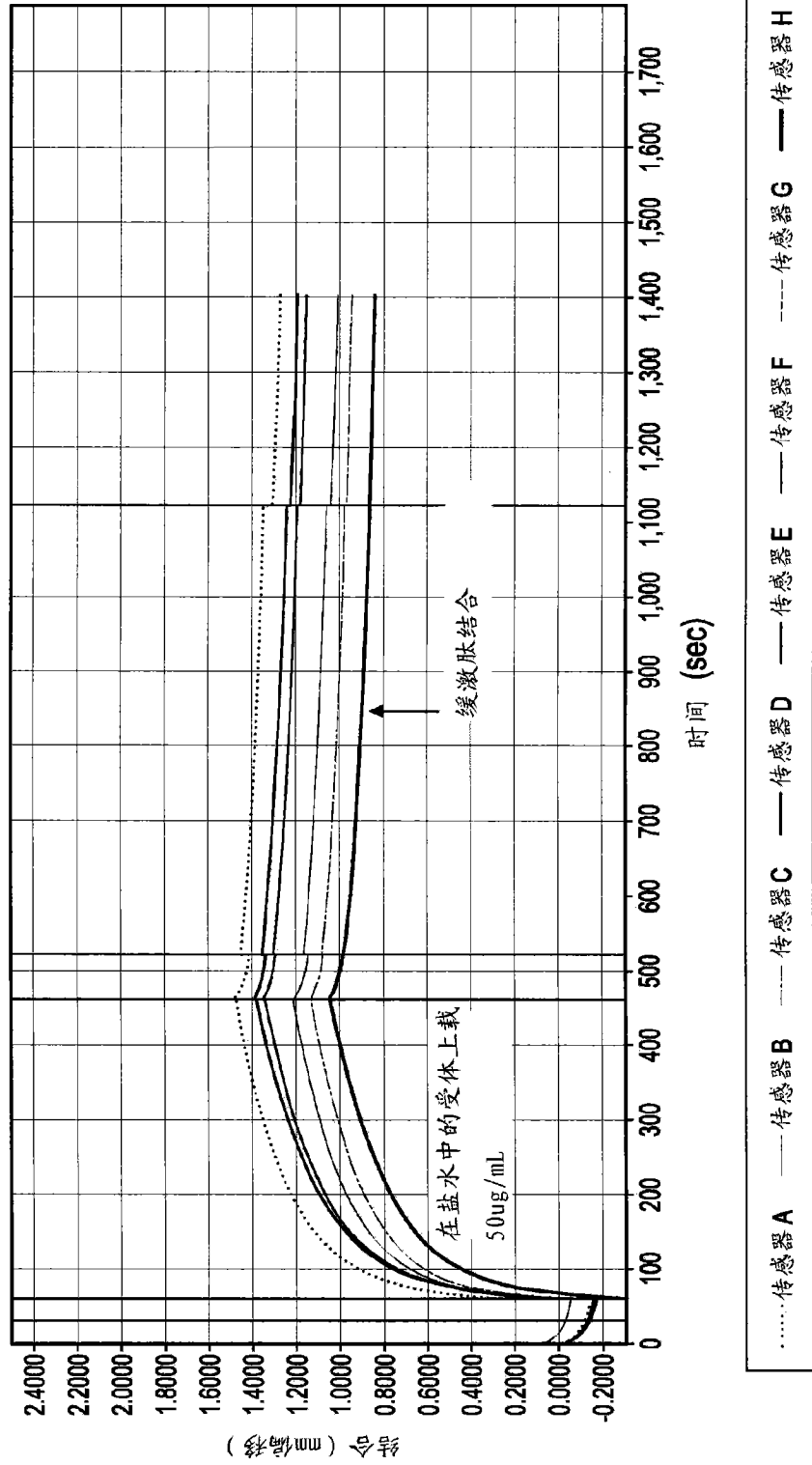


图 75

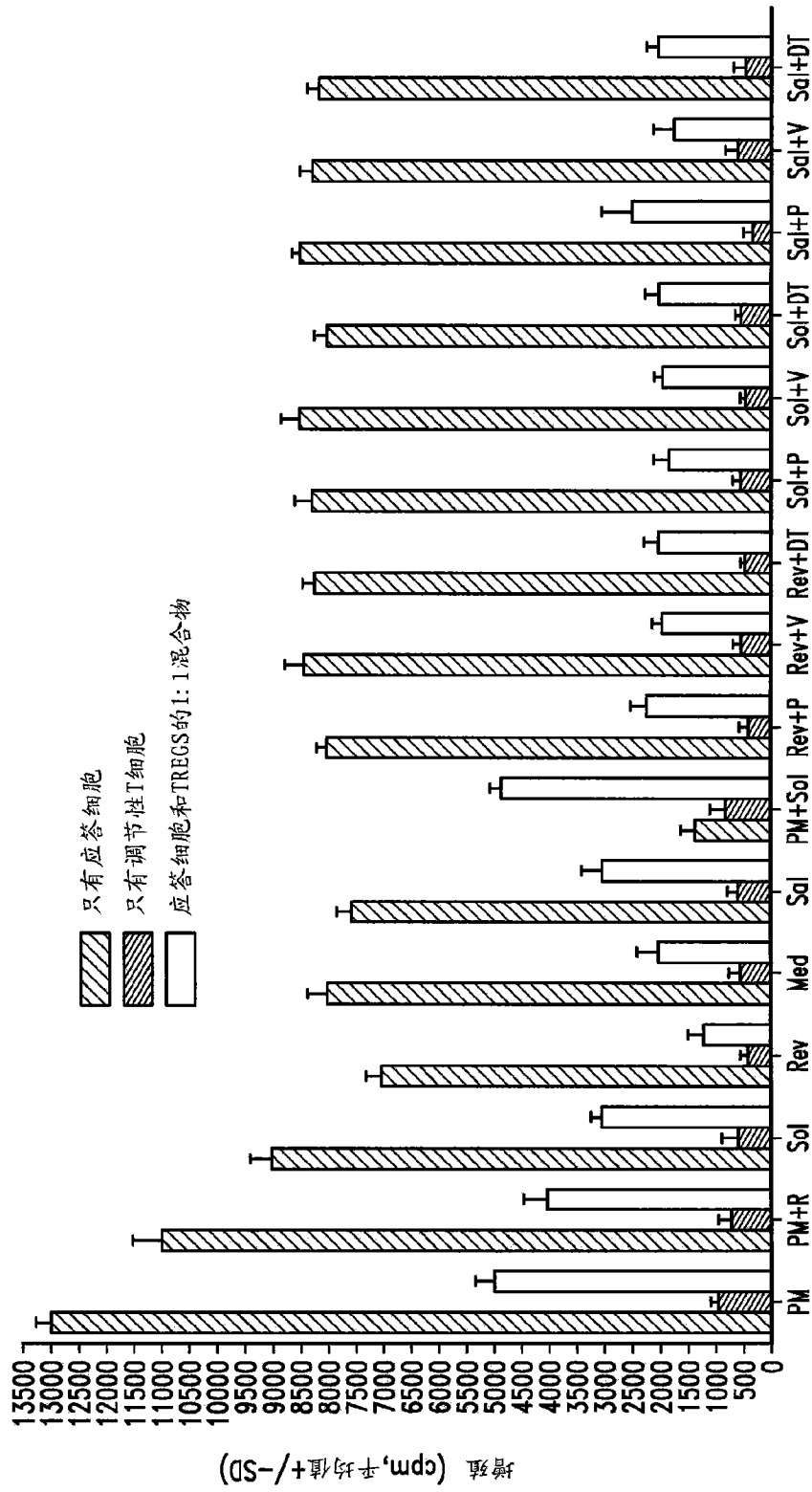


图 76

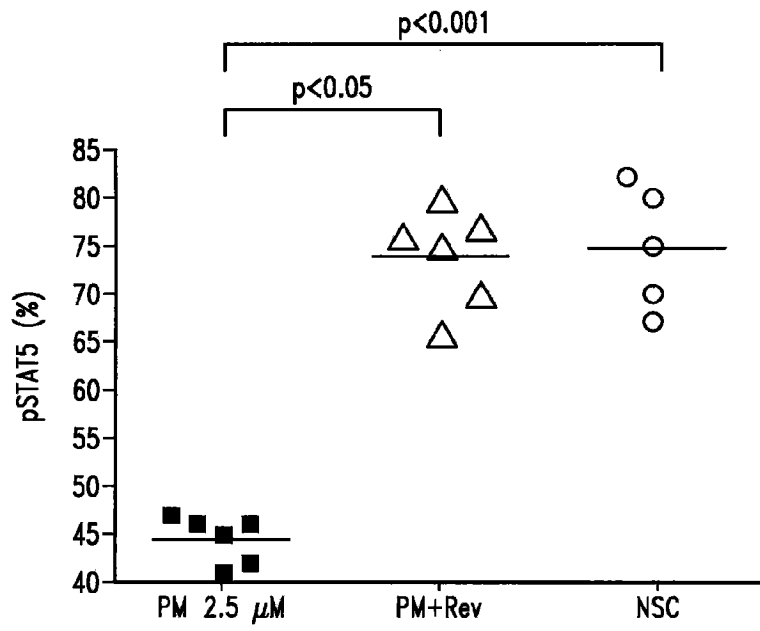


图 81

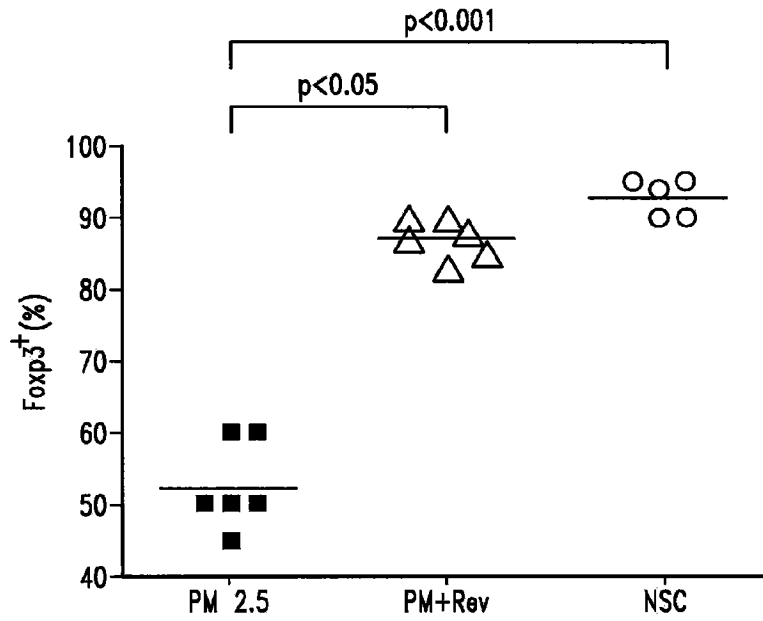


图 82

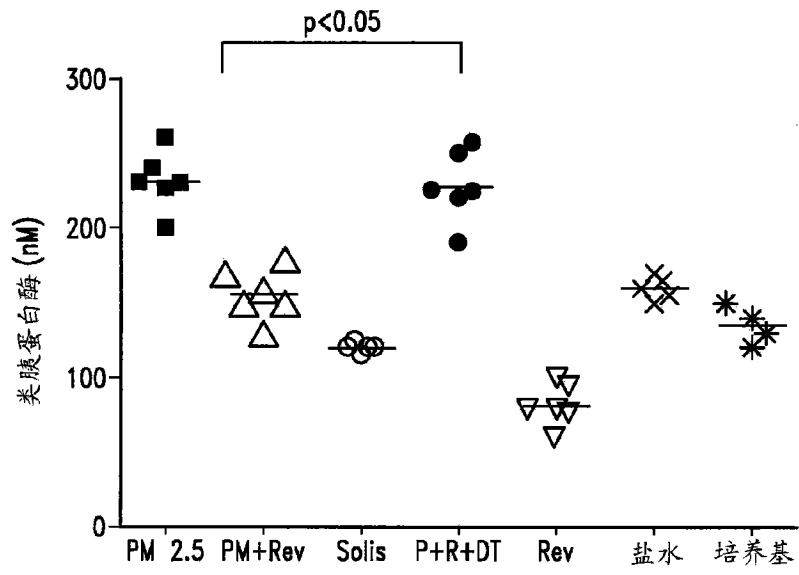


图 83

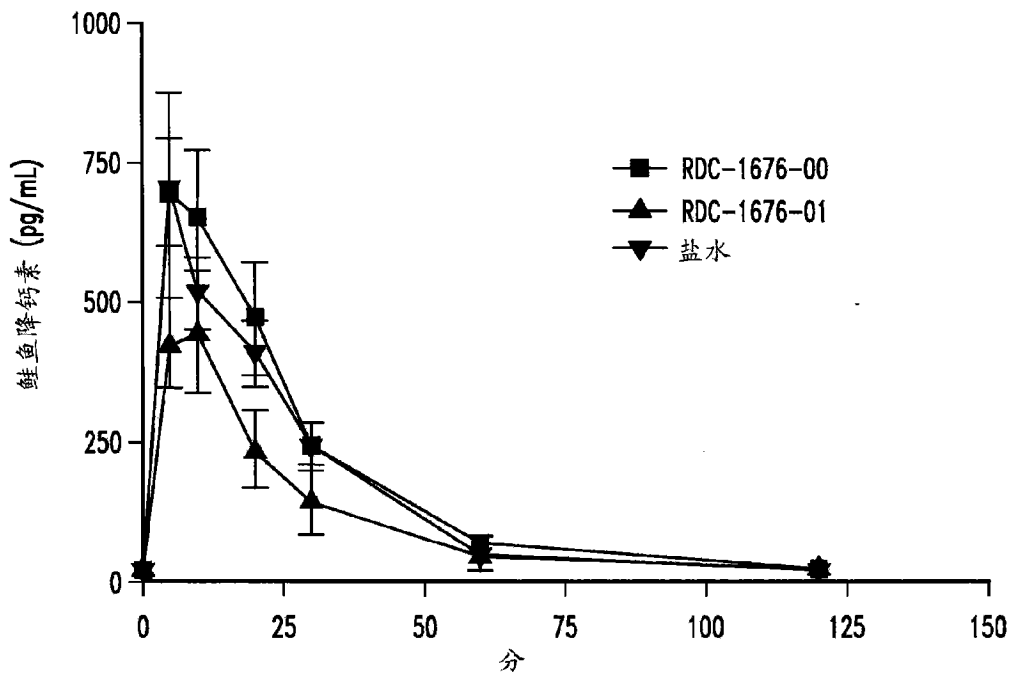


图 84

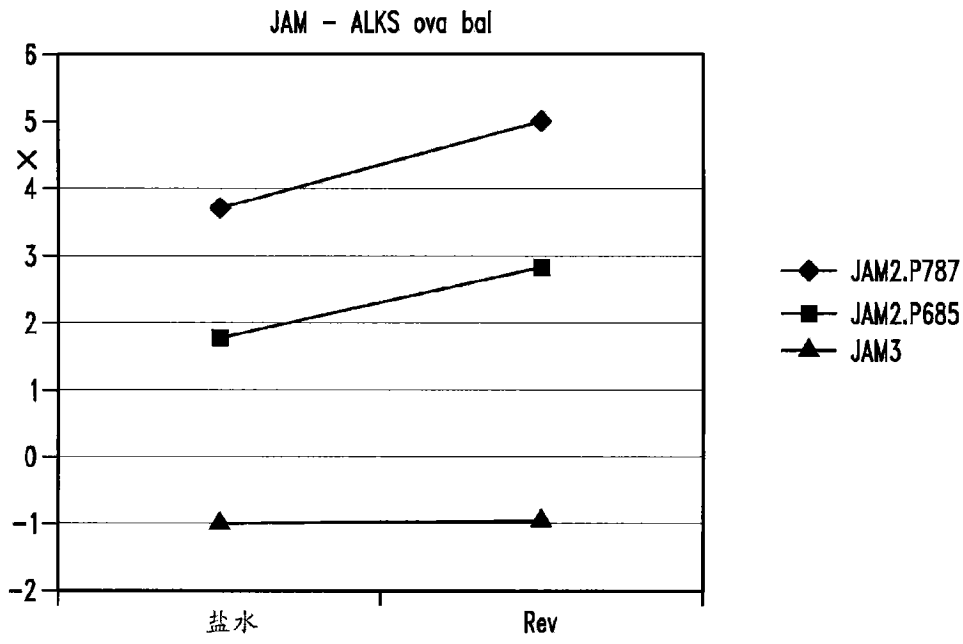


图 85

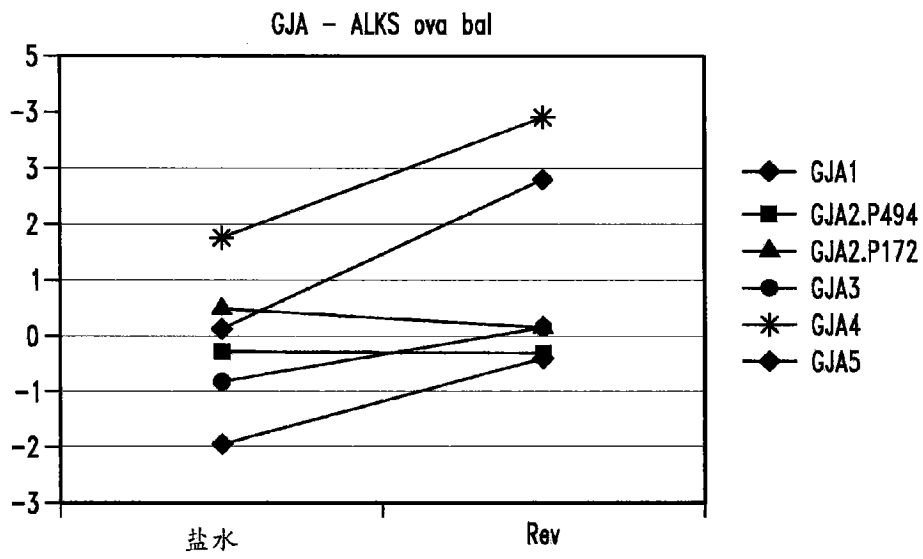


图 86

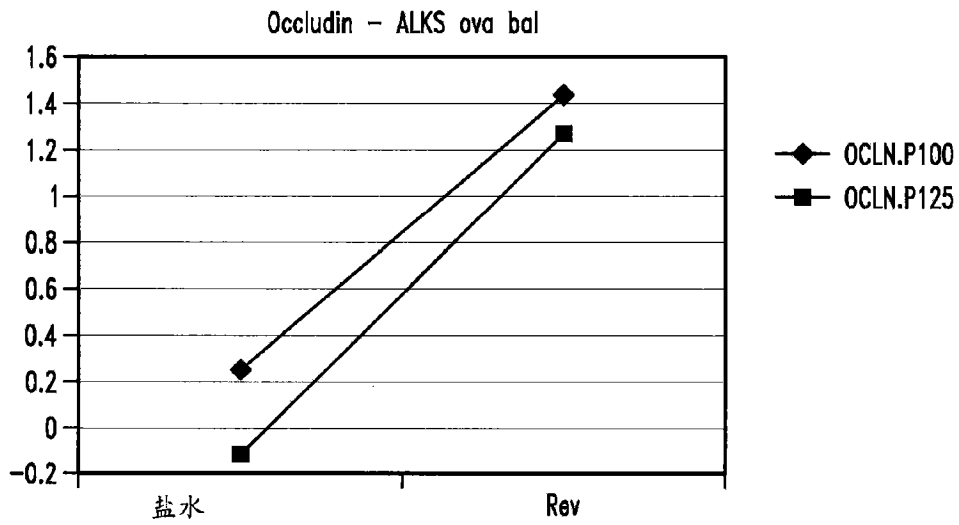


图 87

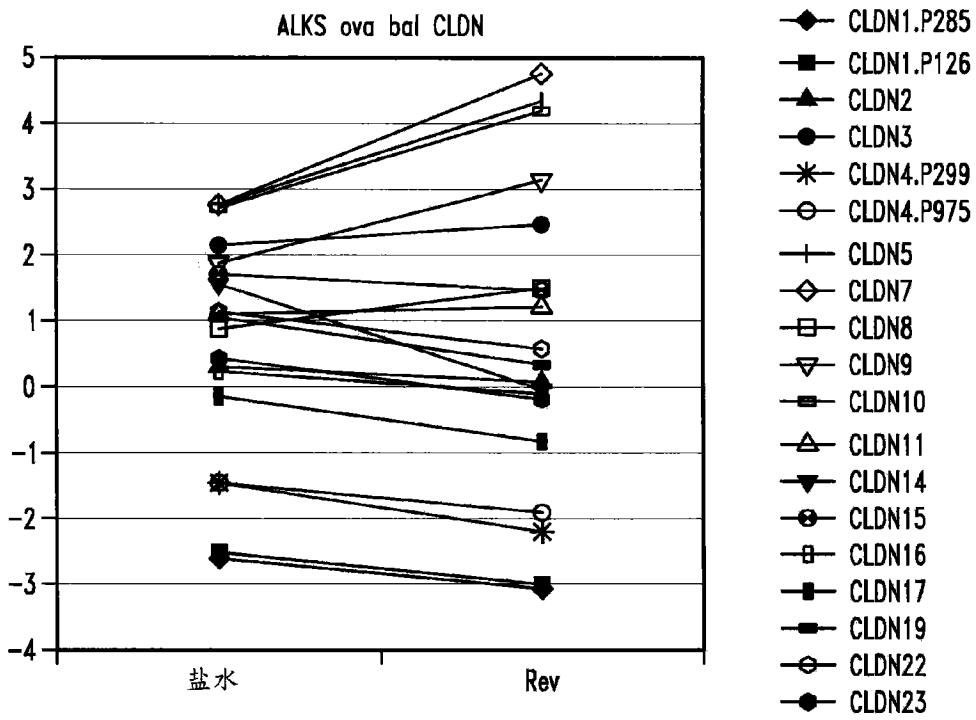


