



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101027077 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 19

(21) 申请号 200580032498. 9

A61K 9/72 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 09. 27

A61K 47/18 (2006. 01)

A61K 47/34 (2006. 01)

(30) 优先权数据

279864/2004 2004. 09. 27 JP

252154/2005 2005. 08. 31 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2005/018247 2005. 09. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02006/035977 EN 2006. 04. 06

(73) 专利权人 佳能株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 政田阳平 杉田贤 金子秀树

宫崎健

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈昕

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 9/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1402640 A, 2003. 03. 12, 全文.

CN 1464791 A, 2003. 12. 31, 摘要, 权利要求
1-3, 10, 说明书第 3 页最后一段.

CN 1446077 A, 2003. 10. 01, 说明书第 11 页
第 1 段、12 页最后一段至 13 页第 2 段.

W0 02/13860 A1, 2002. 02. 21, 全文.

审查员 潘天耀

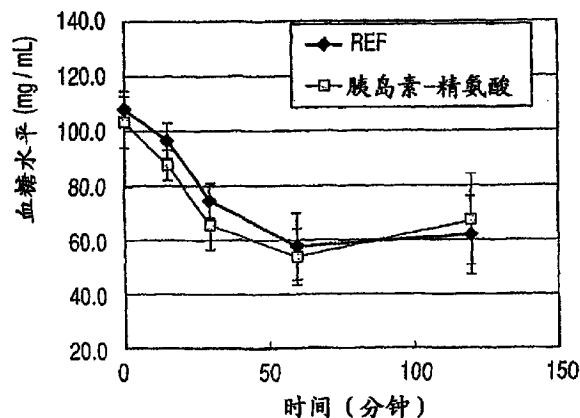
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 6 页

(54) 发明名称

喷射液、喷射设备、喷射盒以及从液体制备液
滴的方法

(57) 摘要

本发明提供了喷射液,所述的喷射液即使在
含有至少一种蛋白质和肽的情况下也可以通过使
用热能的喷墨方法稳定地喷射,并且提供了排出
含有至少一种蛋白质和肽的液体的方法和设备,
所述的方法和设备使用喷射液。将至少一种具有
胍基的化合物加入到至少一种蛋白质和肽的含水
溶液中以促使其适合通过使用热能的喷射方法的
喷射事件。



1. 用热喷墨系统喷射的喷射液,所述的喷射液包括:

白蛋白;

具有胍基的化合物;和

液体介质,

其中该具有胍基的化合物选自盐酸胍、N-乙基盐酸胍、N,N'-二甲基双胍氢氯化物、高精氨酸、2-氨基-4-胍基-丁酸、精氨酸乙酯、N α -乙酰基精氨酸盐酸盐。

2. 用热喷墨系统喷射的喷射液,所述的喷射液包括:

选自白蛋白、胰岛素、GOT、 γ -GTP、LDH、ALP、胰高血糖素、GLP-1、G-CSF、EPO、INF α 、INF γ 、降血钙素、IL-2、IL-6 和 TNF α 中的一种;

具有胍基的化合物;和

液体介质,

其中该具有胍基的化合物为精氨酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 的喷射液,其还含有聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯作为表面活性剂。

4. 液体喷射盒,包括:

其中贮存有根据权利要求 1 或 2 的喷射液的罐;和

热喷墨头。

5. 液体吸入器,包括:

根据权利要求 4 的液体喷射盒;和

用于引导想要喷射的液体从所述液体喷射盒的热喷墨头的液体喷射部分进入使用者的吸入部位的喷射孔。

喷射液、喷射设备、喷射盒以及从液体制备液滴的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及：适合从含有至少一种蛋白质和肽的液体制备液滴的液体组合物和产生这种液滴的方法，以及使用这种制备液滴的方法的喷射设备。

背景技术

[0002] 目前，已经进行了许多尝试来利用蛋白质溶液来制备液滴。例如，对于药物递送方法，已经考虑将液滴应用于穿透粘膜施用，因为例如有以下优势：在制备生物芯片和生物传感器时可能仅需要小量的蛋白质并且可容易地整合所述蛋白质。此外，已经注意到使用蛋白质的细微液滴来控制蛋白质的结晶以及筛选生理活性物质的方法（参见例如日本专利申请公开 No. 2002-355025, Allain LR 等，" Fresenius J. Anal. Chem "，vol. 371, p. 146-150, 2001, and Howard EI and CachauRE, " Biotechniques "，vol. 33, p. 1302-1306, 2002）。

[0003] 近年来，已经能够通过一些技术进行蛋白质，特别是有用的蛋白质例如酶和具有生理活性的那些蛋白质的大量生产（例如基因重组技术）。因此，将蛋白质制成液滴的方法在研究、利用和新型蛋白质药物应用领域中可以成为有效的手段。更具体地讲，对通过微滴提供给患者许多药剂的方法存在着不断增加的显著需要。特别是，微滴对从肺部施用蛋白质、肽和其它生物材料已经变得很重要。换言之，因为肺具有肺泡，肺泡自身具有 $50\text{--}140\text{m}^2$ 的广大的表面积，并且作为吸收屏障的上皮只有 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ ，同时肺的酶活性比胃肠道的要小，所以肺已经取代注射成为倍受关注的基于大分子肽的药物（例如胰岛素）的给药途径。

[0004] 一般而言，已知肺中药物微滴的沉积主要取决于它的质量气体动力学中位数直径 (mass median aerodynamic diameter)。特别是，微滴递送至肺深部的肺泡中必需开发：稳定的药物制剂和施用形式，所述的制剂可以以高度可重复的窄的微滴的粒度分布 ($1\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$) 给药。

[0005] 作为制备具有窄的粒度分布的均匀微滴的方法，从用于喷墨打印的那些设备转化而来的合适的液滴产生设备用于产生极其细微液滴的用途已经在本领域有报道（参见，例如美国专利 No. 5894841 和日本专利公开 No. 2002-248171）。在此，涉及的特殊喷墨打印方法涉及引导将要喷射的液体进入小室中，在该处所述的液体受到喷射压力，因而使得液滴能从喷口喷出。排出方法可以是本领域已知的那些方法任意之一，例如借助热换能器（例如薄膜电阻）通过在小室上形成的喷口产生喷射液滴的气泡的方法（即热喷墨方法）和借助压电换能器直接从在小室上形成的喷口喷射液的方法（压电喷墨方法）。将所述的小室和喷口整合进打印头部元件中并然后将该元件连接至液体供给源和控制液滴喷射的控制器上。

[0006] 为了让肺能吸收药物，应该控制药物的剂量。因而，通过能调节其喷射量的喷墨方法从液体制备液滴是十分优选的配置。然而在另一方面，应该确保溶液的喷射在这种情况下进行。然而，当仅控制蛋白质溶液的表面张力和粘滞系数时蛋白质溶液的喷射是不稳定

的。因此,常常遇到难以定量喷射的问题。

[0007] 与用喷墨方法产生蛋白质和肽的液滴的方法相关的问题是由于这样一个事实:蛋白质的四级结构是脆弱的。因而,当蛋白质的构型受到破坏时可能发生蛋白质的积聚或降解。当用喷墨方法进行制备液滴的操作时,由于物理应力(例如压力或剪切应力)或由于微滴特有的高的表面能量(如果采用所述的热喷射方法,除了前面的应力还进一步施加了热),许多蛋白质的结构可能会变得不稳定。特别是,在所述的喷射方法的情形中,那些物理作用比由常规搅动或热处理(例如在热喷墨方法的情形中,瞬时施加约 300℃和 90atm)施加的剪切力和热能要大很多。此外,同时激发了数种物理应力,这样与通常处理蛋白质的情形比较,蛋白质的稳定性可能会大量降低。因此,当采用所述的喷墨技术时稳定蛋白质的常规技术可能是不够的。如果出现这种问题时,蛋白质在制备液滴时聚集并因而阻塞喷嘴,因而使得难喷射液滴。

[0008] 而且,适于吸入肺的直径为 1-5 μm 的液滴比用于目前商业提供的任何打印机的直径为约 16 μm 的那些液滴要小很多。因此,在所述的液滴上比在用于打印机的液滴可能有更大的表面能量或剪切应力。因此,更难喷射适合吸入肺中的微滴。

[0009] 考虑到如上描述的液滴的直径,将能具有高密度化的喷嘴和低的生产成本的热喷墨方法优选用作排出蛋白质溶液的方法。

[0010] 在国际公开 No. WO 02/094342 中,公开了用于调节表面张力的化合物和给液体组合物加入致湿剂用于液滴的肺部吸入的方法,所述液滴用热喷墨方法制备。在此,为了通过溶液的表面张力、粘度或增湿作用来增加作为液滴的溶液中的蛋白质的稳定性,加入了表面活性剂或水溶性聚合物如聚乙二醇。

