



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101027076 B

(45) 授权公告日 2011. 06. 15

(21) 申请号 200580032497. 4

A61K 47/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 09. 22

A61K 9/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 47/34 (2006. 01)

279864/2004 2004. 09. 27 JP

A61K 9/72 (2006. 01)

252270/2005 2005. 08. 31 JP

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

CN 1446077 A, 2003. 10. 01, 说明书第 12 页第 3 段到第 13 页第 2 段.

2007. 03. 26

CN 1464791 A, 2003. 12. 31, 权利要求 1-10、

(86) PCT申请的申请数据

实施例 1 和说明书第 3 页最后一段.

PCT/JP2005/018070 2005. 09. 22

审查员 曹丙洲

(87) PCT申请的公布数据

W02006/035923 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)

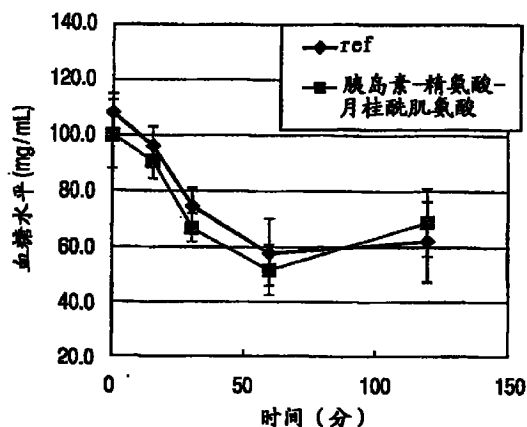
权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 6 页

(54) 发明名称

喷射液、喷射方法、形成液滴的方法、液体喷射盒和喷射装置

(57) 摘要

提供了能够基于使用热能的系统稳定喷射的喷射液(即使该液体含有至少一种选自蛋白质和肽的物质),和使用这种系统喷射含有至少一种选自蛋白质和肽的物质的液体的方法和装置。通过在含有至少一种选自蛋白质和肽的物质的水溶液中添加至少一种选自氨基酸及其盐的物质和表面活性剂,改进了该液体在使用热能的喷墨系统中的适用性。



1. 用于利用热喷墨系统喷出喷射液体的喷射液,其特征在于在含有水作为主要成分的液体介质中包含至少一种选自蛋白质和肽的物质、至少一种选自氨基酸及其盐的物质、和表面活性剂,氨基酸是指选自脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、苏氨酸和丙氨酸的至少一种,至少一种选自蛋白质和肽的物质是至少一种选自降钙素、胰岛素、胰高血糖素、干扰素、蛋白酶抑制剂、细胞因子、生长激素、造血因子蛋白、抗体和上述蛋白质和肽的类似物、衍生物和化学改性物的物质。

2. 根据权利要求1的喷射液,其特征在于氨基酸是指选自脯氨酸和甘氨酸的至少一种。

3. 根据权利要求1的喷射液,其特征在于表面活性剂是选自非离子型表面活性剂和氨基酸表面活性剂的至少一种。

4. 根据权利要求1的喷射液,其特征在于表面活性剂是选自聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、烷基酰胺-烷基甜菜碱、N-酰基肌氨酸、N-酰基谷氨酸、N-酰基甘氨酸和精氨酸脂肪酸盐的至少一种。

5. 根据权利要求1的喷射液,其特征在于相对于1重量份的蛋白质和肽,包含1重量份至200重量份的氨基酸及其盐和0.01重量份至100重量份的表面活性剂。

6. 液体喷射盒,其特征在于包含储存根据权利要求1的喷射液的罐和喷头,喷头通过热喷墨系统喷射液体。

7. 喷射装置,其特征在于包含根据权利要求6的盒、以及流路和开口部分,该开口部分用于将从该盒的喷头的液体喷射部件中喷出的液体导入使用者的吸入位置。

8. 用于被使用者从口中吸入的根据权利要求7的喷射装置。

喷射液、喷射方法、形成液滴的方法、液体喷射盒和喷射装置

技术领域

[0001] 本发明涉及适用于形成液滴的含有至少一种蛋白质和肽的液体组合物和形成液滴的方法,以及使用这种形成液滴的方法的喷射装置。

背景技术

[0002] 目前,已经进行了许多以液滴形式使用蛋白质溶液的尝试。蛋白质溶液的这种液滴及其技术被应用于经粘膜给药的给药方法和需要极小量蛋白质的生物芯片和生物传感器。此外,在控制蛋白质晶体和筛选生理活性物质时形成微小蛋白质液滴的方法正引起关注(参看日本专利申请公开 2002-355025, Allain LR 等人" Fresenius J. Anal. Chem. ", 2001, 371 卷, p. 146-150 和 Howard EI, Cachau RE" Biotechniques", 2002, 33 卷, p. 1302-1306)。