图 88

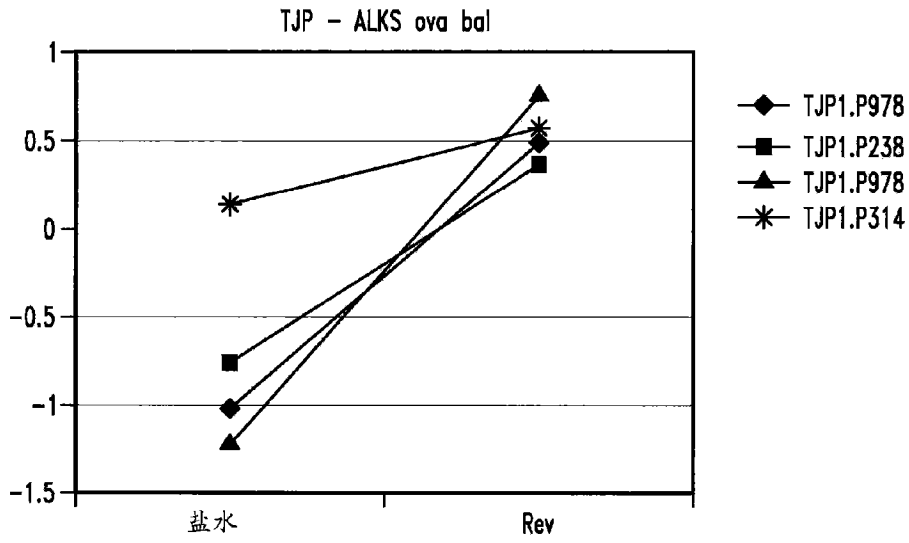


图 89

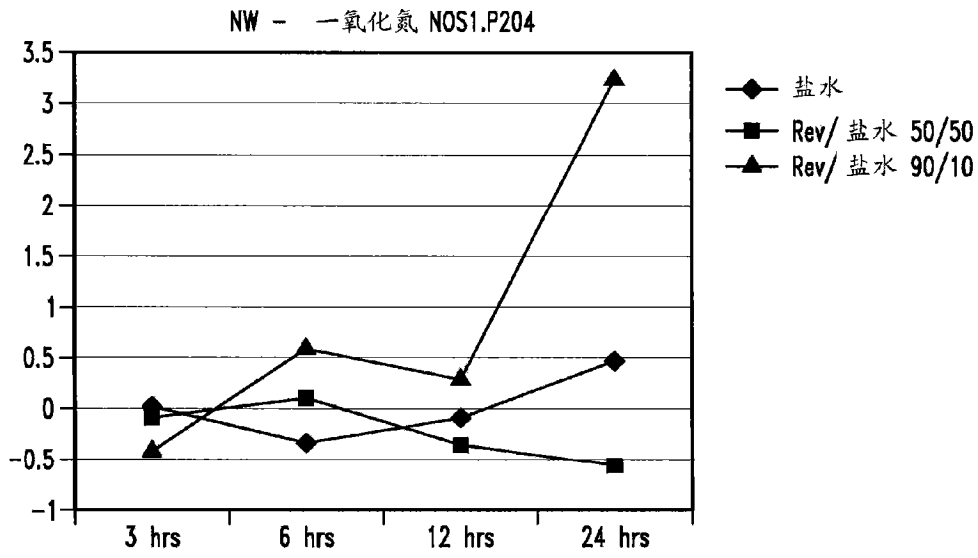


图 90

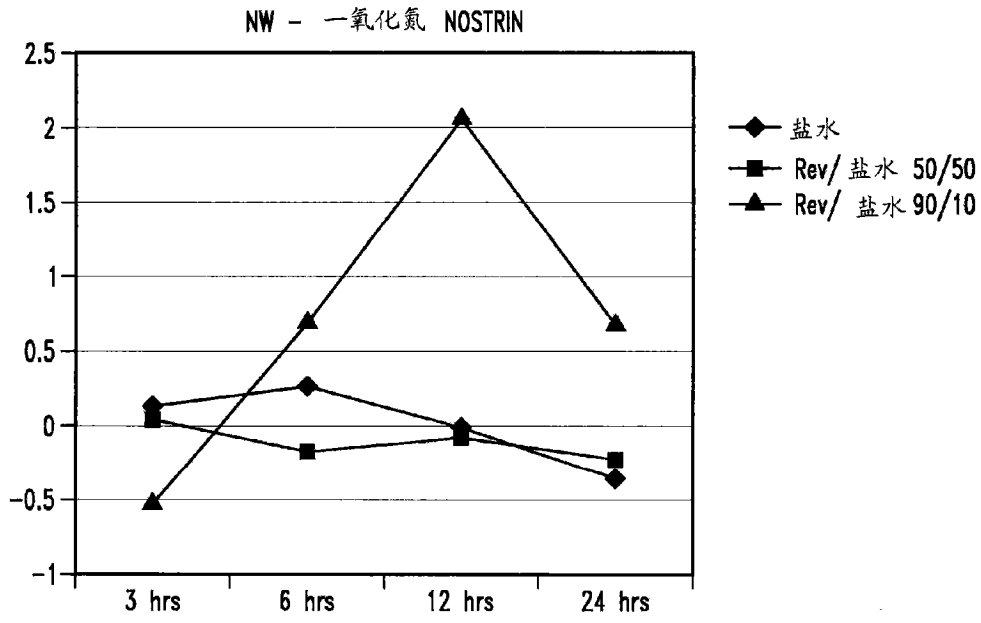


图 91

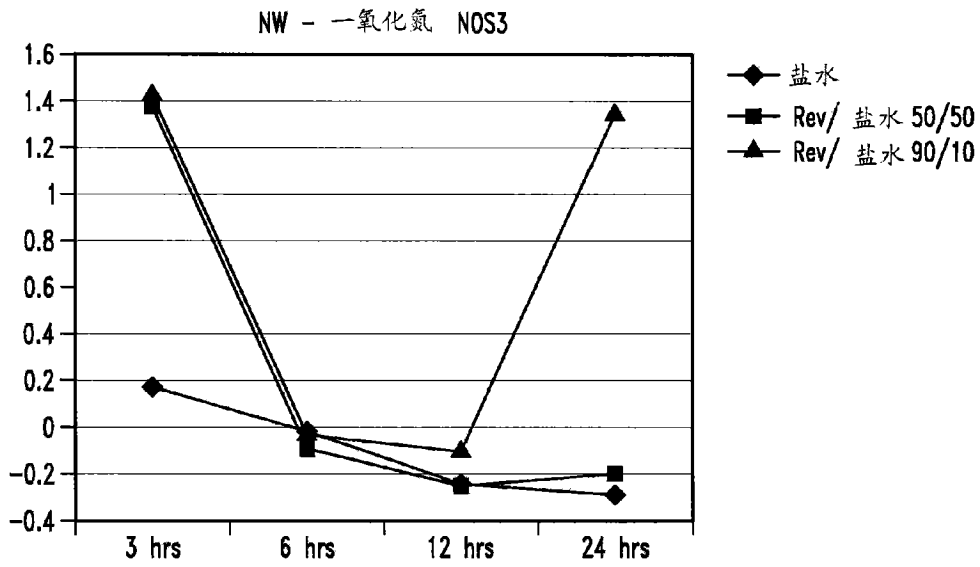


图 92

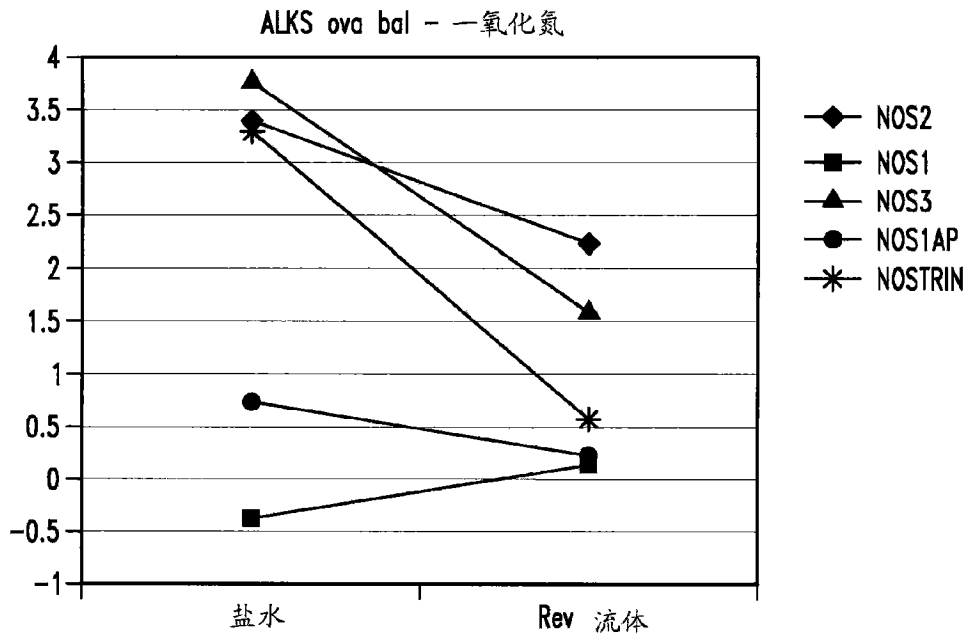


图 93

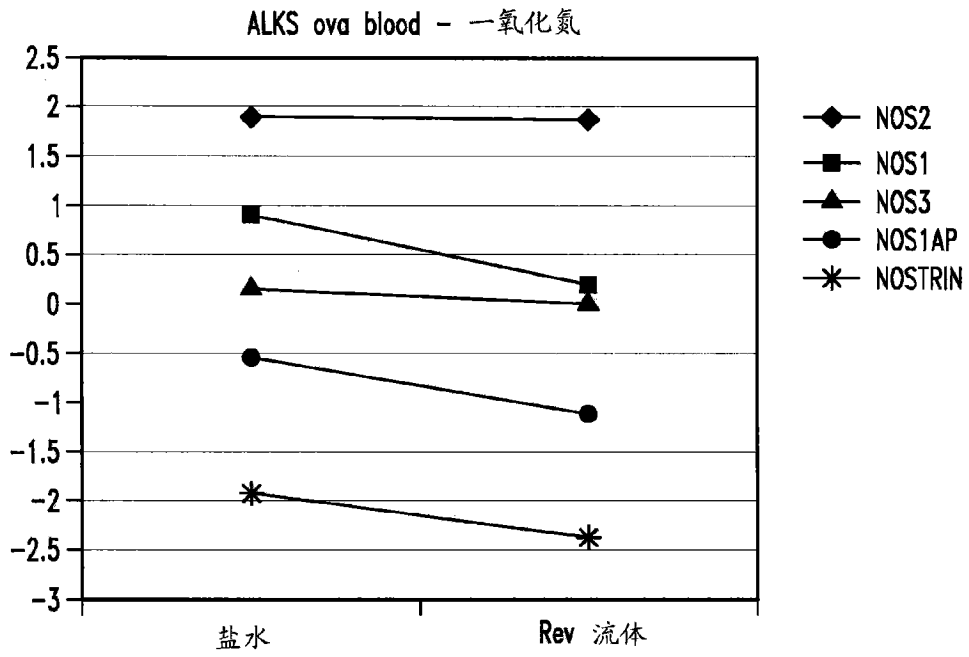


图 94

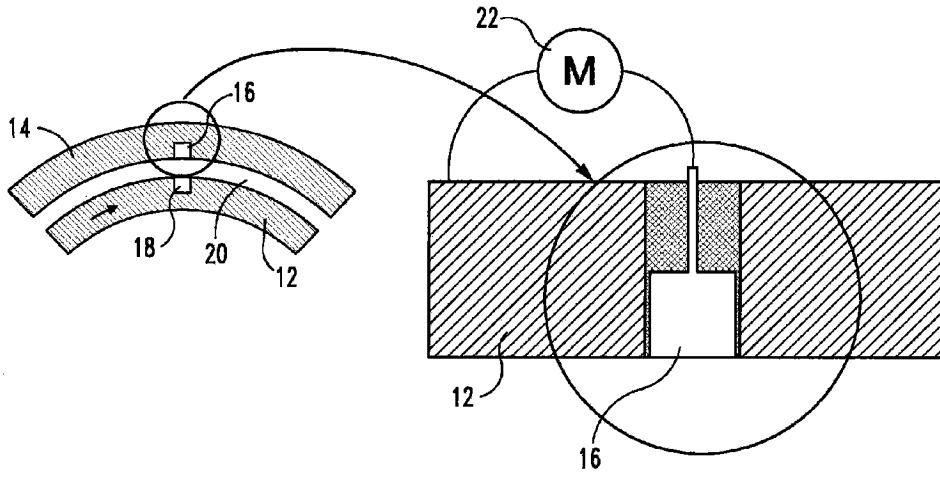


图 95

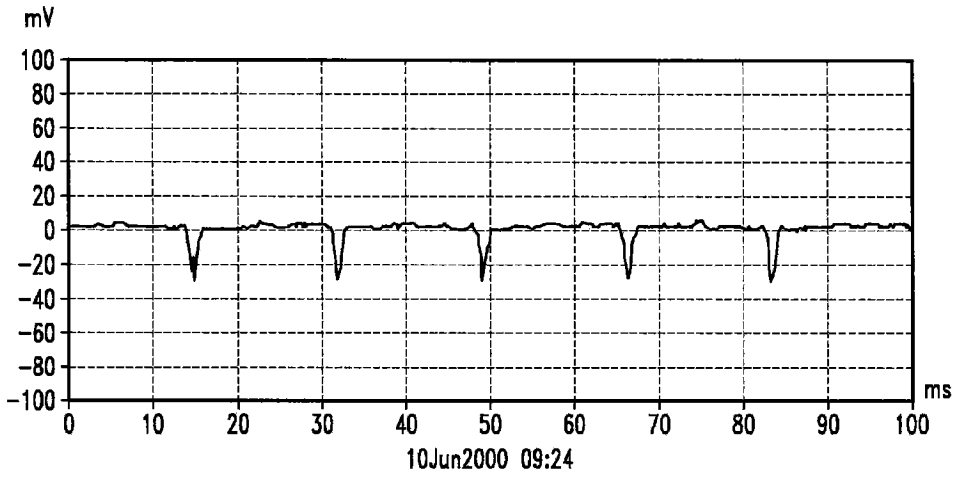


图 96

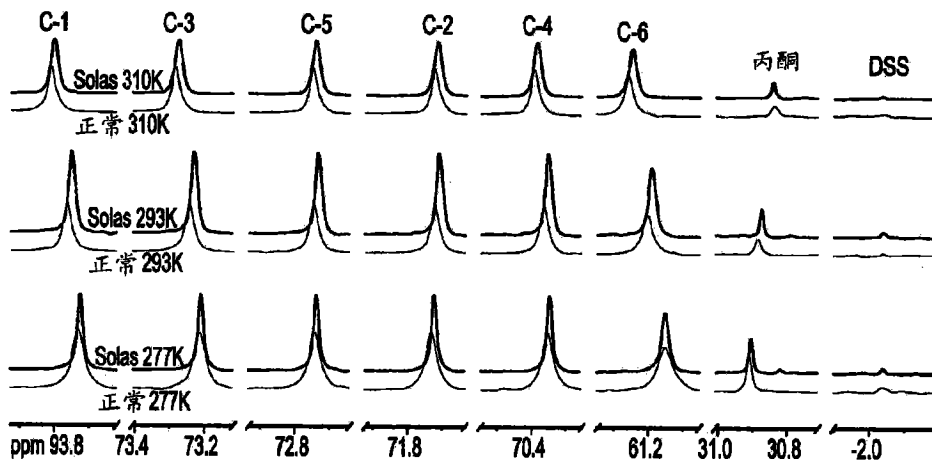


图 97A