[0011] 然而,没有描述排出的稳定性,并且当蛋白质或肽的浓度增加时表面活性剂或水溶性聚合物的加入也没有发挥足够的效果。因此,添加剂本身常常阻断排放的稳定性。而且,已经知道根本没有效果的表面活性剂比起那些有效的表面活性剂要多得多。此外,稳定性不仅由表面张力和粘度所限定。因此,公开于所述文献中的方法不是用于喷射稳定的常规方法。因此,对于实际用途,用于喷射目的的能以稳定的方式排出蛋白质或肽的任何液体是必要的。

[0012] 而且,日本专利特开 No. 2003-154655 和日本专利 No. 03610231 各自公开了制备蛋白质芯片等的方法作为利用蛋白质或肽的方法,其中所述的蛋白质或肽通过热喷墨方法喷射。然而,对蛋白质或肽的稳定喷射没有实质的描述。

[0013] 正如上描述,所述的喷墨方法在本领域已知为在将液体样品形成精细液滴后而排出液体样品的方法的其中一种。所述的喷墨方法具有这样一种特有性能即显示出对作为液滴提供的要喷射液的量的高度控制,即使是所述的量十分小。基于所述喷墨方法的排出微滴的方法包括使用压电元件等的振动方法和使用微加热器元件的热喷墨方法。在使用压电元件等的振动方法的情形中,减小要使用的压电元件的大小受到限制并且每单位面积形成的喷孔的数目也受到限制。此外,生产成本随每单位面积喷孔的数目增加而增加。相较而言,在所述的热喷墨方法的情形中,微加热元件的大小可以相对容易地减小,并且每单位面积形成的喷孔的数目也可以比使用压电元件等的振动方法的要大,而由此产生的生产成本也可以显著减少。

[0014] 当应用所述的热喷墨方法时,为了控制要从各个喷孔喷射的液体微滴的合适的气

溶胶的状态和液体的量,需要调整要喷射液的物理特性。换言之,应该设计液体的构成,包括溶剂的类型和成分以及溶质的浓度、包含于要喷射的液体样品中的溶剂和溶质,以便经调整而获得理想体积的微滴。而且,已经开发了基于热喷墨方法原理的用于排出液滴的多种装置。具体而言,对于安装在打印机上的常规喷墨头,要喷射的各液滴的量在数皮升的量级内。同时已经开发了使得液滴能形成为具有极小大小的、数皮升以下或飞升量级的液滴的喷射装置的技术和喷射方法。例如,当提供大小为数微米的体细胞作为要用药物包被的靶标时,设想可能需要使用极精细的液滴作为要喷射的单独液滴。

[0015] 对于稳定蛋白质的方法,已经知道了涉及加入任何一种水溶性聚合物的方法,所述的聚合物例如是表面活性剂、甘油、多种碳水化合物和聚乙二醇以及血清白蛋白。而且,已经知道了数种长期保存蛋白质制剂的方法(日本专利 No. 03618633、国际公开 No. WO 02/017957 和 PCT 申请 2003-510368 翻译版本的国际出版号),其中将氨基酸加入至促红细胞生成素、G-CSF 和干扰素之中。然而,根据本发明的发明人进行的研究,基于蛋白质或肽的类型和浓度或添加剂的浓度,那些方法可能不足以在热喷墨方法中稳定喷射。

[0016] 在许多情形中,即使在用多元醇(例如乙二醇和甘油)和致湿剂(例如脲)配制后当喷射蛋白质或肽时对提高喷射性能基本没有效果,所述的多元醇和致湿剂是用于喷墨打印的墨水的合适的添加剂。因此,需要基于使用热能的喷墨方法的原理来开发一种喷射液来稳定喷射蛋白质或肽溶液。

发明内容

[0017] 本发明的目的在于提供:作为喷射液的液体组合物,所述的液体提供用于通过喷墨方法稳定排出含有至少一种蛋白质和肽的液滴,其中所述的喷射方法是基于使用热能的喷射方法的原理;以及适合用于蛋白质液滴的喷射方法和喷射设备。

[0018] 本发明的喷射液是要从使用热能喷射的喷孔喷射的喷射液,所述的喷射液含有:至少一种选自蛋白质和肽;具有胍基的化合物;和液体介质。

[0019] 本发明的用于喷射液的喷射盒包括:保存喷射液的罐;和热喷墨头。

[0020] 本发明的液体吸入器包括:如上描述的喷射盒和用于引导液体从所述喷射盒的热喷墨头的液体排出部分喷入使用者的吸入部分的喷孔。

[0021] 从本发明液体制备液滴的方法包括施加热能至含有至少一种蛋白质和肽的液体来提供所述的液体为液滴,并且特征在于所述的液体含有具有胍基的化合物。

[0022] 根据本发明,将具有胍基的化合物加入到含有至少一种蛋白质和肽的溶液,使得通过施加热能至喷射液而使所述喷射液能在从所述液体制备液滴的方法中稳定喷射。此外,加入表面活性剂至所述的喷射液可以引起关于喷射稳定性的协同效应,因而使得能喷射更高浓度的蛋白质溶液。当至少一种蛋白质和肽是治疗性组分时,所述的喷射液可以提供为通过从便携式喷射设备排出的液滴,这样当吸入时,作为在肺中有效的治疗性组分提供的至少一种蛋白质和肽可以从肺吸入。而且,当喷射在基板上时,所述的喷射液可用于制备生物芯片和生物传感器、检测和筛选生物物质。

附图说明

[0023] 图 1 是说明在基板上排出蛋白质的方法的示意图。

- [0024] 图 2 是一种在基板上排列蛋白质的模式的图解。
- [0025] 图 3 是用于说明吸入头喷射盒单位的示意图。
- [0026] 图 4 是一种吸入器的透视图。
- [0027] 图 5 是图 4 中进出口盖打开的状态的透视图。
- [0028] 图 6 是当用气泡喷墨方法喷射时,血清白蛋白溶液的喷射量的图示。
- [0029] 图 7 是施用胰岛素的大鼠中血糖水平的时间历程的图示。
- [0030] 图 8 是当用气泡喷墨方法喷射时,胰岛素溶液的喷射量的图示。
- [0031] 图 9 是一个实例的试验方法的模型图。

具体实施方式

[0032] 如用于本发明的术语“蛋白质”指其中许多氨基酸通过肽键相互连接的任何肽以及溶解或扩散于含水溶液中的任何肽。而且,如用于本发明的术语“肽”指其中两个以上和 50 个以下的氨基酸通过肽键相互连接的肽。那些蛋白质和肽可以通过化学合成或可以从天然存在的状态纯化。典型地,他们可以是天然蛋白质和肽的重组体。一般而言,所述的蛋白质和肽可以通过共价连接氨基酸残基至蛋白质和肽分子而进行化学修饰,这样可以延长它们的治疗效果来获得它们效果的提高。当实施本发明时,可以使用多种期望作为液滴提供的蛋白质和肽。可用于本发明的蛋白质和肽没有明确限制,只要它们对生物体具有生理学活性并且在所述的生物体中保持它们的活性。更具代表性的是,从本发明的蛋白质和肽制备液滴是用于递送用于治疗蛋白质和肽至肺中。其实例包括:降钙素;凝血因子;多种造血因子例如 G-CSF、GM-CSF、SCF、EPO、GM-CSF 和 CSF-I;白介素例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL- β 、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11 和 IL-12;IGF 类;以及细胞因子例如 M-CSF、胸腺素、TNF 和 LIF。具有其它有用的治疗效果的蛋白质包括血管活性肽、干扰素(α 、 β 、 γ 和普通干扰素)、生长因子和激素,例如人生长激素和其它动物生长激素(如牛、猪和禽生长激素)、胰岛素、催产素、血管紧张素、甲硫氨酸-脑啡肽、P 物质、ET-1、FGF、KGF、EGF、IGF、PDGF、LHRH、GHRH、FSH、DDAVP、PTH、血管升压素、胰高血糖素和生长抑素。也可以使用蛋白酶抑制剂,包括亮肽素、胃酶抑素和金属蛋白酶抑制剂(例如 TIMP-1 和 TIMP-2)。神经生长因子例如 BDNF 和 NT3 也可以使用。而且,也可以使用纤溶酶原激活因子例如 tPA、尿激酶和链激酶。任何含有母本蛋白质全部或部分主要结构并保持所述母本蛋白质的至少部分生物学特性的肽部分也可以使用。也可以使用类似物(例如取代的或缺陷类似物)、改良的氨基酸(例如肽类似物)和水溶性聚合物(例如 PEG 和 PVA)修饰的任何上述物质。