[0003] 最近,已经开始通过基因重组技术大规模制造蛋白质,特别是酶和具有生理活性的有用蛋白质。在这些情况下,形成蛋白质液滴的方法可能是筛选和使用新型蛋白质类药物和开发应用领域的有效工具。其中,将各种药物以微小液滴形式施用于患者的方法具有提高的重要性。特别地,经肺施用包括蛋白质和肽在内的生物物质的方式变得重要。肺具有表面积高达 50 至 140m² 的肺泡和厚度极薄到 0.1 μ m 的充当吸附屏障的上皮,以及具有与消化道相比极低的酶活性。因此,对于以胰岛素为代表的大分子肽基药物,肺已经作为代替注射途径的潜在给药途径受到关注。

[0004] 通常,药物的微小液滴在肺内的沉积根据质量中值空气动力直径而变化。对于肺泡,为了将液滴输送给在肺最深处的肺泡,必须以高再现性施用具有在 1 至 5 μ m 内的窄粒度分布的液滴。因此,要求开发出能够实现这种施用的施用形式和稳定的药物制剂。

[0005] 有一些在体内,尤其是在呼吸器官周围施用药物制剂的传统方法。下面将描述这些方法。

[0006] 在使用液化不可燃气体或阻燃气体作推进剂以气溶胶形式施用悬浮液的定量吸入器(MDI)中,由于调节单位体积,即在单次喷雾操作时间中供应的液化气的体积,因此可以喷出恒定量的液滴。然而,在通过调节液化气的单位体积来控制液滴尺寸时,仍然存在未解决的问题。此外,很难说推进剂是对健康有利的。

[0007] 在含有水或乙醇作为介质的液体试剂的喷雾法中,通过将其与加压载气一起通过毛细管喷出,将液体试剂转化成微小液滴。因此,理论上可以通过调节供应到毛细通道中的液体试剂的量来控制液滴的喷射量。然而,仍然难以控制液滴尺寸。

[0008] 特别地,在喷雾法中,用于将液体试剂转化成微小液滴的加压气体也被用作传送喷出的微小液滴的气体载体(气流)。因此,结构上难以根据预期用途改变漂浮在载气气流中的微小液滴的量(密度)。

[0009] 在文献中提出了形成具有窄粒度分布的液滴的方法(美国专利 5894841 和日本专利申请公开 2002-248171)。在这种方法中,通过液滴生成器基于喷墨印刷中所用的液体喷

射原理形成极细液滴。在根据该喷墨系统的液体喷射中,将喷射液导入小室,然后对液体施加物理力,由此将液体以液滴形式从孔中推出。当通过热换能器(例如薄膜电阻器)经过在室顶部形成的孔(喷射口)推出液体时,产生气泡(气泡喷射系统和热喷墨系统)。可以利用压电振动器直接经过室顶部的孔推出液体(称作压电喷墨系统)。将液体引入室和孔并入打印头元件,将其进一步连接到液体供给源以及控制液滴喷射的控制器上。

[0010] 为了使肺吸收药物,特别是蛋白质/肽制品,必须精确控制药物剂量。考虑到这一点,非常优选基于喷墨系统的原理形成液滴,因为可以控制喷射量。在该系统中,尽管要求无误地喷射液体,但仅调节了表面张力和粘度的蛋白质/肽溶液不能稳定喷射,且有时难以以高再现性和高效率喷射。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供喷射液(液体组合物)——其基于使用热能的喷射系统稳定喷射以形成含有至少一种选自蛋白质和肽的物质的液滴,和适用于喷射该喷射液的方法和装置。

[0012] 根据本发明,提供了在利用热能从喷射口喷出喷射液的系统中使用的喷射液,其特征在于在含有水作为主要成分的液体介质中包含至少一种选自蛋白质和肽的物质、至少一种选自氨基酸及其盐的物质、和表面活性剂。

[0013] 根据本发明,提供了基于喷墨系统的原理喷出喷射液的方法。

[0014] 根据本发明,提供了液体喷射盒,其特征在于包含储存喷射液的罐和基于热喷墨系统的原理的喷头。

[0015] 根据本发明,提供了通过对液体施加热能来形成含有至少一种选自蛋白质和肽的物质的喷射液的液滴的方法,其特征在于该方法包括对填充在流路中的液体施加热能的步骤,由此将液体以液滴形式从与该流路相联的喷射口中喷出,且该液体是上述喷射液。

[0016] 根据本发明,基于通过施加热能从喷射口喷出液体的系统实现稳定喷射用的喷射液可以通过在含有至少一种选自蛋白质和肽的物质的溶液中添加氨基酸和表面活性剂来获得。如果喷射液含有至少一种选自蛋白质和肽的物质作为药物成分,将其从便携式喷射装置中喷出以形成液滴并让使用者吸入它们。由此,药物成分,其是至少一种选自蛋白质和肽的物质,可以到达肺并随后被肺吸收。此外,通过该方法将液滴喷到基板上,由此可以制备生物芯片和生物传感器,并用于感知和筛选生物物质。