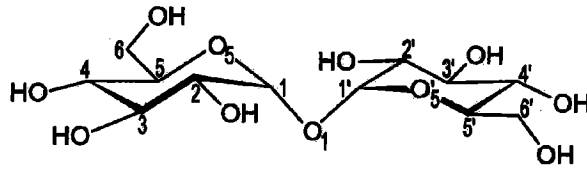


图 97B

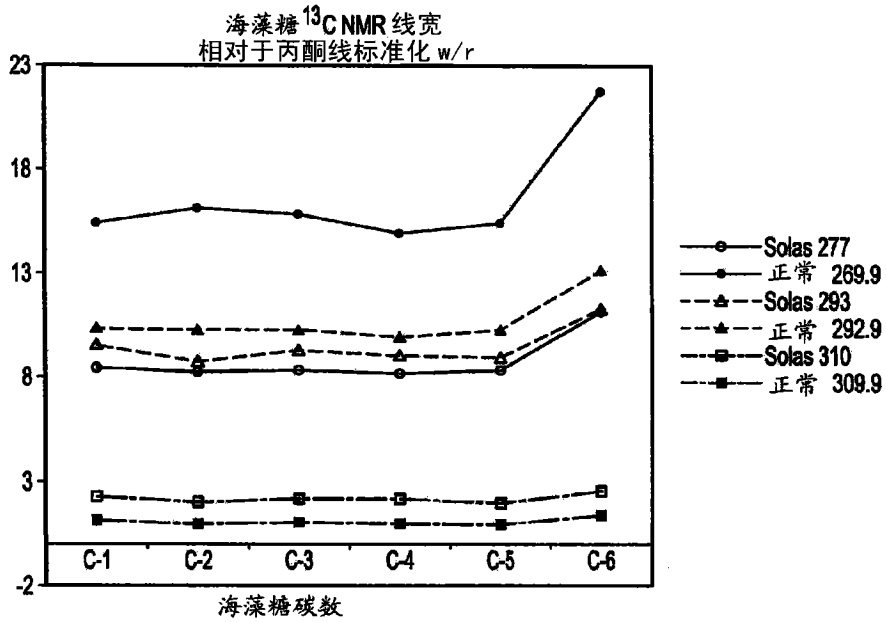


图 97C

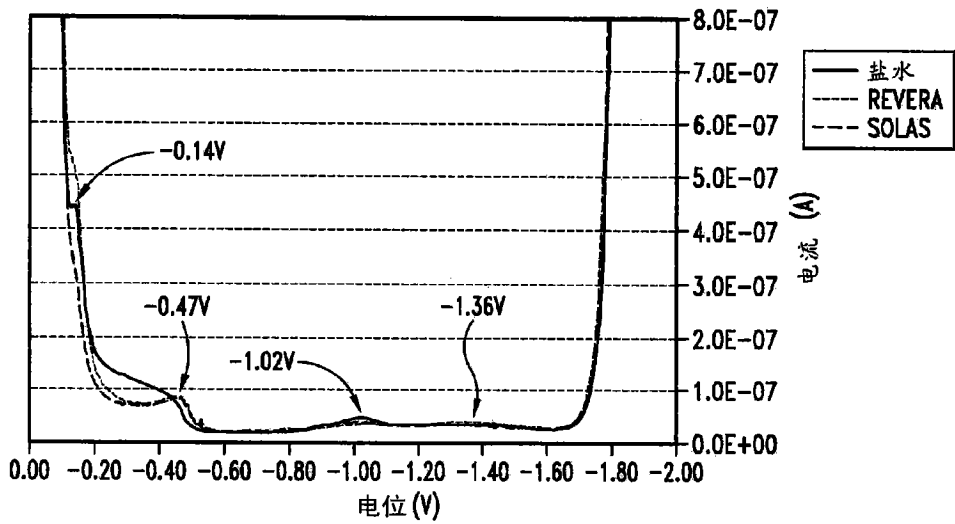


图 98

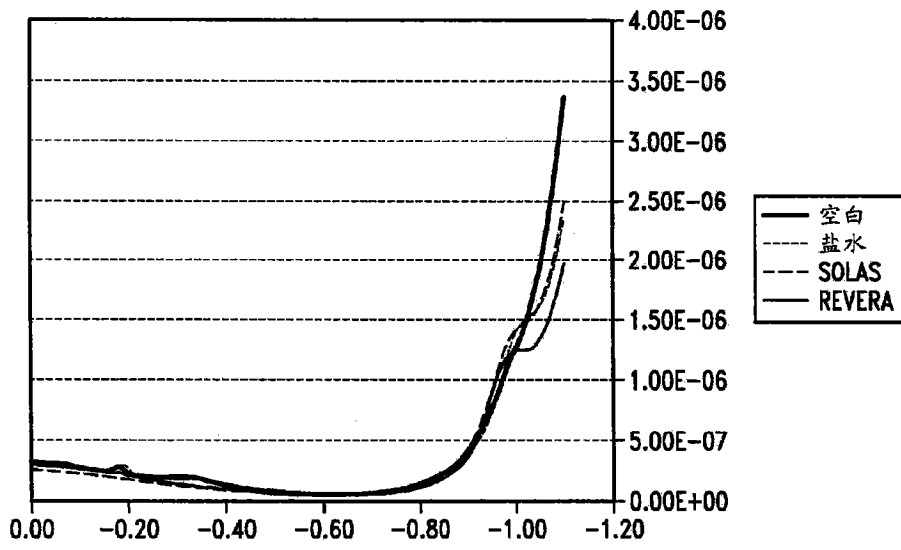


图 99

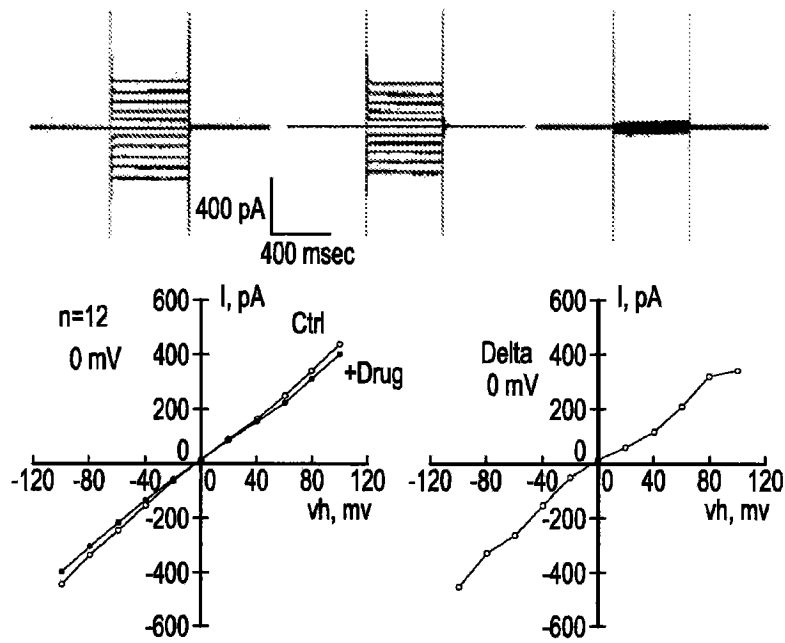


图 100

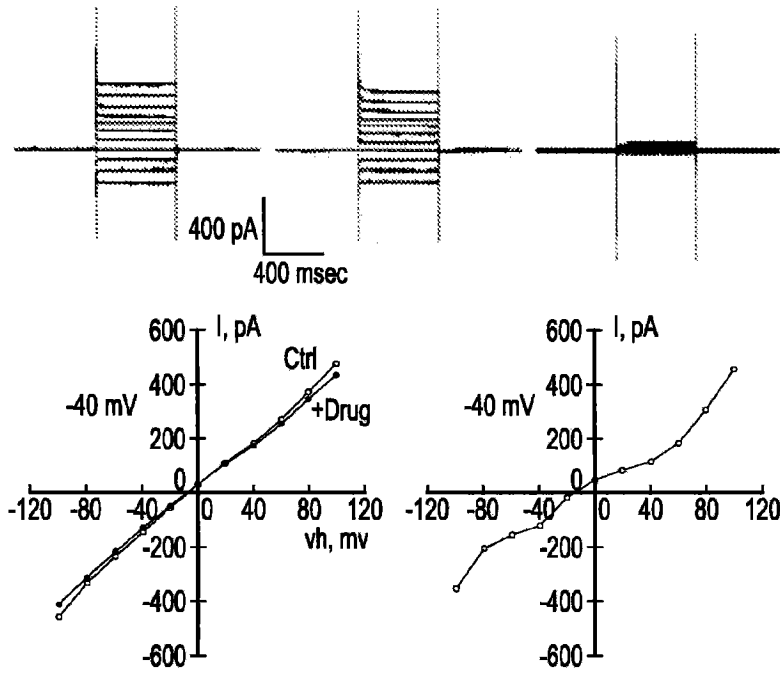


图 101

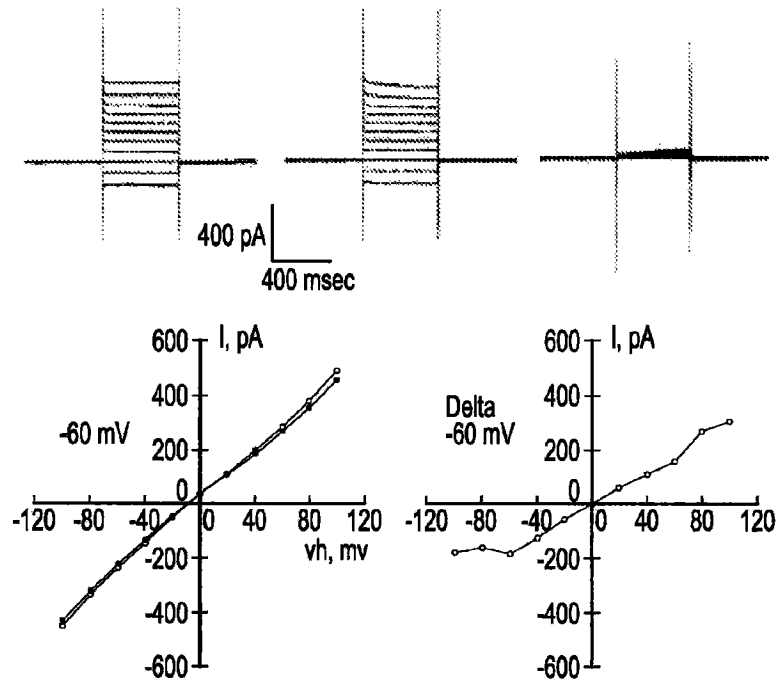


图 102

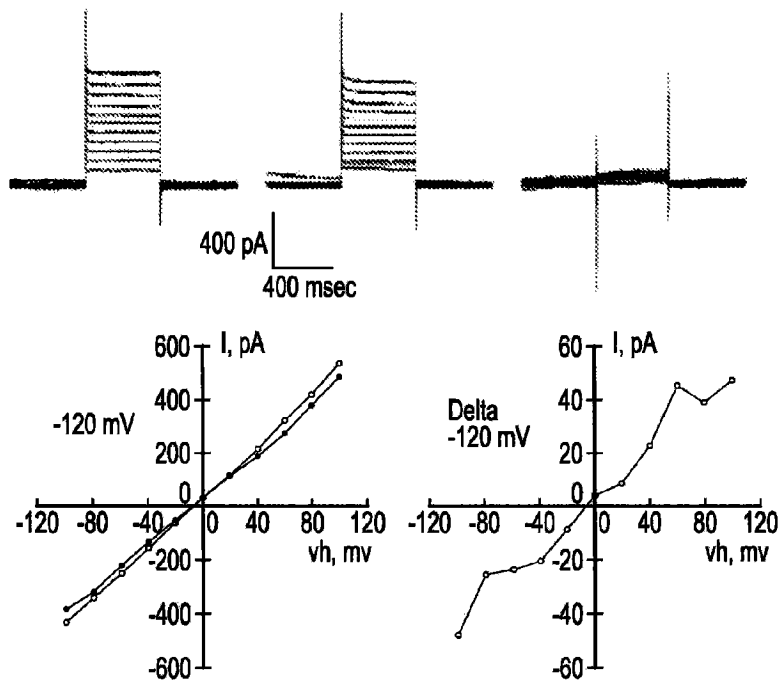


图 103

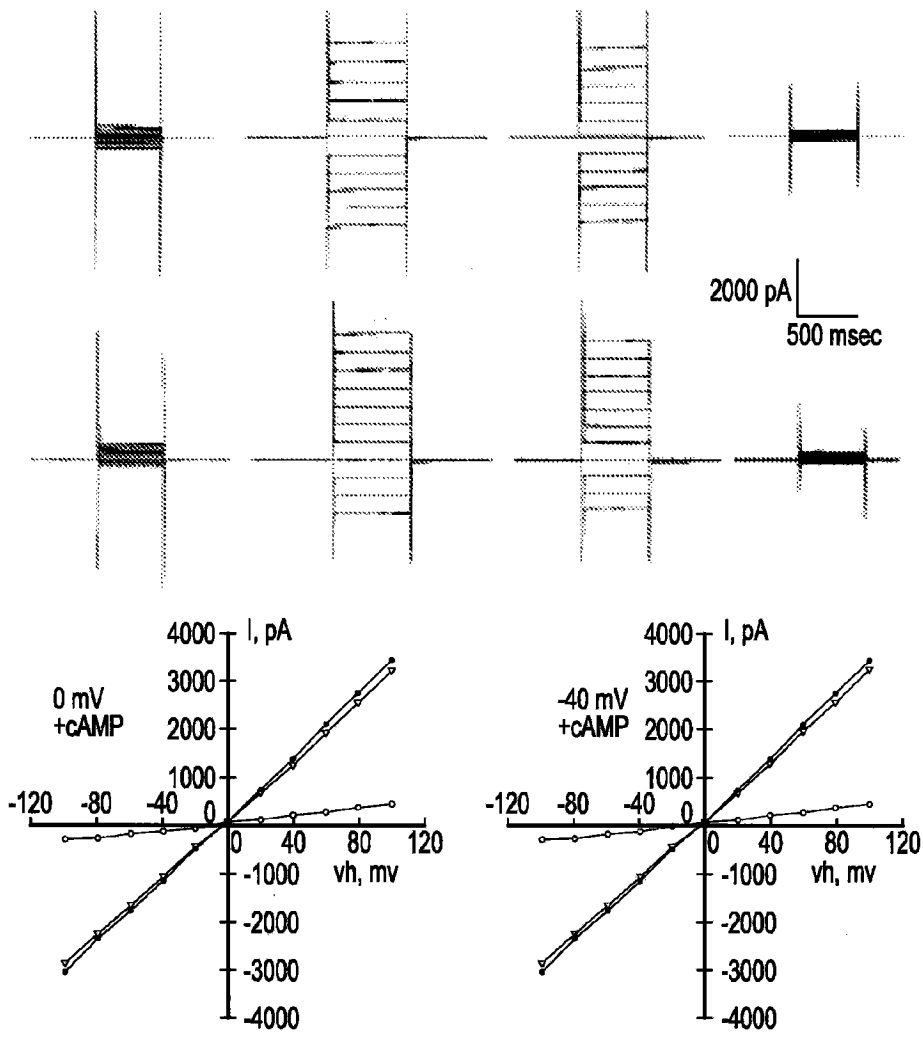


图 104

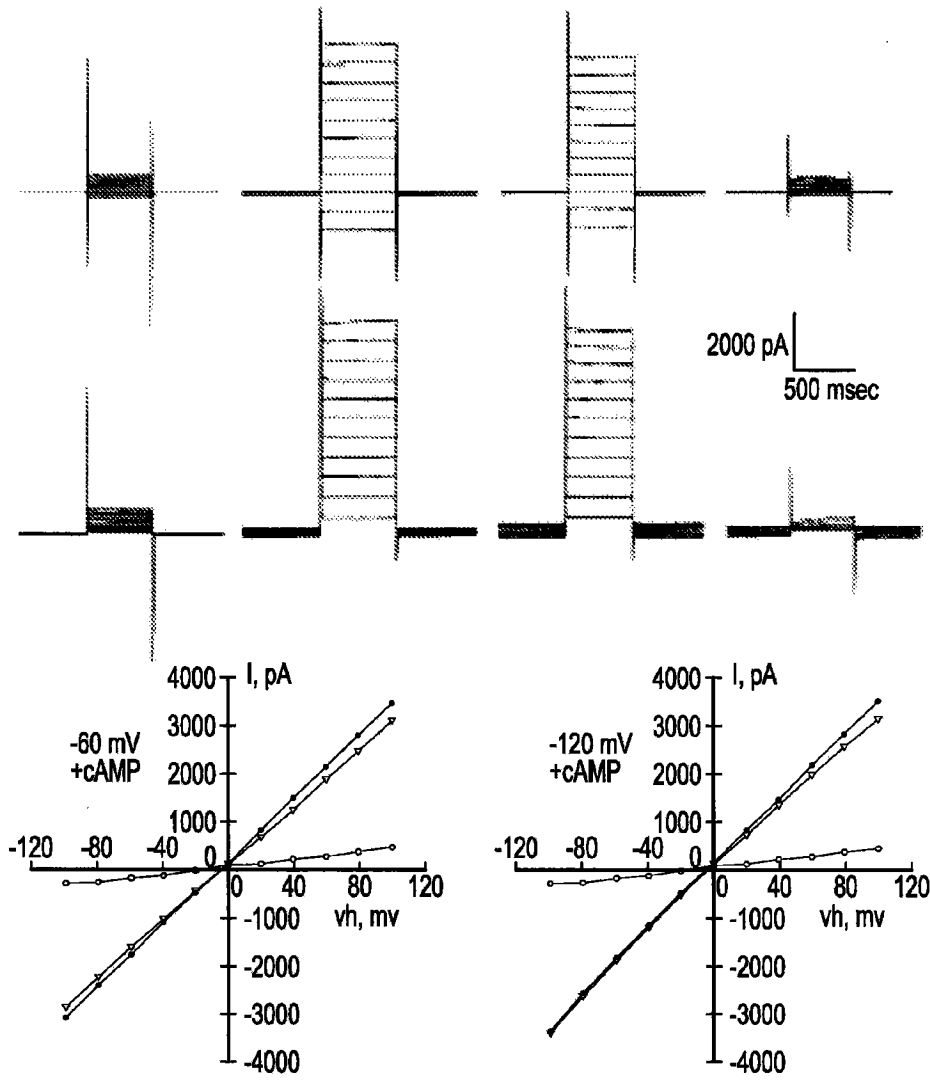