[0033] 而且,为了制备生物芯片或生物传感器和用于筛选蛋白质和肽的用途,除了上述蛋白质和肽,用任意多种酶(例如氧化酶、还原酶、转移酶、水化酶、裂解酶、异构酶、合成酶、表异构酶、变位酶和 rasease)、多种抗体(例如 IgG 和 IgE)及其抗原修饰的上述物质,以及用于诊断用途的蛋白质和肽(例如变应原、伴侣素、抗生物素蛋白和生物素)和固定剂也可以使用。在所述喷射液中的任意蛋白质或肽可以是具有 0.3k-150kDa 分子量的蛋白质或肽。至少一种选自蛋白质和肽的含量,其根据目的而选择,优选为 1 μ g/ml-200mg/ml,更优选为 0.1mg/ml-60mg/ml。

[0034] 通常,已知通过喷墨方法喷墨可以通过加入表面活性剂或溶剂(例如聚乙二醇)来改善。然而,本发明人已经发现,当喷射所述的蛋白质或肽时,仅通过所述的加入不能发

现有喷射能力的改善而可能需要额外的添加剂。

[0035] 在下面的描述中,本发明将主要描述有关于使用所述的热喷墨方法的配置,因为所述的热喷墨方法显示了最显著的喷射能力的改善。当采用所述的热喷墨方法时,需要能获得更低成本和更高密度化的喷嘴而同时需要频繁用新的喷头置换喷头的小型设备。在其中本发明频繁使用的如上描述的这种情形下,可优选使用所述的热喷墨方法。根据集中研究的结果,本发明的发明人发现加入了具有胍基的化合物的蛋白质或肽溶液适于用所述的喷墨方法稳定地制备液滴。

[0036] 具有胍基的化合物可以有助于喷射的稳定性。其中的原因尚不清楚,但可能是以下原因。

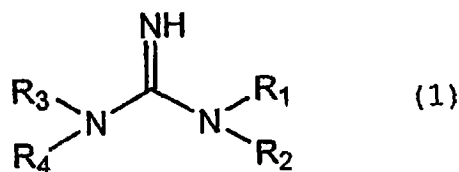
[0037] 胍基具有平面结构,上面的氨基部分作为氢键供体来形成氢键,并且分子平面的上面和下面有 π 电子覆盖,同时具有疏水性。此外,蛋白质或肽间的肽成键在这些键之间没有实质上的不同,甚至是在与胍基的氢键或作为水和肽之间结合的氢键的情形中。而且,因为胍基具有疏水部分,胍基的疏水部分和蛋白质或肽的疏水部分可以相互作用,同时所述的氨基部分与水形成氢键,因而引起变性的蛋白质或肽的水溶性增加而抑制蛋白质或肽间的作用。这种作用可以防止由在用热喷墨方法排出时产生的能量引起的蛋白质或肽的变性和积聚,因而稳定了喷射。

[0038] 本发明的发明人进行的研究已经证实,当热喷墨方法允许蛋白质或肽以足以显示有效生物活性的浓度喷射时,在 20kHz 的喷射频率下如果分子量为 3000 或更多,几乎不能观察到喷射,尽管这种现象取决于所述蛋白质或肽的类型或浓度。

[0039] 当实施本发明时,优选以低的频率驱动热喷墨头。取决于驱动频率的不同喷射稳定性的原因是,喷射液可以由热喷墨头中的加热器加热并然后部分蛋白质或肽可能在水中变得不溶而防止能量从喷墨头转移至溶液。当驱动频率低时,即使可能暂时产生不溶性物质,它们将在直到随后的驱动的时间段内再次溶解。另一方面,当驱动频率高时,溶解性的恢复可能不充分,并因而可以降低喷射的稳定性。然而,为了允许喷射大量的溶液,喷射应该以某一水平或更高的高频率进行。因而,在本发明中,驱动频率优选在 0.1kHz-100kHz 的范围内,更优选在 1kHz-30kHz 的范围内。

[0040] 用于本发明的具有胍基的化合物优选为由以下通式 (1) 表示的化合物的任意之一:

[0041]

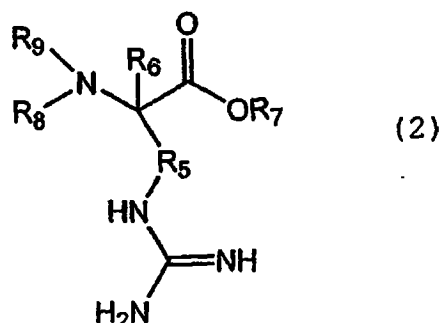


[0042] 在式 (1) 中, R_1 - R_4 每个没有明确限定,只要其构成提供能允许所述的化合物保持其对水溶解性的结构的基团的任意组合,优选 R_1 - R_4 每个独立地是氢原子、极性官能团、烷基或酰基。合适的极性官能团的实例包括氨基、羟基、羧基、磺基、醛基和硝基。烷基中的碳的数目没有具体限定,只要其不少于 1,并且优选 1-18。合适的烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、新戊基、正己基、异己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基、正十三烷基、正十四烷基、正十五烷基、正十六烷

基、正十七烷基、正十八烷基、乙烯基、烯丙基、环戊基、环己基、油烯基、亚麻基 (linoleyl)、亚麻烯基 (linolenyl) 和苯基。每个烃基可以被卤素原子、酰基和极性官能团中的至少一种取代, 或其中可以具有不饱和键。此外, 每个烃基之中可以含有至少一种醚键、酯键和酰胺键。而且, 可以使用这些化合物的盐。此外, 可以使用其中那些化合物每个可以作为聚合物单个单元提供的聚合物, 以及可使用在其结构中含有那些化合物任意之一的表面活性剂。具有胍基的化合物优选为 59-1000, 更优选 59-300 的分子量。所述的化合物优选在中性区域 (pH 5.5-8.5) 对水具有大于以重量计 0.01% 的溶解度。

[0043] 在每个具有胍基的化合物中, 优选的化合物包括精氨酸盐生物, 所述的精氨酸衍生物每个由以下描述的通式 (2) 表示: 精氨酸可用作添加剂, 因为它是氨基酸的一种并且它的衍生物对生物体具有小的影响。

[0044]



[0045] R_5 - R_9 可以形成任意组合只要可以保持对水的可溶性。 R_5 是具有 1-6 个碳原子的直链烃, 其中所述的烃可以是饱和的或不饱和的。

[0046] R_6 - R_9 每个独立地是氢原子、烃基或酰基。它们每个之中含有醚键、酯键或酰胺键。烃基中的碳的数目没有具体限定, 只要其不少于 1, 并且优选 1-18。合适的烃基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、新戊基、正己基、异己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基、正十三烷基、正十四烷基、正十五烷基、正十六烷基、正十七烷基、正十八烷基、乙烯基、烯丙基、环戊基、环己基、油烯基、亚麻基、亚麻烯基和苯基。

[0047] 酰基的碳链中碳的数目没有明确限制, 只要其不少于 1, 并且优选为 1-18。合适的酰基的实例包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、草酰基、丙二酰基、琥珀酰基、苯甲酰基、丙烯酰基、异丁烯酰基、丁烯酰基、己烯酰基、辛酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基和油酰基。

[0048] 而且, 那些烃基 R_5 - R_9 每个可以被至少一种选自卤素原子、酰基、羟基、羧基、磺基、醛基、酰氨基、氨基和硝基的官能团取代, 或其中可以含有至少一个醚键、酯键和酰胺键。

[0049] 所述的卤素原子可以是氟、氯、溴和碘原子的任意之一。部分或全部的构成所述的羟基、羧基、酰胺基和氨基的氢原子可以被烃基取代。

[0050] 而且, 可以使用每个由式 (2) 表示的化合物的盐。此外, 可以使用聚合物, 所述的聚合物中可以提供那些化合物每种作为所述聚合物的单个单位, 以及可使用在其结构中含有那些化合物任意之一的表面活性剂。

[0051] 在精氨酸的衍生物中, 更优选的化合物包括精氨酸、精氨酸甲酯、精氨酸乙酯、N α -酰基精氨酸及其盐, 并且更优选的化合物包括精氨酸、N α -酰基精氨酸及其盐。

[0052] 具有胍基的化合物的加入浓度, 尽管其取决于蛋白质或肽的类型和浓度, 还是优选为重量的 0.01-30%, 更优选为重量的 1-20%。

[0053] 在本发明中, 发现通过同时加入具有胍基的化合物和表面活性剂, 即使相当大地减少了所述添加剂的浓度, 也可以保持稳定地喷射。具有胍基的化合物的加入量可以是具有相同蛋白质浓度的溶液的二分之一或十分之一, 所述的具有相同蛋白质浓度的溶液是通过加入相对与一份重量的具有胍基的化合物的 0.2-1 份的表面活性剂而获得的。所述表面活性剂的效果不同于具有胍基的那些化合物并可能包括防止蛋白质变性的作用和再次溶解积聚的蛋白质的作用来稳定喷射。这两种不同的效果的组合可以发挥协同效果而很大地改善喷射的稳定性。喷射的稳定性可能没有保证, 因为所述表面活性剂由于这些作用的水平低而不能单独完全防止蛋白质的积聚。