[0017] 根据与附图结合的下列描述,本发明的其它特征和优点是显而易见的,在附图中,类似的参考符号是指相同或类似的部件。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1 是显示将蛋白质喷到基板上的方法的示意图;

[0020] 图 2 是分布在基板上的蛋白质液滴的图案;

[0021] 图 3 是吸入器的喷头盒单元的示意图;

[0022] 图 4 是吸入器的透视图;

[0023] 图 5 是检修盖(access cover)打开的图 4 的吸入器的透视图;

[0024] 图 6 显示了当根据气泡喷射系统喷射白蛋白溶液时的喷射量;

[0025] 图 7 显示了当施用胰岛素时,随时间经过大鼠的血糖水平;

[0026] 图 8 显示了当通过气泡喷射系统喷射胰岛素溶液时的喷射量；

[0027] 图 9 是显示实施例的实验方法的模型。

具体实施方式

[0028] 现在根据附图详细描述本发明的优选实施方案。

[0029] 现在,详细解释本发明。本发明中使用的蛋白质是指由许多氨基酸经由肽键键合而构成的并能够溶解或分散在水性溶液中的多肽。本发明中使用的肽是由 50 个或更少(均包括)的经由肽键键合的氨基酸构成的。蛋白质/肽可以化学合成,或从天然来源中提纯;但通常是天然蛋白质/肽的重组体。通常,通过将氨基酸残基共价键合到蛋白质/肽分子上,将蛋白质/肽化学改性。依靠这种改性,可以延长并改善蛋白质/肽的治疗效果。

[0030] 在进行本发明时,可以使用希望成为液滴的各种类型的蛋白质和肽。对本发明中可用的蛋白质和肽没有特别限制,只要它们对机体具有生理活性并在机体内发挥作用。最通常地,将本发明的蛋白质/肽形成液滴,这适于将治疗有效的蛋白质/肽输送到肺中。

[0031] 这种蛋白质/肽的例子包括造血因子,例如降钙素、凝血因子、环孢素、G-CSF、GM-CSF、SCF、EPO、GM-CSF 和 CSF-1;白细胞介素,例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11 和 IL-12;IGFs;和细胞因子,包括 M-CSF、胸腺素、TNF 和 LIF。此外,其它可用的治疗有效肽的例子包括血管活性肽、干扰素(例如 α -, β -, γ -或普通干扰素)、生长因子或激素(例如人生长激素或其它动物生长激素,例如牛、猪和鸟生长因子和其它)、胰岛素、催产素、血管紧张素、甲硫氨酸脑啡肽、物质 P、ET-1、FGF、KGF、EGF、IGF、PDGF、LHRH、GHRH、FSH、DDAVP、PTH、后叶加压素、胰高血糖素和生长激素释放抑制因子。可以使用蛋白酶抑制剂,例如亮肽素、抑胃肽、和金属蛋白酶抑制剂(例如 TIMP-1、TIMP-2 和其它蛋白酶抑制剂);神经生长因子,例如 BDNF 和 NT3;血纤维蛋白溶酶原活化因子,例如 tPA、尿激酶和链激酶;和具有母体肽主结构的全部或部分并具有母体肽的至少一部分生物特征的蛋白质的部分肽片段。还可以使用通过取代或删除形成的类似物、或改性氨基酸(例如肽类似物)、用水溶性聚合物(例如 PEG 和 PVA)改性的上述物质。文献中已经证实,上述蛋白质/肽可以输送到肺中(Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 12(2&3) (1995))。

[0032] 此外,用于制备生物芯片和生物传感器并用于筛选蛋白质/肽的物质的例子包括上述蛋白质和肽,并进一步包括酶,例如氧化酶、还原酶、转移酶、水化酶、裂合酶、异构酶、合成酶、表异构酶、变位酶和消旋酶;抗体,例如 IgG 和 IgE,其受体和抗原;和诊断中使用的蛋白质/肽,例如过敏原、伴侣蛋白、抗生物素蛋白和生物素,用固定试剂将上述物质改性。

[0033] 喷射液中所含的蛋白质/肽可以具有 0.3k 至 150kDa 的分子量。选自上述例子的至少一种蛋白质/肽在喷射液中的含量根据预期用途和蛋白质/肽的类型而变化,优选选自 1 μ g/ml 至 200mg/ml,更优选 0.1mg/ml 至 60mg/ml。

[0034] 已知的是,通过添加表面活性剂和溶剂(例如乙二醇),通常可以改进根据喷墨系统的油墨喷射性能。然而,当喷射含有至少一种蛋白质/肽的溶液时,简单添加它们并不能改进喷射性能。因此,需要新的添加剂。

[0035] 根据本发明人的研究,已经证实,当根据热喷墨系统喷射含有足以表现出有效生理活性的浓度的蛋白质/肽且不含添加剂的液体时,如果分子量为 3000 或更高,液体基本