图 105

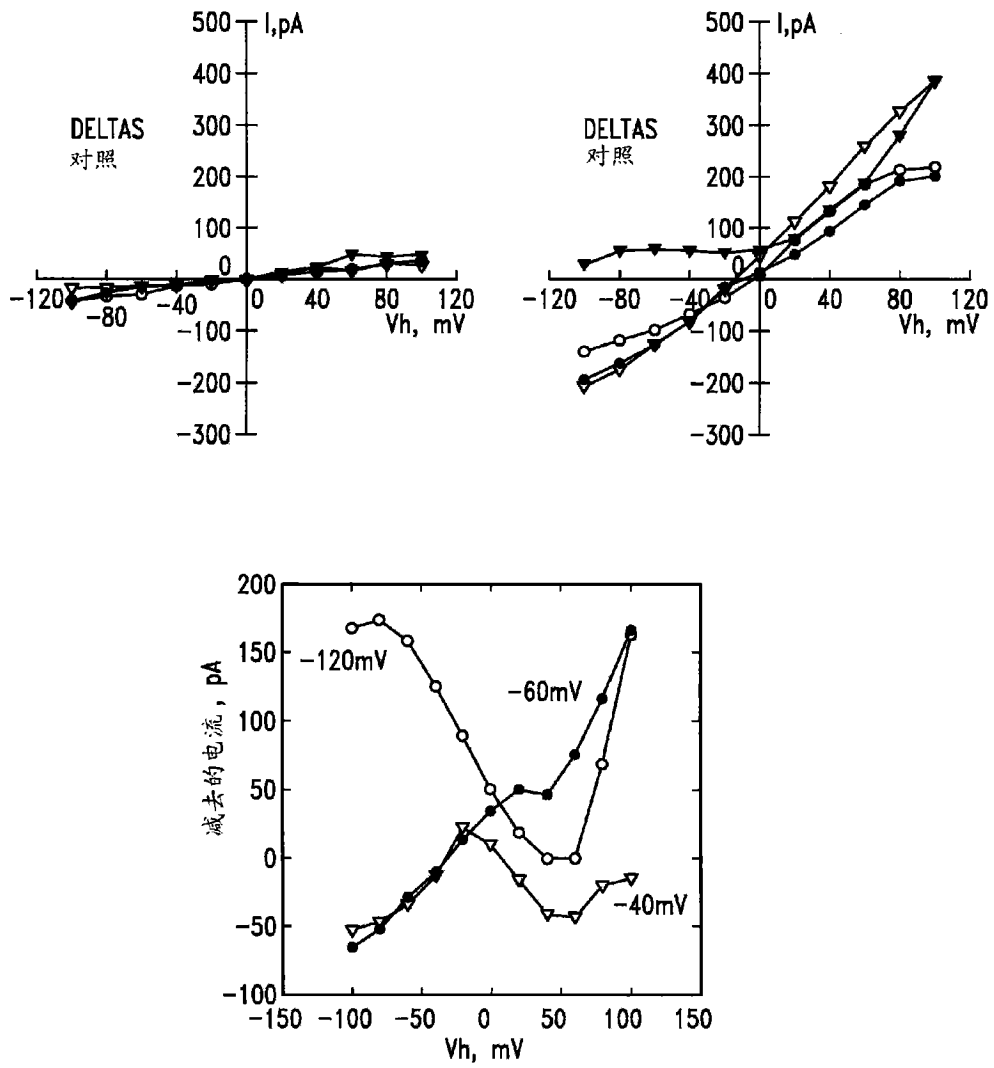


图 106

沙丁胺醇 = 0

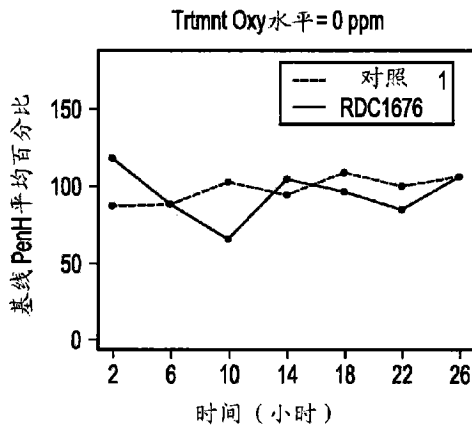


图 107A

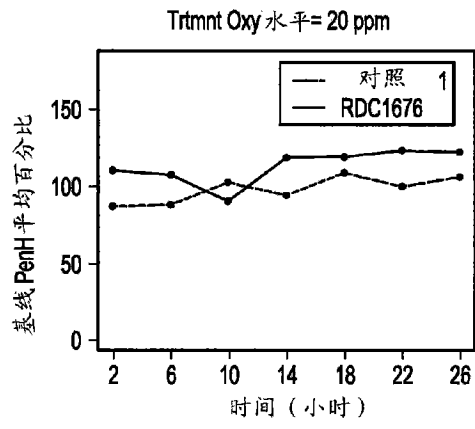


图 107B

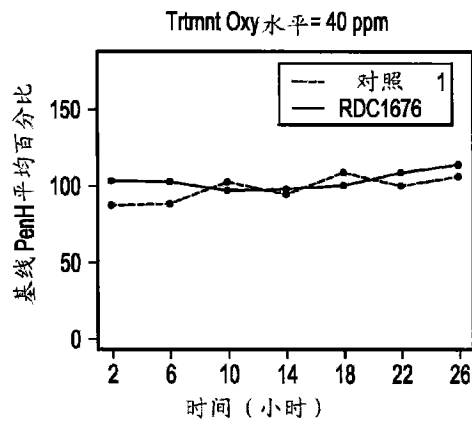


图 107C

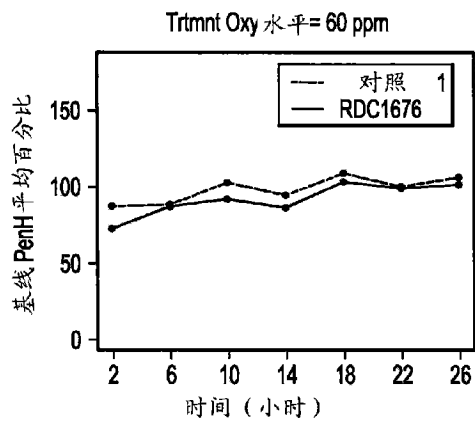


图 107D

沙丁胺醇 = 25

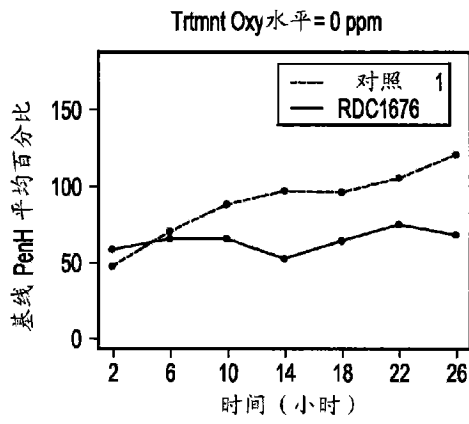


图 108A

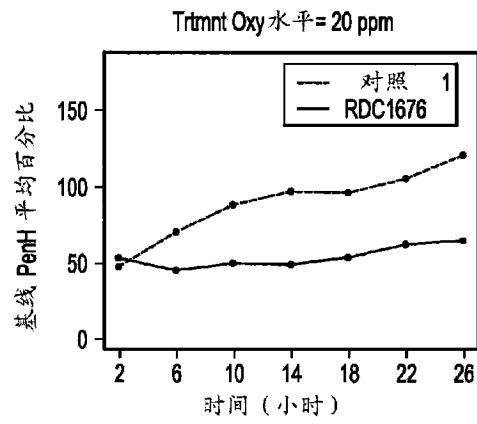


图 108B

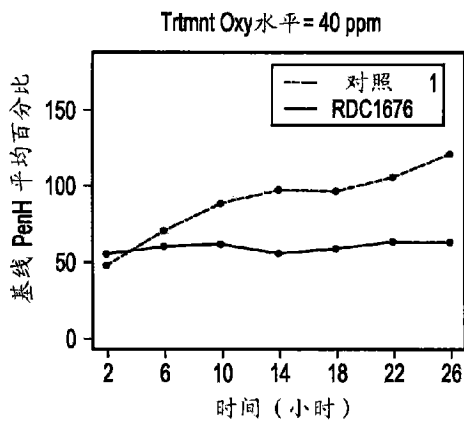


图 108C

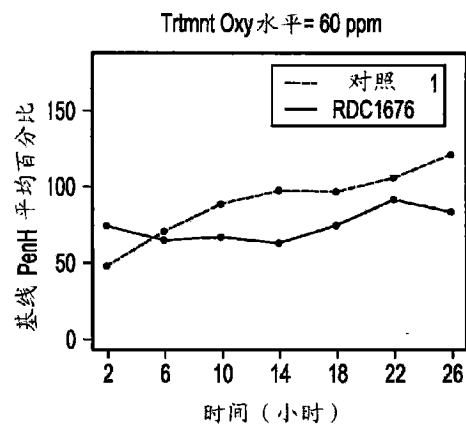