[0054] 如用于本发明的术语“表面活性剂”指在分子中具有极性部分和非极性部分且具有特有特征的化合物, 所述的特有特征是所述的部分在所述分子上的各个不同局部区域, 所述的表面活性剂通过在界面的分子排列而减少了与不混溶相关的表面张力, 并且可以形成胶束。

[0055] 具体而言, 要使用的表面活性剂的代表性实例包括 (但不限于): 脱水山梨糖醇脂肪酸酯, 如脱水山梨糖醇单辛酸酯、脱水山梨糖醇单月桂酸酯或脱水山梨糖醇单棕榈酸酯; 具有氨基酸作为亲水基团的表面活性剂的 N-酰基氨基酸, 如 N-椰子油脂肪酸甘氨酸、N-椰子油脂谷氨酸或 N-月桂酰基谷氨酸; 氨基酸的脂肪酸盐; 甘油脂肪酸酯, 如甘油单辛酸酯、甘油单肉豆蔻酸酯、或甘油单硬脂酸酯; 聚甘油脂肪酸酯如单硬脂酸十聚甘油酯、二硬脂酸十聚甘油酯, 或单亚油酸十聚甘油酯; 聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯, 如聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐单硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐单棕榈酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐三油酸酯、或聚氧乙烯山梨醇酐三硬脂酸酯; 聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯, 如聚氧乙烯山梨醇四硬脂酸酯或聚氧乙烯山梨醇四油酸酯; 聚氧乙烯甘油脂肪酸酯, 如聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯; 聚乙二醇脂肪酸酯, 如聚乙二醇二硬脂酸酯; 聚氧乙烯烷基酯, 如聚氧乙烯月桂酯; 聚氧乙烯聚氧丙烯烷基酯, 如聚氧乙烯聚氧丙烯乙二醇酯、聚氧乙烯聚氧丙烯丙酯, 或聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基酯; 聚氧乙烯烷基苯基酯, 如聚氧乙烯壬基苯基酯; 聚氧乙烯硬化的蓖麻油, 如聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯硬化的蓖麻油 (聚氧乙烯氢化蓖麻油); 聚氧乙烯蜂蜡衍生物如聚氧乙烯山梨醇蜂蜡; 聚氧乙烯羊毛脂衍生物如聚氧乙烯羊毛脂; 具有 HLB 6-18 的表面活性剂, 如聚氧乙烯脂肪酰胺 (例如, 聚氧乙烯硬脂酰胺); 阴离子表面活性剂, 如具有 8-18 个碳原子的烷基硫酸盐 (例如, 十六烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠或油烯基硫酸钠); 平均具有另外的 2-4 摩尔环氧乙烷和在烷基上有 8-18 个碳原子的聚氧乙烯烷基酯硫酸盐 (例如, 聚氧乙烯月桂基硫酸钠); 在烷基上具有 8-18 个碳原子的烷基苯磺酸盐, 如月桂基苯磺酸钠; 在烷基上具有 8-18 个碳原子的烷基磺基丁二酸盐, 如月桂基磺基丁二酸钠; 天然的表面活性剂如卵磷脂或甘油磷脂; 神经鞘氨醇磷脂如神经鞘磷脂; 和具有 8-18 个碳原子的脂肪酸的蔗糖脂肪酸酯。将那些表面活性剂单独或与两种或多种组合加入至本发明的喷射液 (液体组合物) 中。

[0056] 优选的表面活性剂包括聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、N-酰基氨基酸和氨基酸的脂肪酸盐, 并且特别优选的表面活性剂包括聚氧乙烯 20 山梨醇酐单月桂酸酯、聚氧乙烯 (4) 山梨醇酐单油酸酯、N-椰子油脂肪酸甘氨酸、N-椰子油脂肪酸谷氨酸、N-月桂酰基肌氨酸

和精氨酸椰子油脂肪酸盐。其中,最优选的表面活性剂包括聚氧乙烯 20 山梨醇酐单月桂酸酯、聚氧乙烯 20 山梨醇酐单油酸酯, N- 月桂酰肌氨酸和精氨酸椰子油脂肪酸盐。此外,优选用于肺吸入的那些表面活性剂包括聚氧乙烯 20 山梨醇酐单月桂酸酯和聚氧乙烯 20 山梨醇酐单油酸酯。

[0057] 可将所述的表面活性剂以例如胰岛素重量的 0.001-20% 的浓度加入,尽管所述的浓度取决于共同存在的蛋白质等。此外,可将所述的表面活性剂相对一份重量的具有胍基的化合物以 0.1-1.0 份重量的浓度加入。

[0058] 在本发明,可以提前将所述的蛋白质与氨基酸和表面活性剂混合,或可刚好在喷射前混合。优选在喷射前将它们均匀混合。

[0059] 在本发明的实施方案中,为了除去微生物影响,可加入抗微生物剂、杀菌剂和防腐剂。这些试剂的实例包括:酚衍生物,如苯酚、甲酚和苯甲醚;季铵盐如苯扎氯铵和 benzatonium chloride;苯甲酸类如苯甲酸和对羟基苯甲酸酯;和山梨酸。

[0060] 在本发明的一些实施方案中,为了提高保存的稳定性,可以加入油脂、甘油、乙醇、脲、纤维素、聚乙二醇和藻酸盐中的任一种。而且,为了提高化学稳定性,可以加入抗坏血酸、柠檬酸、环糊精、维生素 E 或任何其它抗氧化剂。

[0061] 可以加入任何缓冲液来调整所述喷射液的 pH。可以使用的缓冲液包括抗坏血酸、柠檬酸、稀释的盐酸和稀释的氢氧化钠,并且也包括其它缓冲液例如磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、PBS、HEPES 和 Tris。

[0062] 可以加入氨基乙磺酸、氯化钾、氯化钠、甘油或碳酸氢钠作为等渗剂。

[0063] 可以加入任何一种糖类如葡萄糖和山梨醇、甜味剂如阿司帕坦、薄荷醇和多种芳香剂作为调味剂。

[0064] 当上述的喷射液用于制备生物芯片或生物传感器或用于筛选蛋白质时,可以使用几乎与目前商业提供的喷墨打印机相同的系统。

[0065] 将根据图 1 描述细节。喷射液经由喷射液罐 1 充满喷墨头 3 的喷嘴。喷射液 4 通过在驱动控制器 6 的控制下驱动喷墨头而喷射至适合预计目的的基板 5 上而在其上形成图案,同时所述基板和喷射头的喷嘴表面间的距离保持不变。参考数字 2 表示液体流动途径。所述的模式可以通过排出图像模式在所述的基板上形成。然而,作为备选,优选形成如图 2 中显示的其中点互相不连接的图案。

[0066] 而且,将含有测试物质的溶液以相同的模式喷射在基板上来有效地引起所述的基板和测试物质之间的反应,或可以通过引起所述测试样品喷射量的不同而以不同的浓度喷射。

[0067] 当上述的喷射液用于肺吸入时,一个必不可少的部分是能以具有 1-5 μm 的小粒度分布的液滴排出本发明剂量的装置。用于排出所述液滴的头部部分是可检测的盒单位。所述的盒单位包括以下部分。将根据图 3 来描述。盒 10 具有其中充满药物的液罐 11、用于提供所述的药物至位于邻接出口(喷嘴)的蒸发点的液体流动途径 12、用于排出所述喷射液的头部部分(液体排出部分)13 和包括具有控制器的电连接部分 15 的线路 14。对应于液体喷射头部的头部部分 13 的细节描述于日本专利申请公开 No. 2003-154665。

[0068] 设计了作为喷射控制器提供的吸入器由使用者携带和保管,并且所述的吸入器能排出恒定量的作为具有均匀粒子大小的液滴的药物,因而允许使用者吸入药物。

[0069] 现在参考图 4 和 5,描述用于本发明的吸入器的图示配置。

[0070] 图 4 是显示所述吸入器的外视图的远景图,其中参考数字 20 表示所述吸入器的壳体并且 16 表示进出口盖,并且所述的壳体和盖形成了外罩。参考数字 19 表示电源。在图 5 中,显示了打开的所述的进出口盖 16。当所述的进出口盖 16 打开时,可以看见头部盒单位 21 和衔嘴 18。当使用者进行吸入动作时,空气可以通过空气入口 17 进入所述的衔嘴 18 并然后与从在所述的头部盒单位 21 中形成的喷射孔喷射的药物混合,然后移向允许人喷射形式的衔嘴的出口。使用者把所述的衔嘴尖放入口中并然后用牙齿保持住,随后吸气。因而,可以有效地吸入从所述的头部盒单位的液体喷射部分作为液滴喷射的药物溶液。