不能以 20kHz 的喷射频率喷射,尽管喷射状态根据蛋白质 / 肽的类型而变化。

[0036] 当对本发明使用热喷墨系统时,获得最佳喷射性能。因此,下面基于热喷墨系统的原理描述构造。

[0037] 当使用热喷墨系统时,可以提高喷射口的孔径,提高用于喷射的热脉冲的热量,改进用于喷射的微型加热器等的尺寸精度并改进再现性。因此,可以在高密度排列在喷头上的所有液体喷射单元中获得具有窄尺寸分布的液滴。由于喷头可以以低成本制备,其可以有效用于必须频繁更换其喷头的小型装置。因此,当需要便携性和方便性时,热喷墨系统的液体喷射装置是优选的。

[0038] 在喷墨系统中,将液体形成液滴并喷射。喷墨系统的可控制性有利地高,即使使用极其痕量的液体。作为根据喷墨系统喷出极细液滴的系统,使用压电设备的振动系统和使用微型加热器的热喷墨系统是已知的。

[0039] 在使用压电设备的振动系统中,所用压电设备的小型化程度受到限制,因此分布在每单位面积上的喷射口的数量受到限制。随着分布在每单位面积上的喷射口的数量提高,这些喷射口的制造成本极大提高。相反,在热喷墨系统中,所用微型加热器相对容易小型化,结果与使用压电设备的振动系统相比,可以提高分布在每单位面积上的喷射口的数量,并可以显著降低这些喷射口的制造成本。

[0040] 在使用热喷墨系统的情况下,必须控制待喷射液体的物理性质以适当地控制喷雾状态和从各个喷射口中喷出的微液滴的液体量。更具体地,为了获得合意量的微小液滴,考虑溶剂的类型和组成和溶质的浓度,研究构成待喷射液体样品的液体的组成。

[0041] 此外,基于热喷墨系统的原理,对液滴喷射机制进行各种技术开发。本发明适合用于液体喷射机制。在安装在打印机中的普通喷墨头中,喷出的每一液滴的液体量仅为大约数微微升。作为对比,已经开发出用于获得极细液滴(各自含有大约亚微微升或毫微微升的液体)的喷射机制和方法(日本专利申请公开 2003-154655)。

[0042] 当向数微米的体细胞的对象施用药物时,药物可以以上述极细液滴形式喷射。

[0043] 当基于喷墨系统的原理形成蛋白质 / 肽的液滴时,蛋白质 / 肽的脆弱构型具有问题。更具体地解释,当这种构型被破坏时,蛋白质 / 肽聚集和分解,这可能影响合适的喷射操作。

[0044] 在基于喷墨系统的原理形成液滴时施加的物理力,例如压力、剪切力和微小液滴固有的高表面能,致使许多蛋白质和肽的构型不稳定(当使用气泡喷射系统和热喷墨系统时,施加与上述力不同的热)。

[0045] 特别地,当利用喷墨系统形成液滴时,不仅需要喷射液本身的长期储存稳定性,还需要对上述各种负荷的耐受性和稳定性。更具体地,上述物理作用远大于通过一般搅拌操作和热处理施加的剪切力和热能(例如,在热喷墨系统的情况下,可以在大约 300℃ 瞬间施加 90 大气压的载荷)。此外,由于同时施加多个物理力,与在一般条件下处理蛋白质的情况相比,蛋白质的稳定性往往更容易降低。因此,传统的稳定化技术本身不足以保持稳定性。当产生这种问题时,蛋白质 / 肽聚集,从而堵塞喷嘴。因此,难以喷出液滴。

[0046] 此外,由于适合被肺吸入的 1 至 5 微米大小的液滴与目前市售打印机的一般液滴的尺寸(16 微米)相比非常小,液滴会受到更大的表面能和剪切力。因此,非常难以喷射这种适合被肺吸入的蛋白质 / 肽的微小液滴。

[0047] 另一方面,作为使蛋白质/肽稳定的方法,添加表面活性剂、甘油、各种糖、水溶性聚乙二醇和白蛋白是已知的。此外,已知的是,通过在促红细胞生成素、G-CSF 和干扰素中添加氨基酸的方法获得蛋白质类制品的长期储存稳定性(日本专利 03618633、W002/017957 和国际专利申请的国家公开 2003-510368)。然而,按照本发明人等的研究,根据蛋白质/肽的类型和浓度和添加剂的浓度,不可能根据热喷墨系统喷射液滴。

[0048] 此外,添加适合用在喷墨打印油墨中的添加剂是已知的,更具体地,多元醇(例如乙二醇和甘油)和湿润剂(例如脲)。然而,根据本发明人的研究,即使添加这些添加剂,它们对改进蛋白质/肽的喷射性能几乎没有作用。

[0049] 已知的是(WO 02/094342),根据热喷墨系统,在用于形成被肺吸入的液滴的蛋白质/肽的液体组合物中添加用于控制表面张力的化合物和湿润剂。在这种情况下,添加表面活性剂和水溶性聚合物,例如聚乙二醇,从而通过溶液的表面张力和粘度以及保水作用来提高溶液的蛋白质/肽在液滴中的稳定性。