图 108D

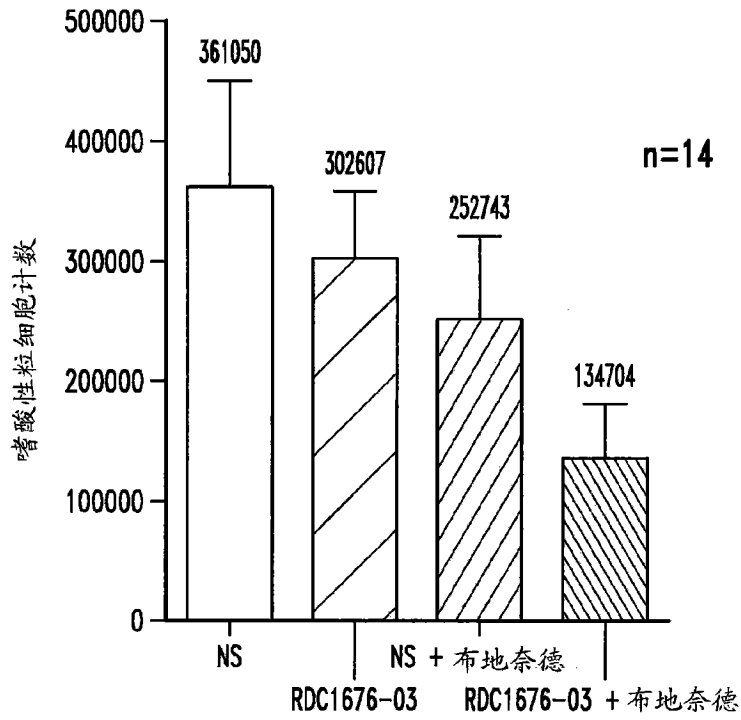


图 109

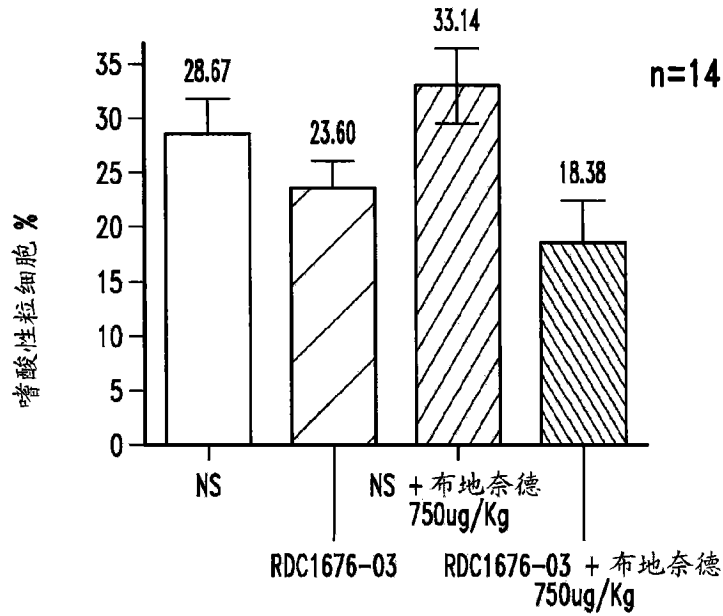


图 110

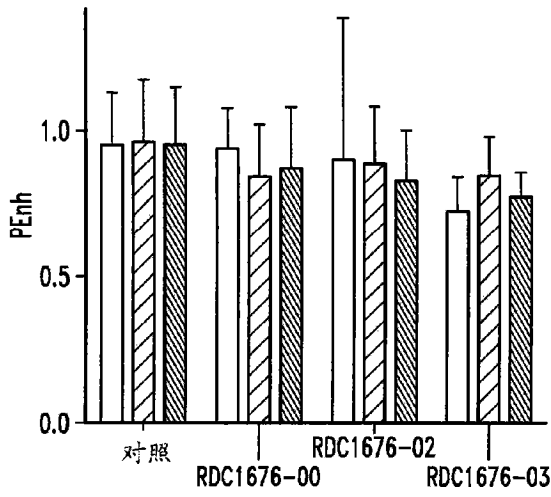


图 111A

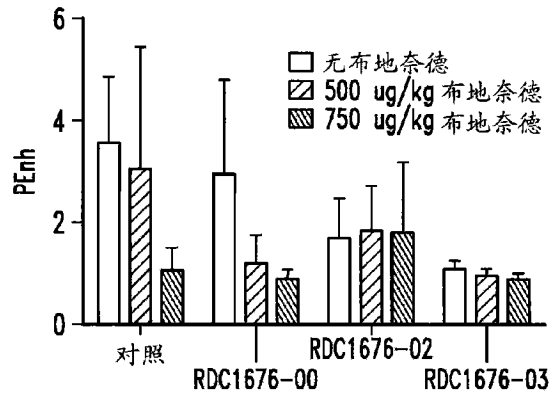


图 111B

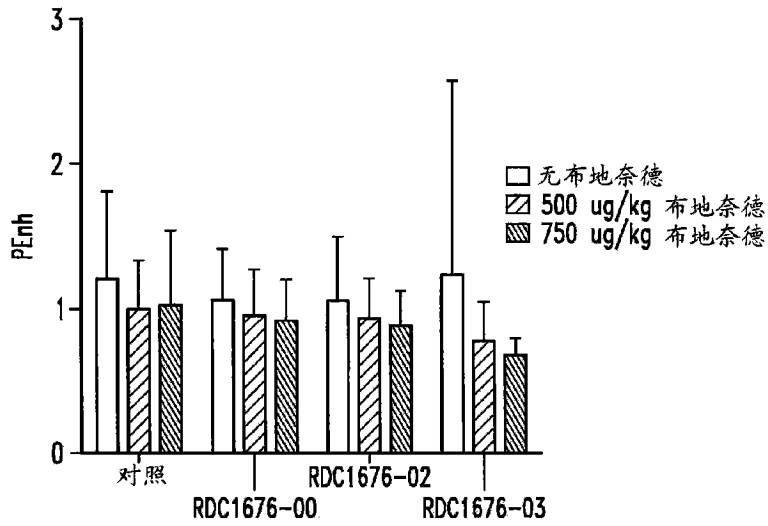


图 111C

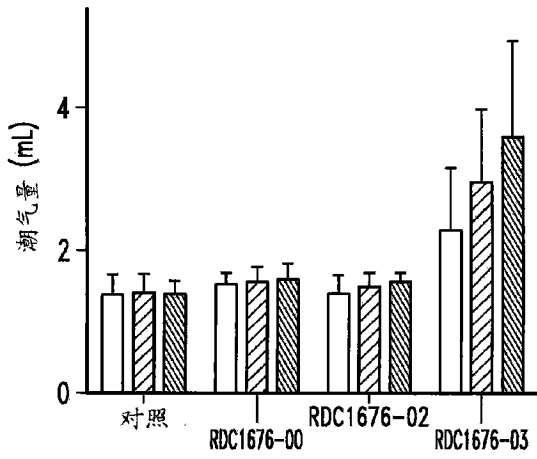


图 112A

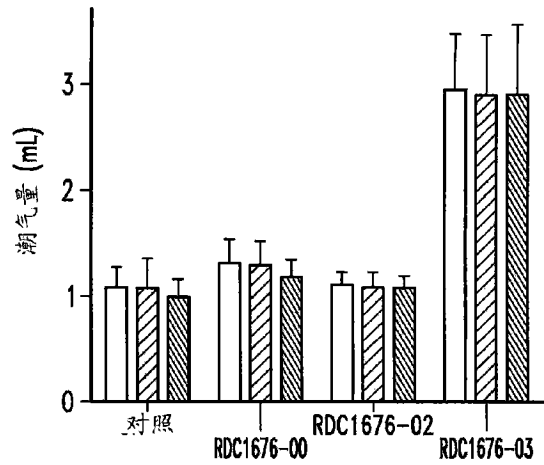


图 112B

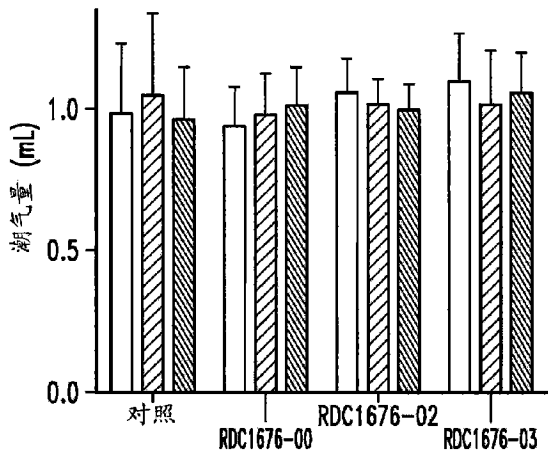


图 112C

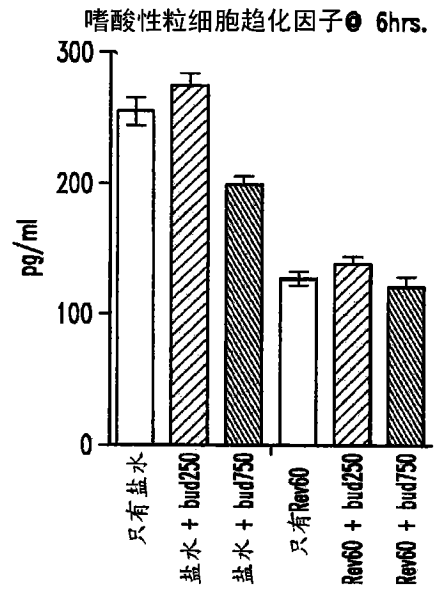


图 113A