[0071] 而且,如果必要,可以设计头部盒单位 21 而使得其可移动地连接至所述的吸入器上。

[0072] 通过选用图 4 和图 5 中的配置,用吸入气体施用微滴至受试者,形成的微滴可以自然到达所述受试者的咽喉,并进入到气管内。因此,喷射的液体(活性成分的剂量)的量可以独立地控制而不依赖吸入的气体的体积。

[0073] (实施例)

[0074] 在进行实施例前,为了更理解喷射蛋白质溶液的难度,当通过热喷墨方法仅喷射蛋白质时表示出了喷射的量。使用的蛋白质的量是溶解于 PBS 中并然后使用用于收集溶液的热喷墨打印机(商标名:PIXUS950i,由 Canon 公司生产)以各个浓度喷射的血清白蛋白,所述的喷墨打印机是重新改造的产品。相反,相对于类似喷射的 PBS 缓冲液的量描述了各个血清白蛋白溶液的喷射量,将所述的 PBS 缓冲液的量定义为 100%。结果显示于图 6 中。

[0075] 喷射的稳定性不是很好,甚至是当血清白蛋白的浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 这么小。喷射随所述蛋白质的浓度增加而逐渐变得更难。当进行本发明时,要喷射的液滴必须具有更小的大小,所以喷射蛋白质溶液可能是困难的。

[0076] 在下文中,将参考实施例更详细地描述本发明。这些实施例是具体实施例,所述的实施例是用以更深层理解,所以本发明根本不受限于这些具体的实施例。在此,“%”代表“%的重量”

[0077] (实施例 1-8 和用来比较的实施例 1-30)(用热喷墨方法制备蛋白质溶液的液滴)。

[0078] 进行制备喷射液的步骤,这样预先将血清白蛋白以合适的浓度溶解于 PBS 缓冲液中,并然后搅动同时加入具有胍基的化合物,接着用 PBS 缓冲液调整各种物质的浓度至预先确定的恒定水平。

[0079] 预先,要用于喷射试验的具有 $3\mu\text{m}$ 直径喷嘴的头部盒单位充满 30%乙醇含水溶液。接着,将测量粒度分布的激光衍射类型的测量设备(SprayTech,由 Malvern 有限公司生产)用于测量粒子大小和粒度分布来检测具有在 $3\mu\text{m}$ 处骤然出现的粒度分布的液滴。

[0080] 将上面的具有 $3\mu\text{m}$ 喷嘴的头部盒单位用预先配制的喷射液充满并然后将其与喷射控制器连接,接着在 12v 电压下以 20kHz 的频率进行 1 秒钟的喷射,到下次喷射间隔 3 秒。重复该步骤 50 次,随后目视观察喷射是否发生。将其中喷射发生 50 次或更多的情形评定为○,将其中喷射发生 15 次或更多但少于 50 次的情形评估为△,并将其中喷射发生少于 15 次的情形评定为×。此外,在喷射前和喷射后对喷射液进行 HPLC 测定法(测定条

件:仪器:JASCO 公司;柱:YMC-PackDiol-200,500×8.0mm ID;洗脱液:含有 0.2M NaCl 的 0.1MKH₂PO₄-K₂HPO₄(pH 7.0);流速:0.7ml/分钟;温度:25℃;检测:215nm 的 UV) 来观察喷射液组成的改变。

[0081] 作为比较例,用纯水、多种蛋白质溶液和不同于用于本发明的那些物质的物质制备喷射液,并然后进行试验这样通过与所述实施例相同的方式喷射各种液体。在此,用于在所述实施例和比较例中研究的制剂及其结果在下面的表 1 中列出。

[0082] 表 1

[0083]

	蛋白质	蛋白质浓度 (mg/mL)	添加剂	添加剂浓度 (mg/mL)	喷射能力
实施例 1	白蛋白	1.0	盐酸胍	200	○
实施例 2	白蛋白	1.0	N-乙基盐酸胍	200	○
实施例 3	白蛋白	1.0	N,N'-二甲基双胍氢氯化物	200	○
实施例 4	白蛋白	1.0	精氨酸	100	○
实施例 5	白蛋白	1.0	高精氨酸	100	○
实施例 6	白蛋白	1.0	2-氨基-4-胍基-丁酸	100	○
实施例 7	白蛋白	1.0	精氨酸乙酯	100	○
实施例 8	白蛋白	1.0	N α -乙酰基精氨酸盐酸盐	100	○
比例例 1	纯水	0	-	-	○
比较例 2	胰高血糖素	1.0	无	-	×
比较例 3	GLP-1	1.0	无	-	×
比较例 4	G-CSF	1.0	无	-	×
比较例 5	EPO	1.0	无	-	×
比较例 6	INF α	1.0	无	-	×
比较例 7	INF γ	1.0	无	-	×
比较例 8	降血钙素	1.0	无	-	×
比较例 9	IL-2	1.0	无	-	×
比较例 10	IL-6	1.0	无	-	×
比较例 11	TNF α	1.0	无	-	×
比较例 12	白蛋白	1.0	无	-	×
比较例 13	胰岛素	1.0	无	-	×
比较例 14	GOT	0.1	无	-	×
比较例 15	γ -GGT	0.1	无	-	×
比较例 16	LDH	0.1	无	-	×
比较例 17	ALP	0.1	无	-	×
比较例 18	白蛋白	1.0	甘油	200	×
比较例 19	白蛋白	1.0	蔗糖	200	×
比较例 20	白蛋白	1.0	甘氨酸	200	×
比较例 21	白蛋白	1.0	赖氨酸	200	×
比较例 22	白蛋白	1.0	PEG6000	150	×
比较例 23	白蛋白	1.0	聚氧乙烯月桂基醚	50	×
比较例 24	白蛋白	1.0	吐温 80	50	△
比较例 25	白蛋白	1.0	吐温 80	100	×
比较例 26	白蛋白	1.0	PEG6000	150	×
比较例 27	白蛋白	1.0	豚	100	×
比较例 28	白蛋白	1.0	瓜氨酸	200	×
比较例 29	胰岛素	1.0	肉毒碱	100	×
比较例 30	胰岛素	10	PEG6000+吐温 80	60+1.0	×

[0084] 由于其中没有蛋白质,比较例 1 中的纯水得以稳定喷射而没有中断。然而,含有蛋白质的比较例 2-23 和 25-30 每个都根本不能喷射或少量喷射而不依赖于蛋白质的类型和

添加剂的存在或缺失。如比较例 14 描述的当加入表面活性剂吐温 80 时,在一些程度上发生喷射但是稳定性差。此外,当加入的吐温 80 的浓度增加时,相反根本观察不到喷射。另一方面,在实施例 1-8 个中,喷射得以正常和稳定进行。HPLC 分析的结果表明,在实施例 1-8 每个中,在喷射前和喷射后峰位置和峰面积没有改变,而且也没有发现液体组成的改变。

[0085] (实施例 9-31) (添加剂对多种蛋白质和浓度的效果)

[0086] 接着,选择精氨酸作为具有胍基的化合物并然后以某种浓度将其加入至各种蛋白质。在相同的喷射试验下通过与实施例 1 的方式相同的方式评估那些喷射液。

[0087] 在此,在试验所述实施例中研究的制剂和获得的结果在下面的表 2 中列出。

[0088] 表 2

[0089]

	蛋白质	蛋白质浓度 (mg/mL)	精氨酸浓度 (mg/mL)	喷射能力
实施例 9	胰岛素	1.0	10	△
实施例 10	胰岛素	1.0	50	○
实施例 11	胰岛素	5.0	100	○
实施例 12	胰岛素	10	200	○
实施例 13	胰岛素	10	100	○
实施例 14	白蛋白	1.0	50	△
实施例 15	白蛋白	1.0	100	○
实施例 16	白蛋白	3.0	100	△
实施例 17	白蛋白	3.0	200	○
实施例 18	GOT	0.1	50	○
实施例 19	γ-GTP	0.1	50	○
实施例 20	LDH	0.1	50	○
实施例 21	ALP	0.1	50	○
实施例 22	胰高血糖素	1.0	50	○
实施例 23	GLP-1	1.0	50	○
实施例 24	G-CSF	1.0	50	○
实施例 25	EPO	1.0	50	○
实施例 26	INF α	1.0	50	○
实施例 27	INF γ	1.0	50	○
实施例 28	降血钙素	1.0	50	○
实施例 29	IL-2	0.1	50	○
实施例 30	IL-6	0.1	50	○
实施例 31	TNF α	0.1	50	○

[0090] 由于蛋白质的浓度和类型,尽管需要的添加剂的不同,精氨酸的加入可以让各种蛋白质用热喷墨方法正常喷射。因此,证实精氨酸可以对多种蛋白质有效。此外,对其中观察到正常喷射的实施例进行 HPLC 测定法。结果表明,在喷射前和喷射后峰图没有变化并因而证实液体组成没有变化。

[0091] (实施例 32) (药理活性的确认)