[0050] 然而,在 WO 02/094342 的小册子中没有提到喷射稳定性。

[0051] 此外,根据本发明人等的研究,发现仅添加表面活性剂和水溶性聚合物对取决于蛋白质/肽类型的喷射稳定性的改进几乎没有作用。当蛋白质/肽的浓度高时,添加剂的作用不足,相反,添加剂本身可能抑制喷射稳定性。

[0052] 此外,在许多情况下,表面活性剂单独不产生任何作用,这表明通过表面张力和粘度或保水作用不能调节蛋白质/肽溶液的喷射稳定性。

[0053] 换言之,当通过热喷墨系统喷射蛋白质/肽时,不能使用上述文献中所述的方法作为确保喷射稳定性的指导方针。

[0054] 根据上述发现,为了获得确保喷射稳定性的指导方针,本发明人研究了用于稳定喷射的含有蛋白质/肽的液体以实现本发明。

[0055] 为了通过热喷墨系统喷射蛋白质/肽来利用蛋白质/肽,在专利 03610231 和 WO 02/092813 中公开了形成蛋白质芯片的方法。

[0056] 然而,没有描述是否实际上稳定地喷射蛋白质/肽。

[0057] 本发明人深入细致地进行研究并发现,含有至少一种蛋白质和肽作为活性成分并补充了氨基酸、其盐和表面活性剂的溶液可以根据使用热能的喷墨系统的原理稳定地喷射。

[0058] 令人惊奇地,在根据喷墨系统进行喷射时,仅补充了氨基酸的含有蛋白质/肽的溶液或仅补充了表面活性剂的含有蛋白质/肽的溶液对喷射稳定性几乎没有作用。虽然这两种物质本身各自几乎没有作用,但如果结合,它们产生高的协同作用。因此,含有蛋白质/肽的溶液可以通过喷墨系统非常稳定地喷射。

[0059] 氨基酸和表面活性剂在结合时极其有助于含蛋白质/肽的溶液的喷射稳定性的原因尚不清楚,但推测如下。在同时添加了表面活性剂和氨基酸的溶液中,表面活性剂的临界胶束浓度和发泡能力没有发生变化。由此,氨基酸可能很弱地与蛋白质/肽相互作用,结果氨基酸在蛋白质/肽表面上的浓度提高。在这种状态下,如果含有蛋白质/肽的溶液根据热喷墨系统喷射,对蛋白质/肽施加载荷而暴露出蛋白质/肽的疏水部分。氨基酸与暴露出的疏水部分反应以抑制其它蛋白质和肽粒子之间的碰撞,从而使聚集困难。氨基酸的作用足以使蛋白质和肽的溶液保持原样,但不足以使受到喷射施加的载荷的溶液稳定。因

此,在蛋白质/肽的溶液中单独添加氨基酸被认为不能产生任何作用。

[0060] 另一方面,表面活性剂可能作用于水中的不溶物质(沉淀物)(其是在由于喷射过程中的载荷而暴露出蛋白质/肽的疏水部分时或在从蛋白质/肽中去除水分子时产生的),或作用于聚集体(其是通过疏水部分的相互作用产生的),由此使沉淀物和聚集体再溶于水。然而,单独表面活性剂不能抑制蛋白质/肽的聚集或帮助蛋白质和肽保持水分子。因此,表面活性剂的再溶解作用被认为太低而不能确保喷射稳定性。

[0061] 如上所述,据推测,这两种不同的效应结合发挥作用以使水中一定程度上不可避免生成的沉淀物和聚集体迅速再溶解,同时防止产生大量聚集,结果可以使热能稳定地转移到溶液中以使喷射稳定化。

[0062] 在进行本发明时,热喷墨头的驱动频率越低越好。喷墨稳定性根据驱动频率变化,因为当通过热喷墨头的加热器加热喷射液时,蛋白质/肽变得部分不溶于水,从而防止来自加热器的能量转移到溶液中。当驱动频率低时,即使随时产生不溶物,它们也可以再溶解直至下一次驱动操作。相反,当驱动频率高时,在下一驱动操作之前,再溶解未充分进行,从而降低喷射稳定性。然而,为了有效喷射大量溶液,必须以一定水平之上的高频率进行喷射。本发明中的优选驱动频率为 0.1kHz 至 100kHz,更优选为 1kHz 至 30kHz。

[0063] 术语“氨基酸”是指含有氨基和羧基且在它们之前有碳原子的化合物。本发明的氨基酸代表构成机体的蛋白质和肽中存在的 20 种氨基酸。此处所用的氨基酸可以是 D- 形或 L- 形的。

[0064] 优选氨基酸的例子包括精氨酸、脯氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸和它们的盐。其中,优选使用的是精氨酸、脯氨酸和甘氨酸和它们的盐。