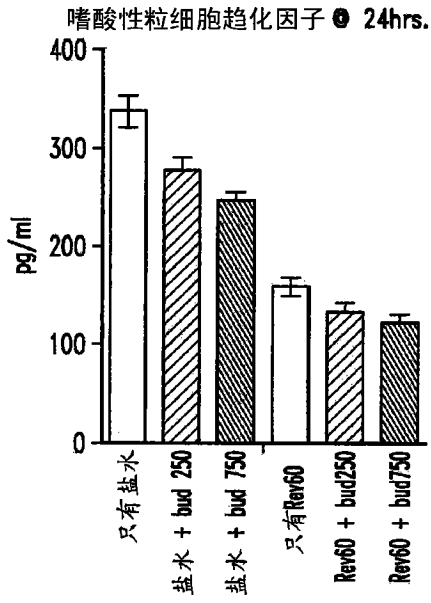


图 113B

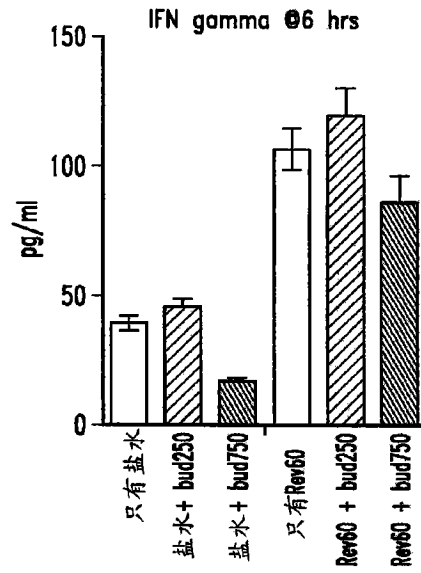


图 113C

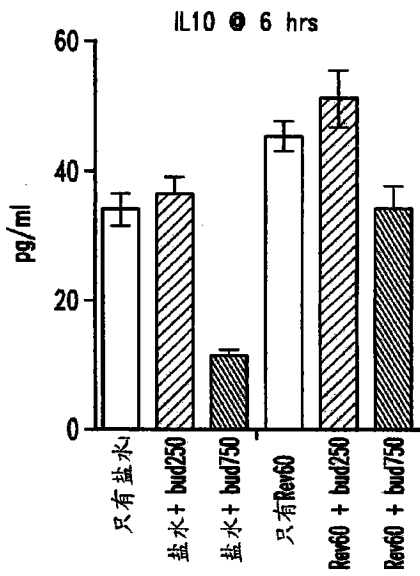


图 113D

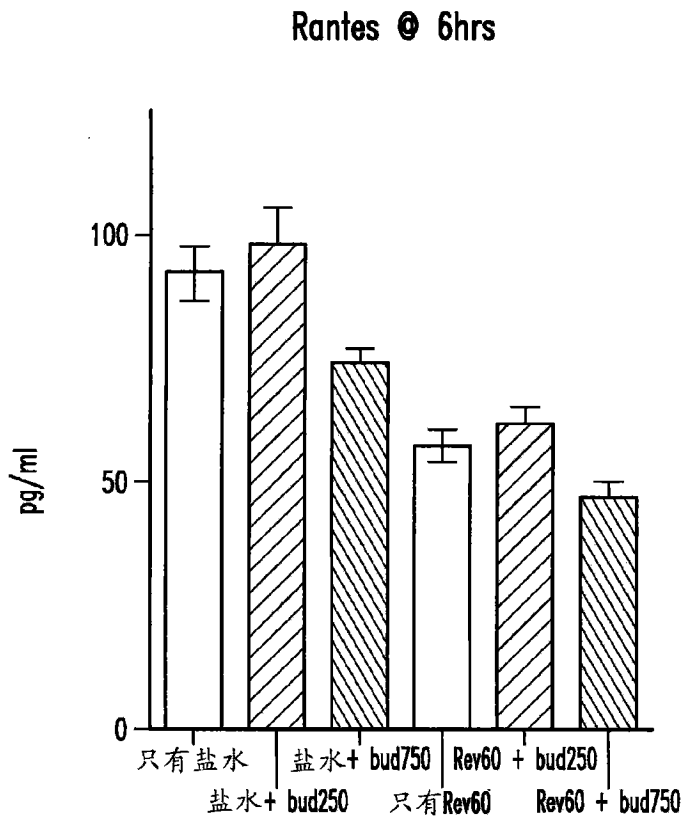


图 114

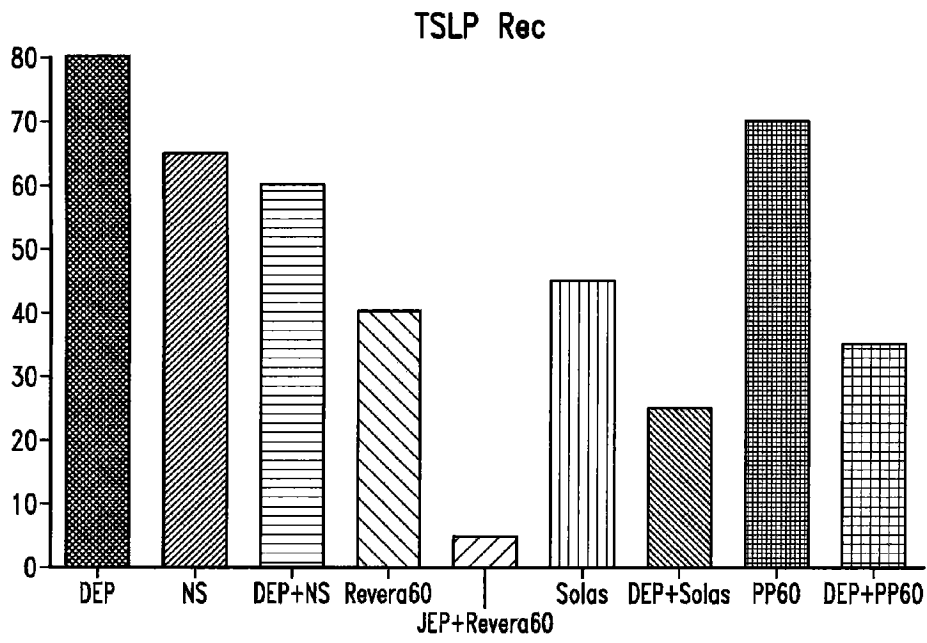


图 115

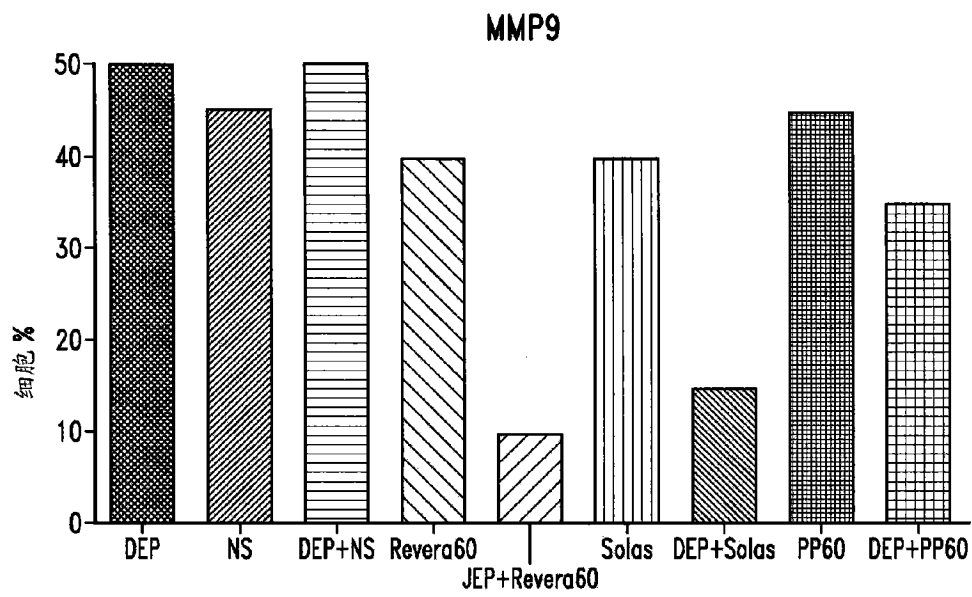


图 116

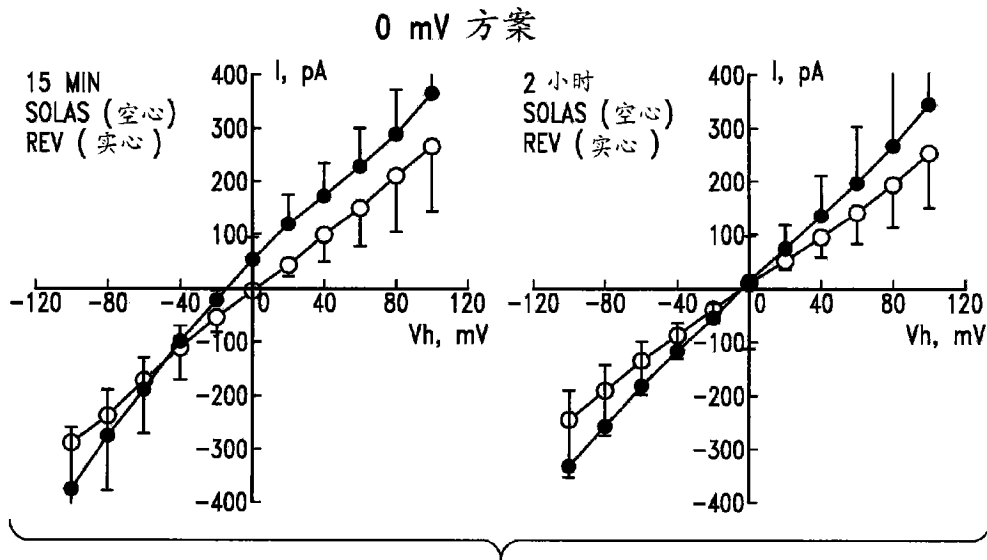


图 117A

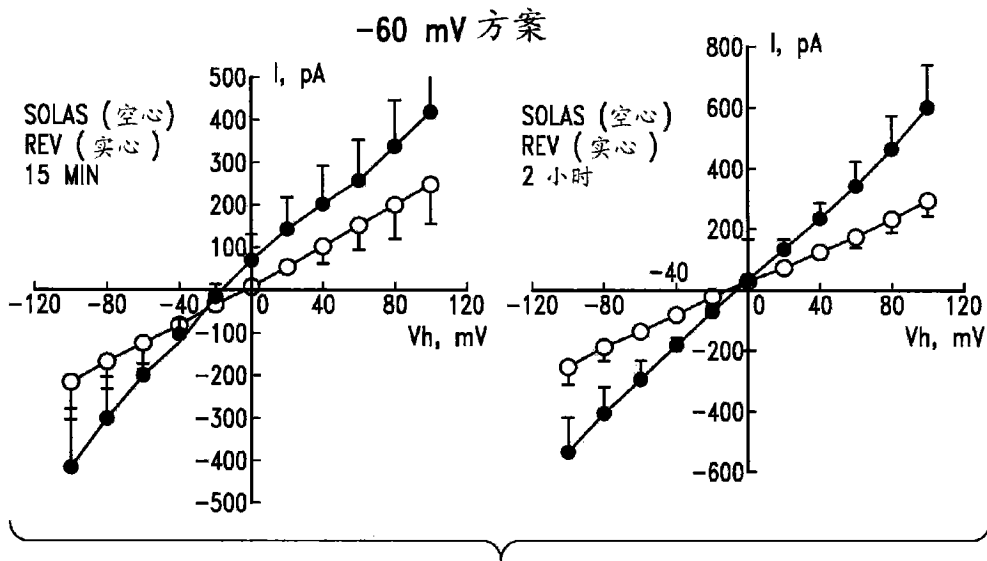


图 117B

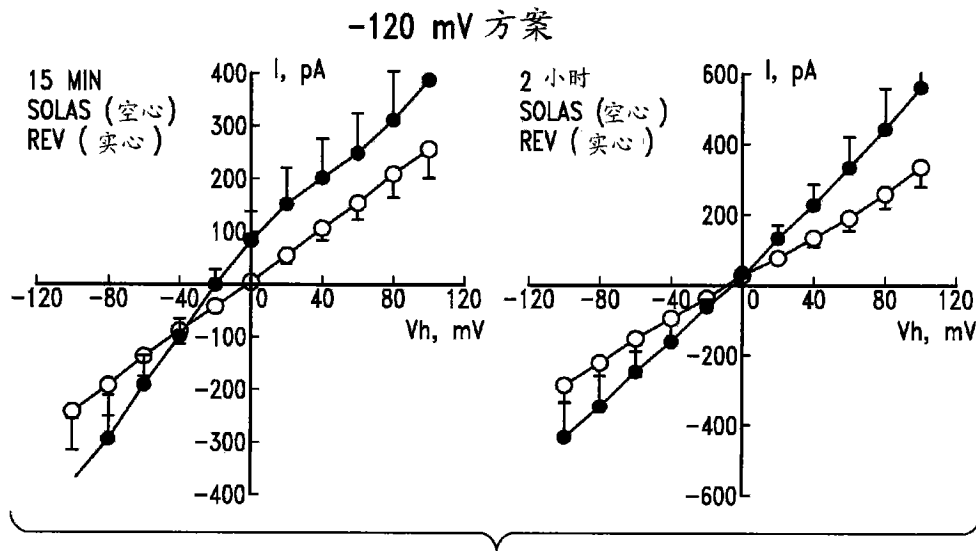


图 117C