[0092] 在实施例 10 中显示的组合物中,在喷射前和喷射后研究了所述组合物的药理学活性。为了进行试验,将体重约 250g 的 8 周大的雄性 Wistar 大鼠禁食 1 天并然后用戊巴比妥钠麻醉,接着从尾静脉收集血液。该状态定为基线。此后,通过热喷墨方法喷射具有实施例 10 的组合物溶液并收集,并然后皮下注射达到 1.6U/kg,接着在施用后 15、30、60 和 120 分钟从所述动物的尾静脉收集血液。离心收集的血液并然后将得到的血清接受血糖水平的测量 (6 只动物 / 组)。类似地检测还没有通过热喷墨方法喷射的缺少任何添加剂的胰

胰岛素溶液并提供作为对照。根据血糖水平的变化研究还没有通过热喷墨方法喷射的实施例 10 的施用溶液的样品是否存在药理学活性的变化。结果显示于图 7 中。

[0093] 试验结果表明,施用胰岛素的大鼠的血糖水平立即降低。因此,观察到胰岛素对血糖水平有抑制效果。比较而言,观察到还有没有通过热喷墨方法喷射的实施例 10 的制剂对血糖水平也显示出相似的抑制效果。关于血糖水平的抑制效果,在每个观察点没有观察到与比较例的显著不同。这证实,即使在用喷墨方法排出实施例 10 的制剂后,其活性仍然得以保持。

[0094] (实施例 33)(喷射的效率)

[0095] 通过热喷墨方法喷射含有 1.0mg/ml 浓度的溶液并然后相对于添加剂存在或缺失评估喷射的量,确认其重复性。

[0096] 喷射溶液是:通过加入 1.0mg/ml 精氨酸至 1.0mg/ml 的胰岛素溶液制备的溶液(Ins/Arg);通过加入 1.0mg/ml 的吐温 80 至 1.0mg/ml 的胰岛素溶液制备的溶液(Ins/Tw);和仅含有 1.0mg/ml 胰岛素的溶液。用气泡喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i,由佳能公司生产)喷射那些溶液,所述的泡喷墨打印机是重新改造的产品用于收集溶液。将类似喷射的纯水的喷射量定义为 100%。图 8 显示了每种溶液的喷射量的图。对每种溶液进行 5 次试验。显示了平均偏差和标准偏差。

[0097] 仅加入胰岛素的溶液的喷射量很少或没有,并且喷射的效率十分低。加入了吐温 80 中的胰岛素的溶液的喷射量是纯水的喷射量的约 40%。然而,在这种情形中,由于喷射量的变化而没有再现性。另一方面,加入了精氨酸的胰岛素的溶液显示了与喷射的纯水的喷射量几乎相同的喷射量并且也显示了高的重现性。当进行类似喷射时,加入精氨酸中的胰岛素的溶液的喷射量比仅加入胰岛素的溶液的喷射量的 100 倍或更高。此外,其为加入吐温 80 中的胰岛素的溶液的喷射量高约 2.5 倍。因此,证实喷射效率增加很多。

[0098] (实施例 34-52)(具有胍基的化合物与表面活性剂的协同效果)

[0099] 制备喷射液,将表面活性剂加入至加入蛋白质中的具有胍基的化合物的溶液。将得到的喷射液通过与实施例 1 相同的喷射试验进行评估。在此,在所述实施例中研究的制剂和获得的结果在下面的表 3 中列出。

[0100] 表 3

[0101]

	蛋白质	蛋白质浓度 (mg/mL)	精氨酸浓度 (mg/mL)	吐温 80 浓度 (mg/mL)	喷射能力
实施例 34	白蛋白	1.0	10	10	○
实施例 35	白蛋白	5.0	50	20	○
实施例 36	白蛋白	10	200	10	○
实施例 37	胰岛素	10	50	5.0	○
实施例 38	胰岛素	40	200	10	○
实施例 39	GOT	0.1	5.0	5.0	○
实施例 40	γ -GTP	0.1	5.0	5.0	○
实施例 41	LDH	0.1	5.0	5.0	○
实施例 42	ALP	0.1	5.0	5.0	○
实施例 43	胰高血糖素	1.0	10	10	○
实施例 44	GLP-1	1.0	5.0	5.0	○
实施例 45	G-CSF	1.0	10	10	○
实施例 46	EPO	1.0	5.0	5.0	○
实施例 47	INF α	1.0	10	10	○
实施例 48	INF γ	1.0	10	10	○
实施例 49	降钙血素	1.0	10	10	○

实施例 50	IL-2	0.1	5.0	5.0	○
实施例 51	IL-6	0.1	5.0	5.0	○
实施例 52	TNF α	0.1	5.0	5.0	○

[0102] [0102] 当同时加入精氨酸和吐温 80 时,有可能以比仅加入精氨酸的溶液的浓度小很多的浓度喷射蛋白质溶液。此外,它以仅加入精氨酸的溶液不能被喷射的浓度喷射。而且,整体上添加剂的量大大降低。而且,有可能喷射具有协同效果的高浓度的蛋白质溶液。在实施例 19-24 每个上进行的 HPLC 测定法的结果表明,在喷射前和喷射后峰图没有变化并且在所述的液体组合物中没有发现变化。

[0103] (实施例 53)

[0104] (用喷墨打印机和传感器制备抗体芯片)

[0105] 图 9 显示了这个实施例的模型。在图 9 中,数字 30 是基板,31 是掩蔽剂,以及 32 是以特定方式与测试物质反应的物质(例如蛋白质或肽),33 是测试物质,34 是对所述测试物质特异性的物质,并且 35 是标记物,它们通过图示表示。在 PBS 中以 0.1-500 μ g 的浓度制备每种人 IL2 单克隆抗体、人 IL4 多克隆抗体和人 IL6 单克隆抗体。在此,加入 L-精氨酸至 1% (w/w) 来制备喷射液。将得到的溶液充满喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i,由佳能公司生产)的头部并喷射至聚-L-赖氨酸包被的载物玻璃上。

[0106] 喷射后将所述的玻璃在 4℃ 下孵育,并然后将孵育过的玻璃用 1% 的 BSA 遮蔽。遮蔽后,十分仔细地洗涤所述的玻璃并然后提供作为抗芯片基板。

[0107] 将所述的芯片和待测物质(重组 IL2、IL4 和 IL6,每种 1 μ g/ml)在 PBS 中分别与 1.0% L-精氨酸 (w/w)、0.5% 吐温 20 (w/w) 和 0.1% BSA (w/w) 一起制备。将得到的溶液充满喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i,由佳能公司生产)的头部并然后以相同的模式喷射至上面的基板上。排出后,将盖玻片放置在所述的基板上并让其在 4℃ 下反应。反应后,十分仔细地洗涤得到生成物并干燥。

[0108] 随后,将所述的基板与可以特异性地连接至样品上的物质反应,并然后标记所述的物质。将每种用生物素标记的作为特异性结合于样品的物质的抗体(生物素化的人 IL2 单克隆抗体、生物素化的人 IL4 单克隆抗体和生物素化的人 IL6 单克隆抗体)溶液与 1.0% 的 L-精氨酸 (w/w)、0.5% 吐温 20 (w/w) 和 0.1% BSA (w/w) 一起在 PBS 中制备而达到 0.1 μ g/ml 的终浓度,随后充满喷墨打印机(商品名:PIXUS950i,由佳能公司生产)并然后以相同的模式喷射在上面的基板上。排出后,将盖玻片放置在所述的基板上并让其在 4℃ 下反应。反应后,十分仔细地洗涤得到生成物并干燥。

[0109] 对于标记,将 10 μ g/ml Cy3-标记的抗生物素蛋白链霉素在 PBS 制备而得到 1.0% L-精氨酸 (w/w)、0.5% 吐温 20 (w/w) 和 0.1% BSA (w/w) 的终浓度,随后充满喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i,由佳能公司生产)并然后以相同的模式喷射在上面的基板上。排出后,将盖玻片放置在所述的基板上并让其在 4℃ 下反应。反应后,十分仔细地洗涤得到生成物并干燥。

[0110] 此后,施加及发光至反应后的基板上并然后用荧光扫描仪测量关于 Cy3 的荧光信号,在所述的荧光扫描仪上置有具有 532nm 传输波长的滤波器。随后,检测依赖样品的类型和浓度的荧光信号。

[0111] 本申请案要求于 2004 年 9 月 27 日申请的日本专利申请 2004-279864 和于 2005 年 8 月 31 日申请的日本专利申请 2005-252154 的优先权,在此将其通过全文引用作为参考。