[0065] 根据蛋白质/肽的类型和含量,选择选自氨基酸及其盐的至少一种物质在喷射液中的含量,其优选选自 10 μ g/ml 至 2.0g/ml,更优选 1.0mg/ml 至 200mg/ml。

[0066] 本发明中使用的术语“表面活性剂”是指在单个分子中同时具有极性部分和非极性部分,换言之,具有经由次价键(例如离子键)连接的极性部分和非极性部分的化合物。表面活性剂不仅通过在界面处排列分子来降低两种不混溶相之间的表面张力,还具有形成胶束的特征。换言之,表面活性剂是在彼此远离的区域局部含有这些极性和非极性部分的化合物。

[0067] 在此可用的表面活性剂不受限制,并优选为选自食品和医药领域所用的非离子表面活性剂和氨基酸表面活性剂的至少一种。

[0068] 这种表面活性剂的典型例子包括脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如脱水山梨糖醇单辛酸酯、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯;N-酰基氨基酸,其是含有氨基酸作为亲水基团的表面活性剂,例如 N-椰子油脂肪酸甘氨酸、N-椰子油脂肪酸谷氨酸盐、和 N-月桂酰谷氨酸;氨基酸脂肪酸盐;甘油脂肪酸酯,例如甘油单辛酸酯、甘油单肉豆蔻酸酯、和甘油单硬脂酸酯;聚甘油脂肪酸酯,例如单硬脂酸十甘油酯、二硬脂酸十甘油酯、和单亚油酸十甘油酯;聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇三油酸酯、和聚氧乙烯脱水山梨糖醇三硬脂酸酯;聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如聚氧乙烯山梨糖醇四硬脂酸酯和聚氧乙烯山梨糖醇四油酸酯;聚氧乙烯甘油脂肪酸酯,例如聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯;聚乙二醇脂肪酸

酯,例如聚乙二醇二硬脂酸酯;聚氧乙烯烷基酯,例如聚氧乙烯十二烷基基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚,例如聚氧乙烯聚氧丙烯二醇醚、聚氧乙烯聚氧丙烯丙基醚、和聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚;聚氧乙烯烷基苯基醚,例如聚氧乙烯壬基苯基醚;硬化的聚氧乙烯蓖麻油,例如聚氧乙烯蓖麻油和硬化聚氧乙烯蓖麻油(聚氧乙烯氢化蓖麻油);聚氧乙烯蜂蜡衍生物,例如聚氧乙烯山梨糖醇蜂蜡;聚氧乙烯羊毛脂衍生物,例如聚氧乙烯羊毛脂;聚氧乙烯脂肪酸酰胺(具有6至18的亲水亲脂平衡值(HLB)),例如聚氧乙烯硬脂酸酰胺;阴离子型表面活性剂,例如含有带有8至18个碳原子的烷基的烷基硫酸盐,例如十六烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠和油基硫酸钠;每摩尔平均含有2至4个环氧乙烷加合物和具有8至18个碳原子的烷基的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐,例如聚氧乙烯十二烷基硫酸钠;含有带有8至18个碳原子的烷基的烷基苯磺酸盐,例如十二烷基苯磺酸钠;含有带有8至18个碳原子的烷基的烷基磺基琥珀酸盐,例如十二烷基磺基琥珀酸钠;天然表面活性剂,例如,卵磷脂;甘油磷脂;鞘磷脂,例如神经鞘磷脂;和含有8至18个碳原子的蔗糖脂肪酸酯。这些表面活性剂可以单独添加,或两种或多种结合添加到本发明的喷射液(液体组合物)中。

[0069] 优选表面活性剂的例子包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯。特别优选的表面活性剂的例子包括聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯、N-椰子油脂肪酸甘氨酸、N-椰子油脂肪酸谷氨酸酯、N-月桂酰甘氨酸、N-月桂酰谷氨酸、N-月桂酰肌氨酸、月桂酰胺丙基甜菜碱和精氨酸椰子油脂肪酸盐。最优选的表面活性剂的例子包括聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯、聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯、N-椰子油脂肪酸甘氨酸、N-椰子油脂肪酸谷氨酸酯、N-月桂酰肌氨酸、月桂酰胺丙基甜菜碱和精氨酸椰子油脂肪酸盐。适合被肺吸附的表面活性剂的例子包括聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯和聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0070] 添加的表面活性剂的浓度根据共存的蛋白质/肽的类型和含量而变化;但可以选自临界胶束浓度,或在 $1\mu\text{g/ml}$ 至 1.0g/ml ,更优选 1.0mg/ml 至 200mg/ml 的范围内。

[0071] 蛋白质/肽:氨基酸:表面活性剂的比率根据各个组分的类型而变化;然而,蛋白质/肽,氨基酸/其盐和表面活性剂优选以 $1:0.1\sim 200:0.01\sim 100$ 重量份的比率,更优选 $1:1\sim 20:0.1\sim 100$ 重量份的比率添加。