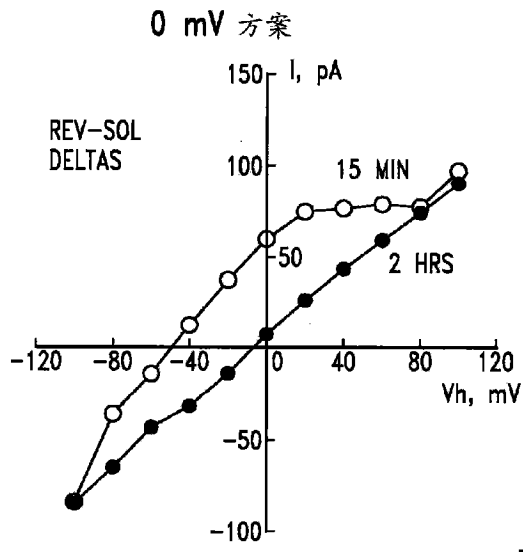


图 118A

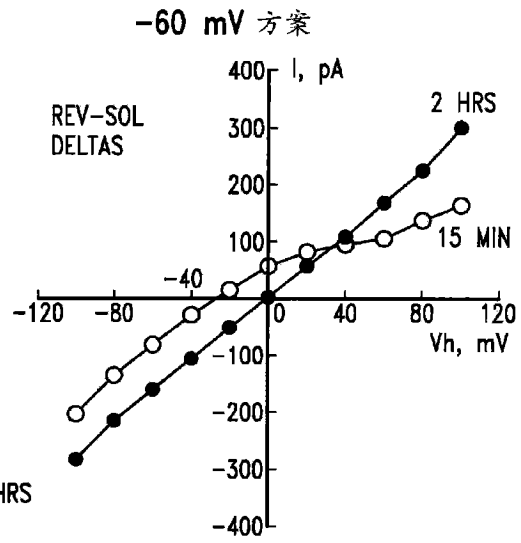


图 118B

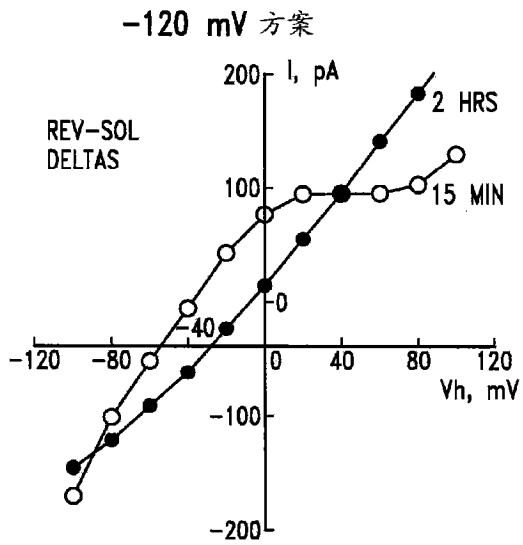


图 118C

Solas 15 min, 0 mV

- ◆ 对照
- CsCl
- 20 CaCl₂
- ▲ 40 CaCl₂

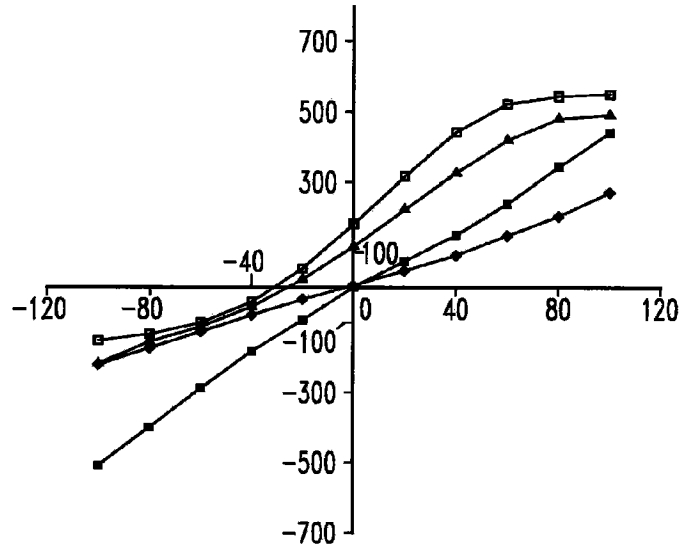


图 119A

Solas 15 min, -120 mV

- ◆ 对照
- CsCl
- 20 CaCl₂
- ▲ 40 CaCl₂

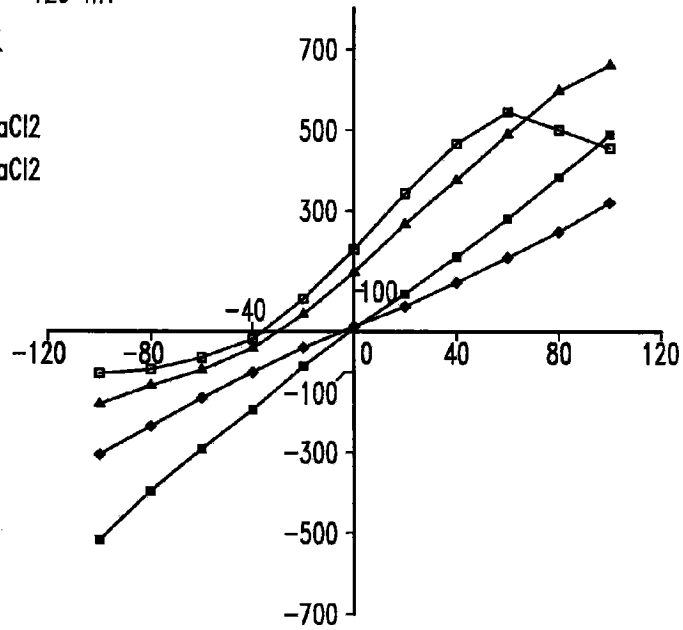


图 119B

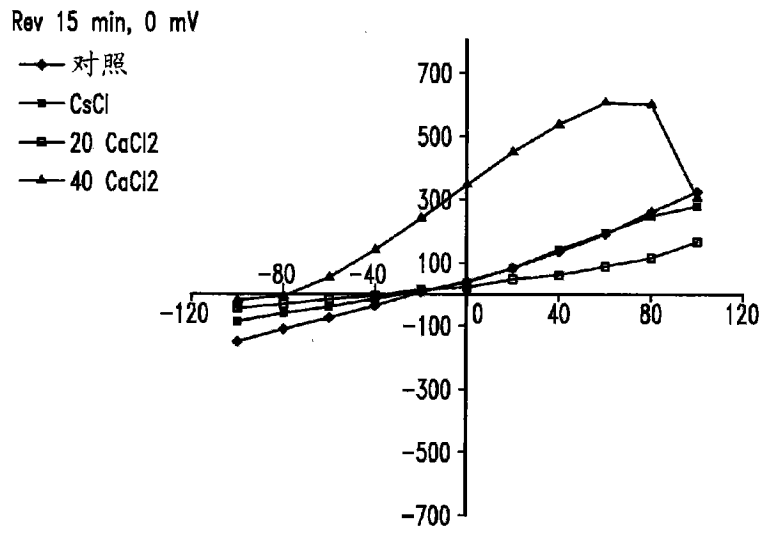


图 119C

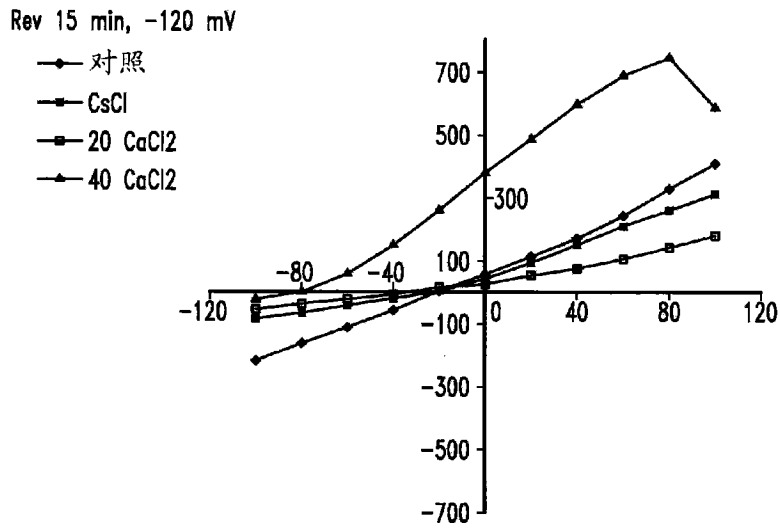


图 119D