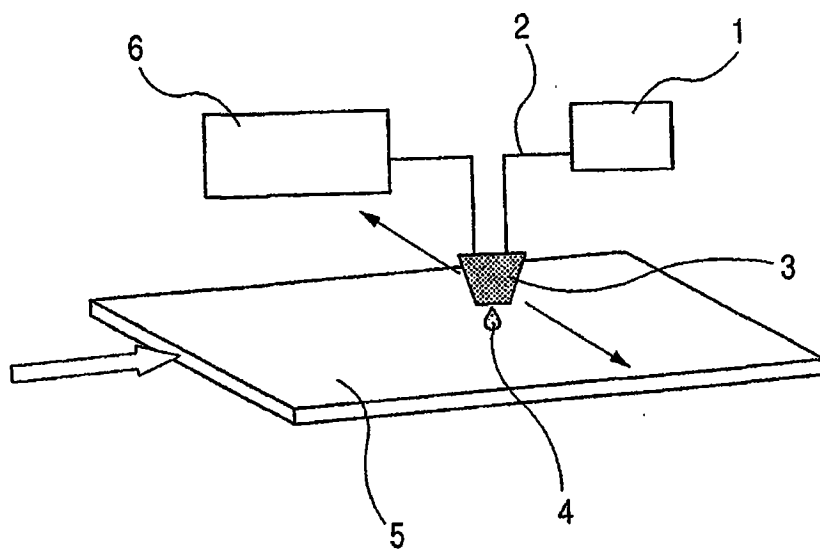


图 1

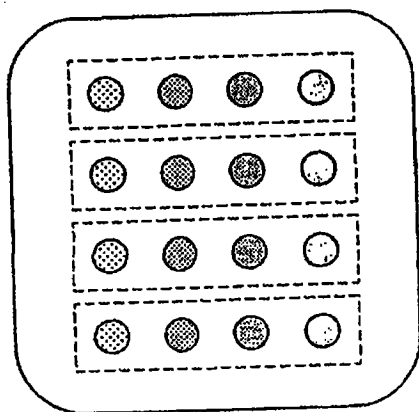


图 2

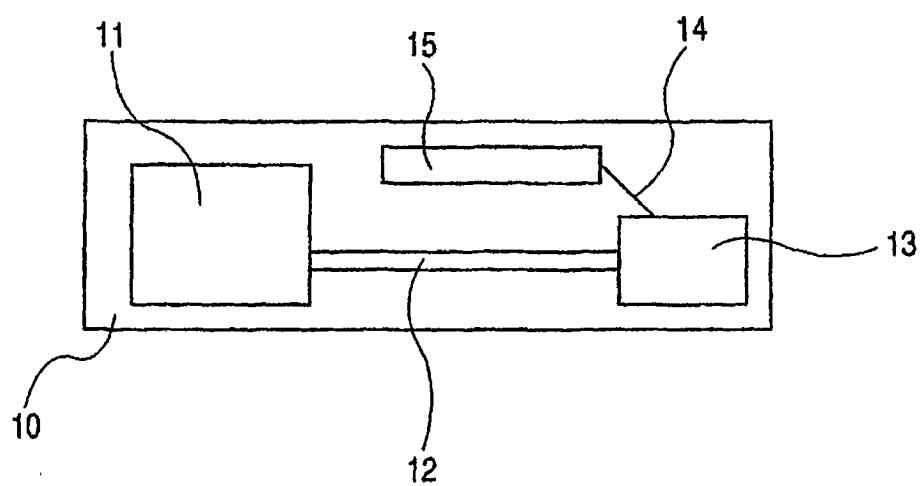


图 3

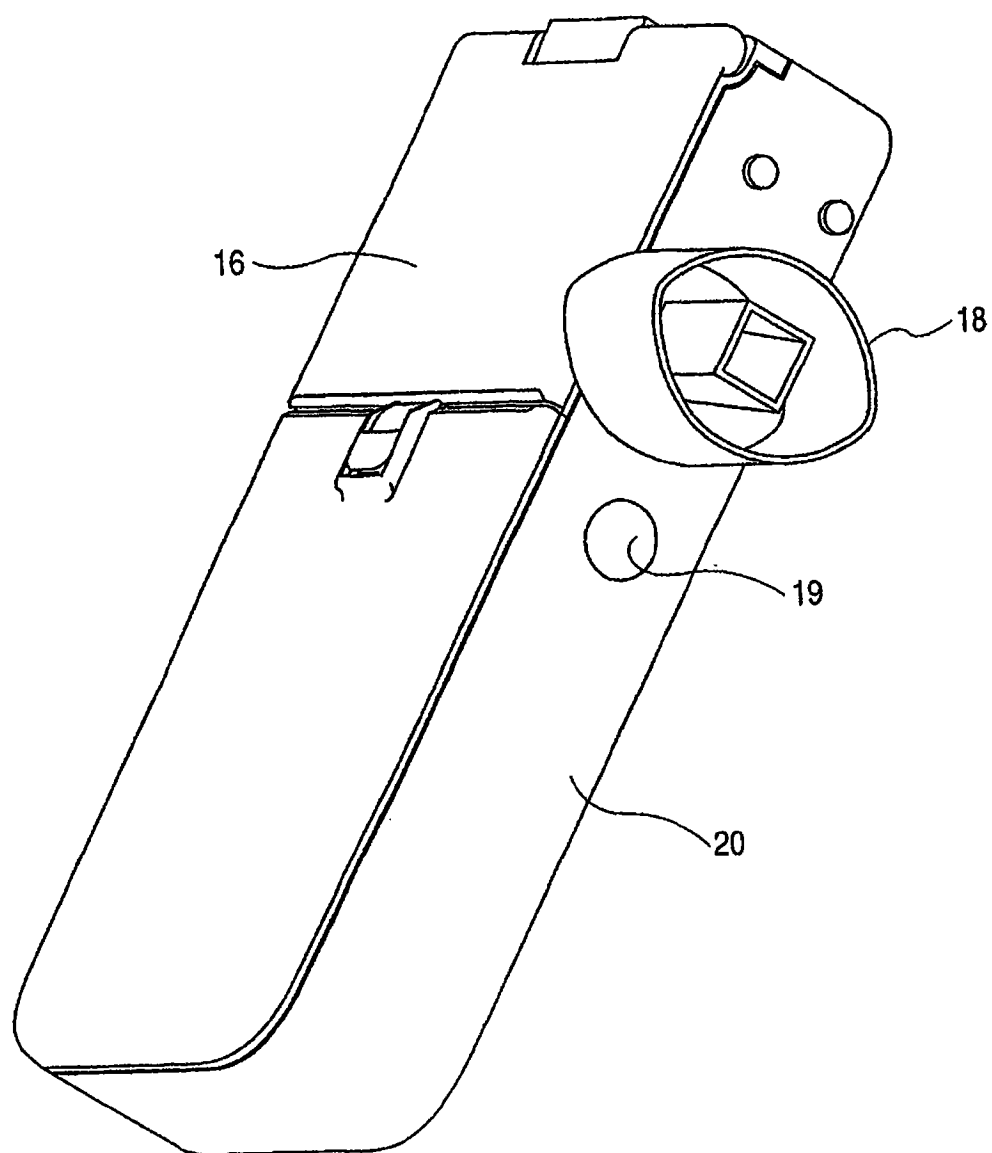


图 4

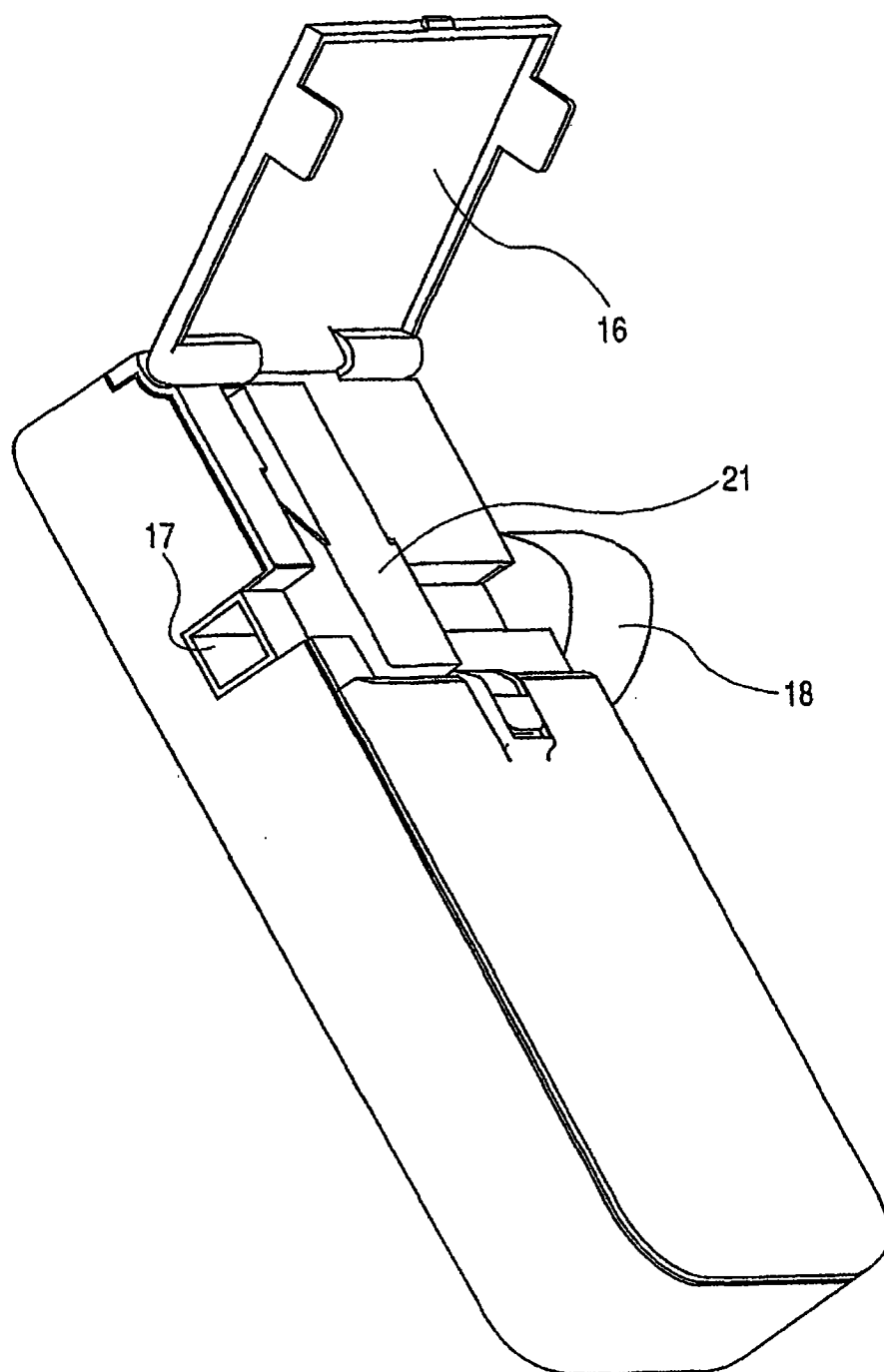