[0072] 在本发明中,蛋白质、氨基酸和表面活性剂优选在喷射之前(预先或在即将要喷射之前)均匀混合。

[0073] 在本发明的实施方案中,可以添加抗菌剂、消毒剂和/或防腐剂以消除微生物影响。这种试剂的例子包括季铵盐,例如苯扎氯铵和苯索氯铵;苯酚衍生物,例如苯酚、甲酚和苯甲醚;苯甲酸,例如苯甲酸和对羟基苯甲酸酯;和山梨酸。

[0074] 在本发明的实施方案中,可以添加油、甘油、乙醇、脲、纤维素、聚乙二醇和藻酸盐以提高注射液在储存过程中的物理稳定性。此外,可以添加抗坏血酸、柠檬酸、环糊精、生育酚和其它抗氧化剂以提高其化学稳定性。

[0075] 可以添加缓冲剂以调节喷射液的pH值。这种缓冲剂的例子包括抗坏血酸、柠檬酸、稀盐酸、和稀氢氧化钠。除此之外,可以使用磷酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、PBS、HEPES或Tris之类的缓冲剂。

[0076] 作为液体的张度剂,可以添加氨基乙磺酸盐(酯)、氯化钾、氯化钠、甘油和酸式碳

酸钠。

[0077] 当使用本发明的喷射液作为喷雾液时,可以添加糖类(例如葡萄糖和山梨糖醇)、增甜剂如阿斯巴甜(asterperm)和增香剂(例如薄荷醇)作为味道和气味改进剂。不仅可以添加亲水化合物,还可以添加疏水化合物。化合物可以以油形式使用。

[0078] 此外,如果必要,可以以适当量添加适于喷射液预期用途的各种类型的添加剂,例如表面调节剂、粘度调节剂、溶剂、和湿润剂。可以添加的添加剂的具体例子可以包括亲水粘合剂、疏水粘合剂、亲水增稠剂、疏水增稠剂、乙二醇衍生物、醇和电解质。选自上述例子的添加剂可以单独或以混合物形式使用。可以作为添加剂使用的物质在例如各国药典中作为制备治疗性液体试剂时添加的次要成分描述。优选使用可用作医疗用途或食品和化妆品用途的添加剂。

[0079] 添加剂的添加比例根据蛋白质/肽的类型而变化;然而,一般而言,优选为 0.001wt% 至 40wt%,更优选为 0.01wt% 至 20wt%。添加剂的量根据其类型、量及其组合而变化;但从喷射性能的角度看,相对于 1 重量份的前述蛋白质/肽,其量优选为 0.1 至 200 重量份。

[0080] 当本发明的喷射液用于制造生物芯片和生物传感器,用于筛选蛋白质/肽时,可以使用与目前市售的喷墨打印机中几乎相同的系统。

[0081] 另一方面,本发明的液体喷射装置具有基于热喷墨系统的原理的喷头,其能够通过热喷墨系统喷出喷射液的微小液滴。喷头优选由许多独立驱动的喷射单元构成。在该装置中,将电连接器(其将多个控制信号发送给各个喷射单元以独立地驱动它们)与电线(其将电连接器与各个喷射单元相联)接合。此外,该装置具有容纳喷射液的罐,和将喷射液从罐中供应到依据热喷墨系统的原理的流路喷头的液体的流路。这些部件优选整合到液体喷射盒上。

[0082] 图 1 示意性显示了使用本发明的喷射液在基板上形成蛋白质和肽斑点的装置。使用基板 5 作为具有固定区域的检测板,在固定区域上固定蛋白质、肽、酶或抗体之类的标准物质以检测样品中所含的各种物质。液体喷头 3 至少具有液体流路(未标示)(在其中对液体施加喷射能)和与通道相联的喷射口(未标示)。当从储存液体的罐 1 中通过通道 2 供应液体并对在通道 2 中的液体施加喷射能时,液体以液滴 4 形式从喷射口喷向基板 5 表面的预定位置。喷头 3 安装在能够在箭头所示的面内方向移动的盒上。可以通过移动喷头 3 来确定液滴 4 在基板 5 上的喷射位置。通过电连接到喷头 3 上的控制器 6 控制液滴 4 的喷射时机。图 2 显示了分布在基板表面上的蛋白质/肽斑点的图案的平面图。在该图中,使用单一类型的喷射液。然而,如果在喷头中设置多个喷射单元(各自独立地驱动并喷射不同的喷射液)并连接到预定的喷射液供应系统上,就可以在基板上形成多个类型不同的斑点。此外,通过改变向每个斑点形成位置供应的液体量,可以形成具有不同沉积量的斑点。

[0083] 此时,喷头 3 可以根据基板上形成的斑点尺寸和斑点之间的间隔以各种方式构造。当形成亚微微升或毫微微升的液滴时,可以使用能够以优异的可控制性喷射极细液滴的喷头(在日本专利申请公开 2003-154655 中公开的)。