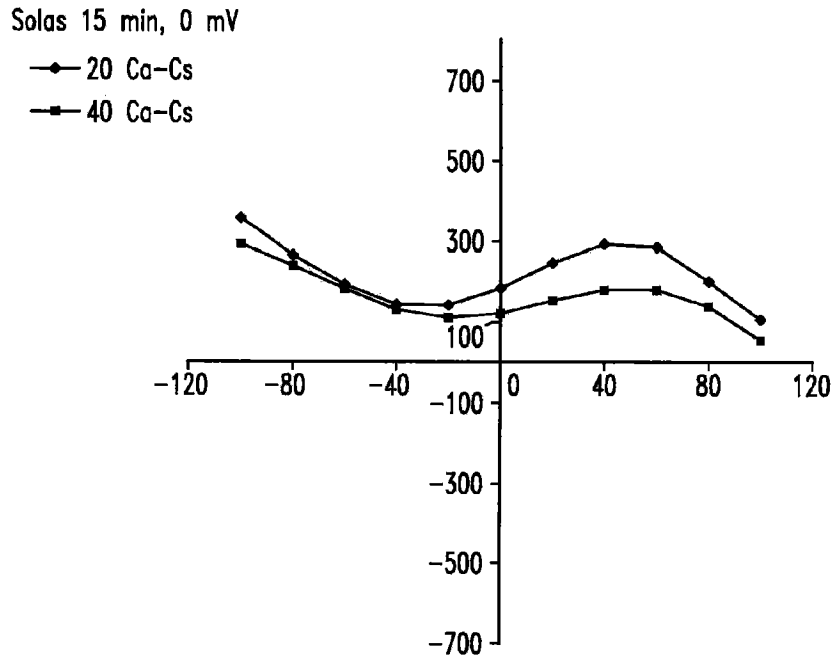


图 120A

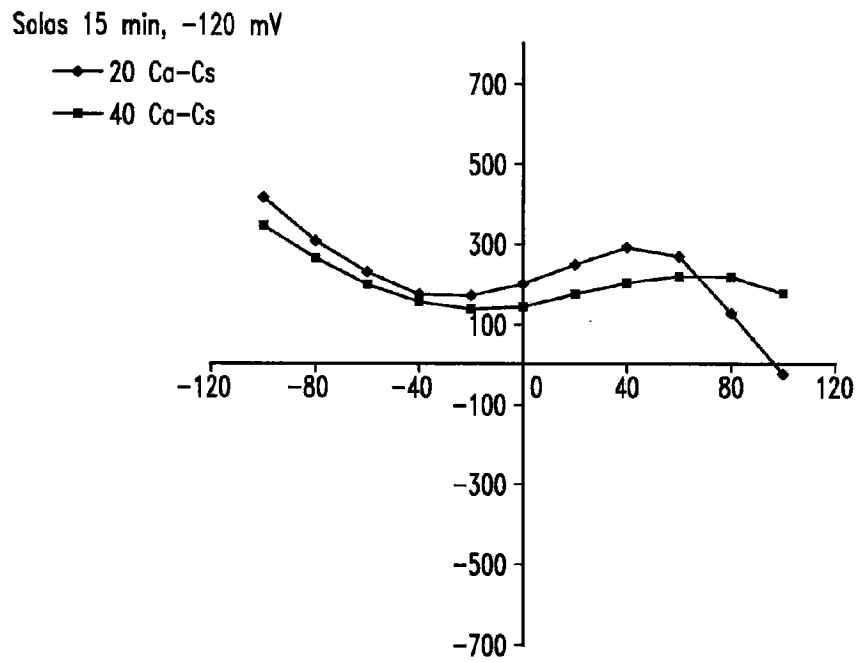


图 120B

Rev 15 min, 0 mV

◆ 20 Ca-Cs
■ 40 Ca-Cs

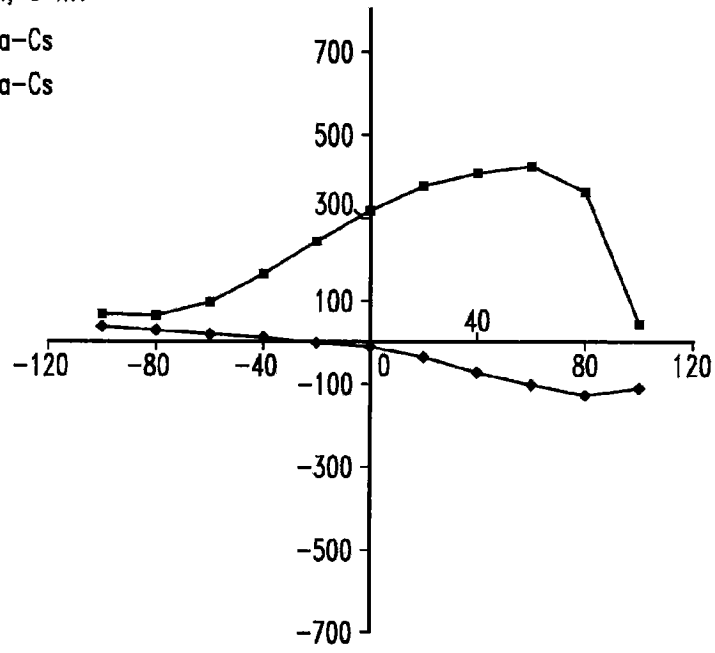


图 120C

Rev 15 min, -120 mV

◆ 20 Ca-Cs
■ 40 Ca-Cs

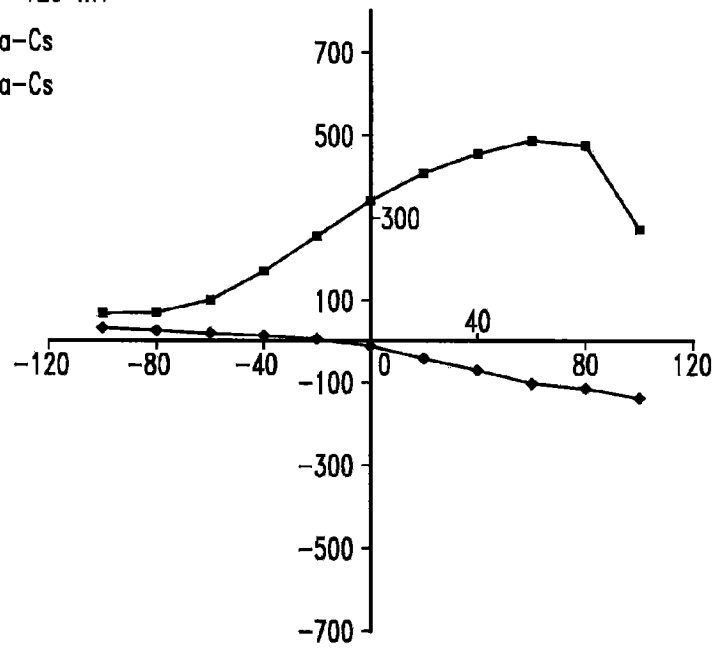


图 120D

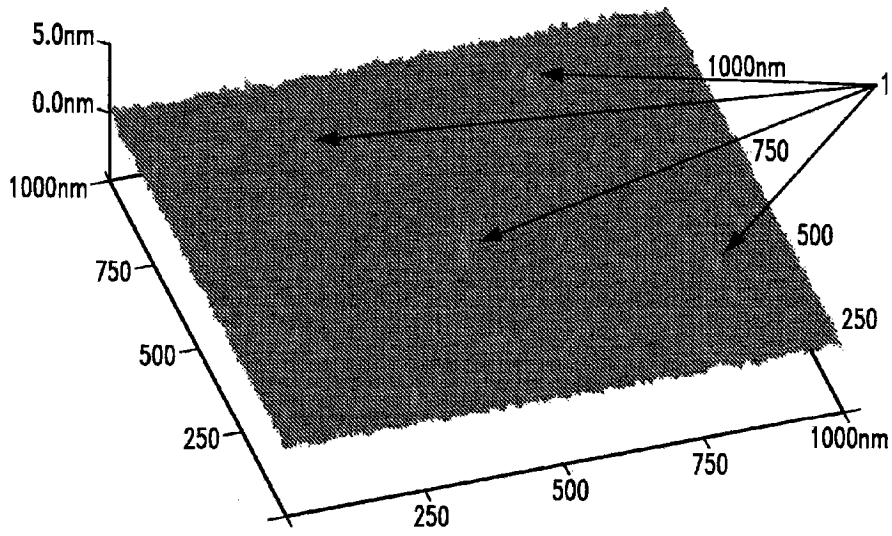


图 121A

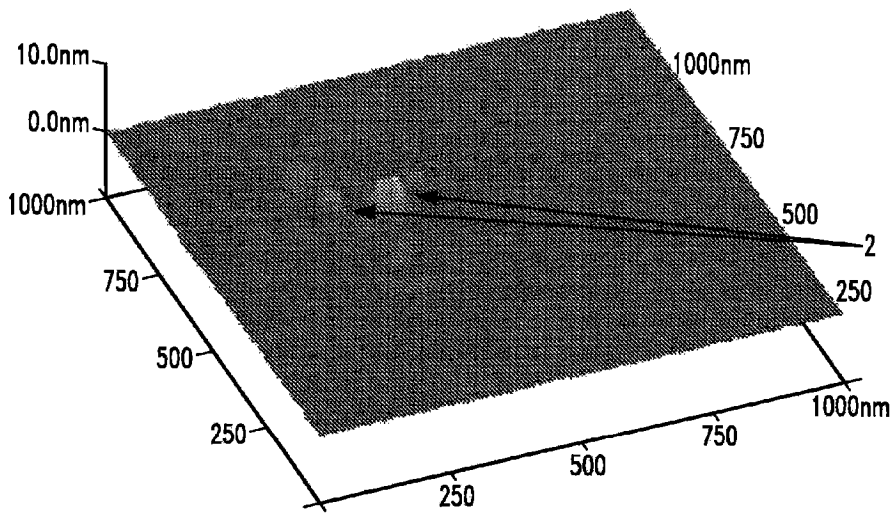


图 121B

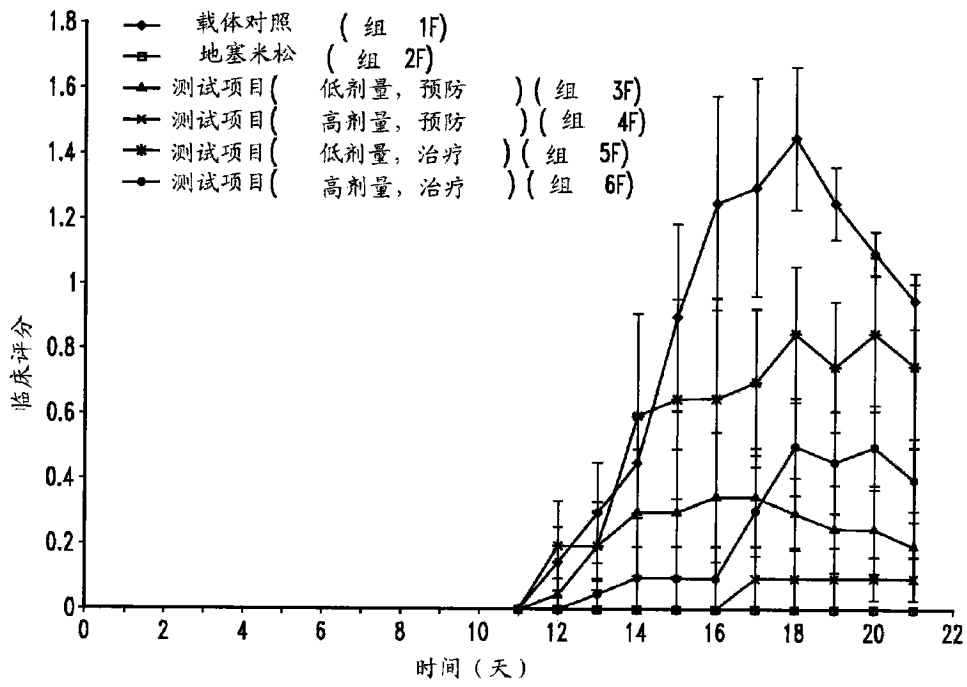


图 122

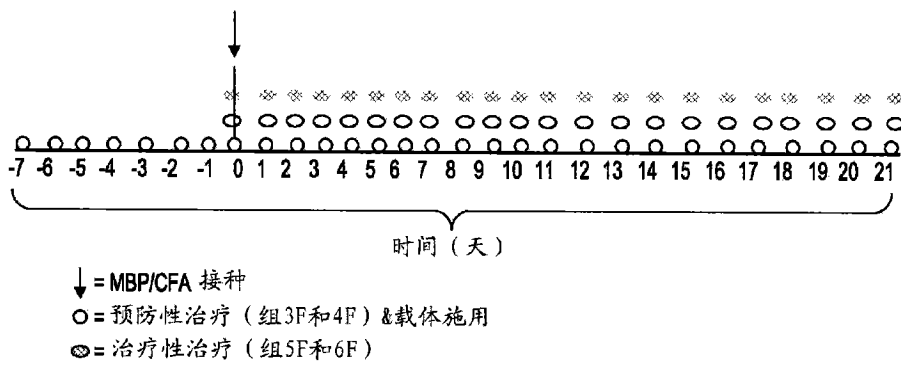


图 123