图 5

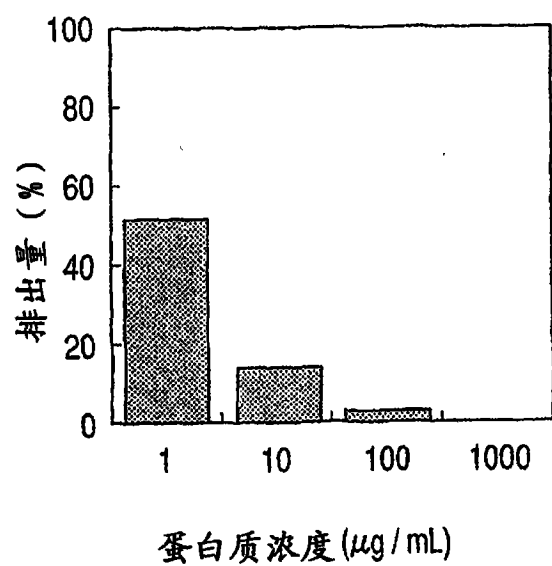


图 6

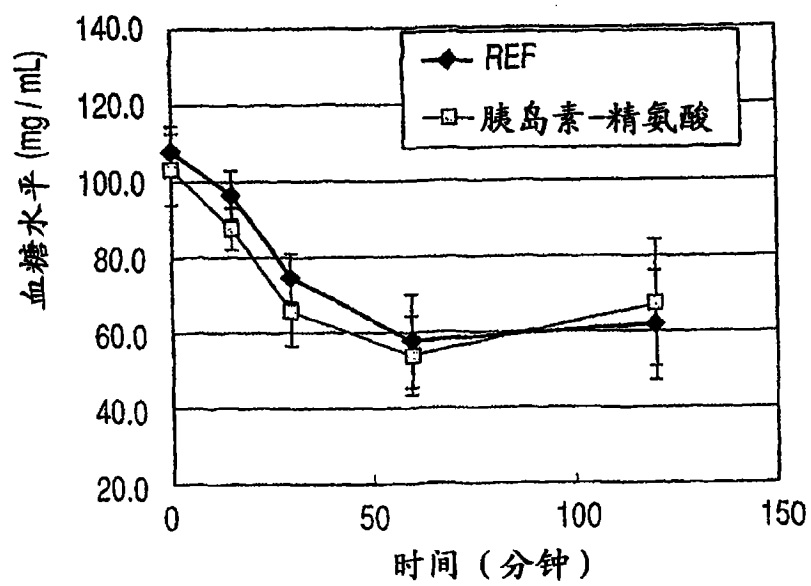


图 7

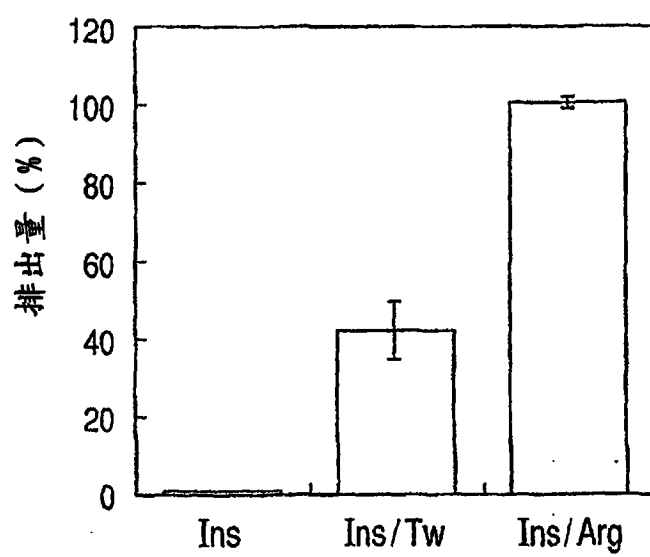


图 8

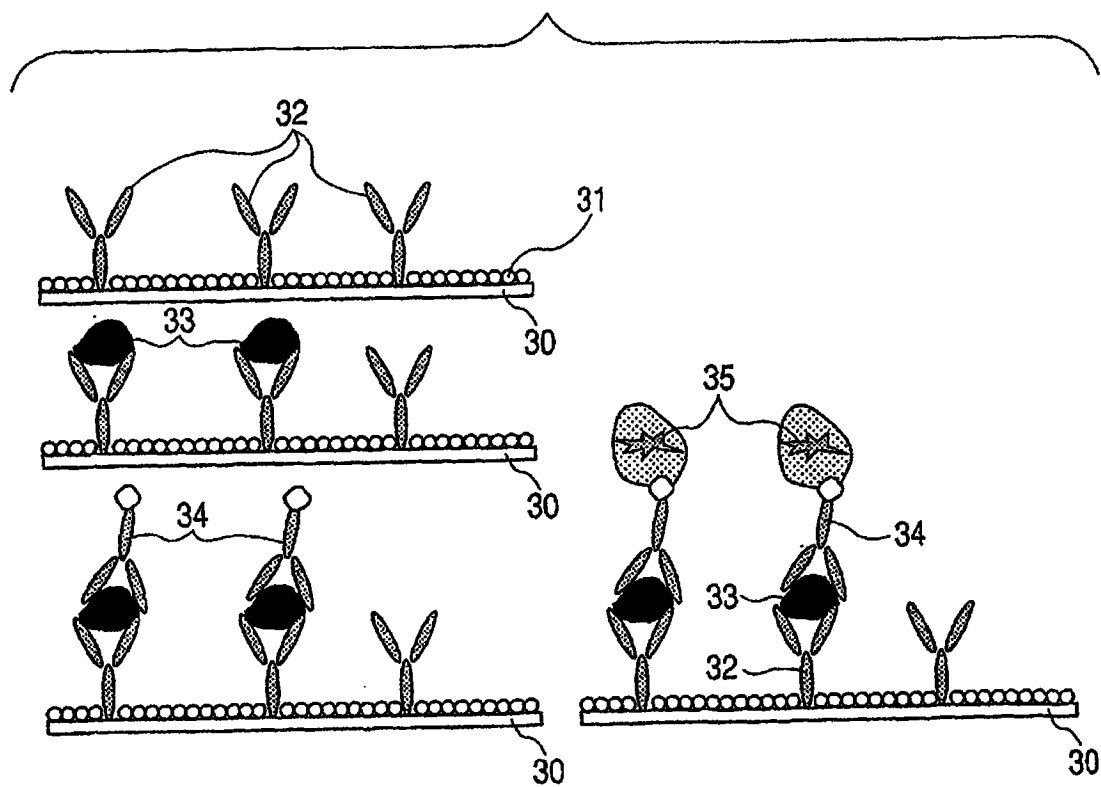


图 9