[0084] 接着,将本发明的喷射液施加到喷射装置,特别是吸入器中。这种吸入器优选具有将喷射液(液体药剂)转化成微小液滴的部件和将喷出的微小液滴与气体载体混合的部件,这两种部件是分立的元件。通过分别形成用于将喷射液转化成微小液滴的部件和用于

形成含微小液滴的气流的部件,充当活性成分的蛋白质/肽的量(即每次给药的预定剂量)可以被均匀添加到被给药对象吸入的气流中。此外,如果将喷头构造成使各自具有多个喷射口的多个喷射单元各自喷出不同的活性成分,喷头就可以控制多种活性成分的喷射量。

[0085] 通过使用具有密集分布在每单位面积上的喷射口的根据热喷墨系统的喷头作为喷射装置,可以使吸入器小型化以便于使用者携带。

[0086] 在用于肺的吸入器中,气流中所含的液滴具有1至5微米的窄尺寸分布是重要的。此外,当使用者要携带吸入器时,其必须小型化。

[0087] 图3显示了这种吸入器的液体喷射部件的示意性结构。液体喷射部件具有容纳喷头部件13的外壳10、用于储存喷射液的罐11、用于将液体从槽11供应到喷头部件13中的液体流路12、用于与控制器(其控制喷头部件13的各个液体喷射单元的驱动)相互交换驱动信号和控制信号的电连接部件15,和连接喷头部件13和电连接部件15的内部金属丝14。这些部件整体构成作为喷头盒单元的一个单元结构。喷头盒单元可拆卸地(根据需要)结合到吸入器上。喷头部件13合适地具有日本专利申请公开2003-154665中描述的液滴喷头结构。

[0088] 参照图4和5解释含有具有这种结构的喷头盒单元的便携式吸入器(吸入器)。图4和5中所示的吸入器是尺寸减小了以便于使用者携带的医疗用吸入器。

[0089] 图4是显示吸入器外观的透视图。外罩由吸入器主体20和检修盖16构成。在外罩内,安装控制器和电源,即电池(未标示)。图5显示了检修盖16打开时的状态。当检修盖16打开时,可以看见喷头盒单元21和吸嘴(mouthpiece)18之间的连接部件。参考数字19代表电源按钮。当使用者吸气时,空气从空气入口17引入吸入器,并导入吸嘴18,在此,空气与喷头盒单元21的喷头部件13中的喷射口喷出的液滴混合成为混合气流,其流向吸嘴18的出口,该吸嘴经适当设计以固定在使用者的嘴唇中。当使用者将吸嘴的顶部插入口腔并在将其咬在牙齿之间的同时吸气时,使用者可以有效吸入从喷头盒单元的液体喷射部件中喷出的液滴。

[0090] 喷头盒单元21可拆卸地(根据需要)连接到吸入器上。

[0091] 利用图4和5中所示的结构,形成微小液滴并自然地借助吸入的空气到达对象(给药对象)的喉咙和气管。因此,可以与吸入空气的体积无关地控制喷出的液滴形式的液体量(即,活性成分的剂量)、

[0092] 实施例

[0093] (参比例1)

[0094] 在描述实施例之前,显示根据热喷墨系统喷射仅含蛋白质的溶液时的喷射量以利于理解为什么难以喷射蛋白质溶液。以各种浓度制备白蛋白在PBS中的溶液作为蛋白质溶液。通过由气泡喷射打印机机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)改装的液体喷射装置喷射每一溶液,以收集溶液。以纯净水(以相同方式喷射)的喷射量为100%,指出每一白蛋白溶液的喷射量(单个液滴的量)。结果显示在图6中。

[0095] 即使白蛋白浓度低至1微克/毫升,喷射也不完全稳定。显示,随着蛋白质浓度提高,喷射量朝0逐渐降低。如果喷射量根据蛋白质浓度而极大改变,就不能将斑点中的蛋白质/肽的浓度调节至使它们以相同量分布在基板上所需的值。此外,如果在经由吸入器作为药品施用时每剂量含有相同量的蛋白质/肽,就难以调节喷射液中蛋白质/肽的浓度。此

外,当用在吸入器中时,必须通过喷射形成尺寸更小的液滴。以这种方式喷射蛋白质/肽溶液被认为是困难的。

[0096] 现在,通过实施例更详细地描述本发明,提供这些实施例以利于进一步理解本发明,但不应该被视为限制本发明。注意,符号“%”是指“wt%”。

[0097] (实施例 1 至 24 和对比例 1 至 11)

[0098] (基于气泡喷射系统的原理形成蛋白质溶液的液滴)

[0099] 如下制备喷射液:将适当浓度的胰岛素溶于 0.1M HCl 水溶液,在搅拌的同时向如上制成的溶液混合物中添加氨基酸及其盐和表面活性剂,用 0.1M NaOH 将混合物的 pH 值调节至 7.4,并用 pH 值为 7.4 的缓冲液将所得溶液的胰岛素浓度调节至预定值,

[0100] 另一方面,制备符合气泡喷射系统的含有 3 微米直径喷嘴的液体喷头。在与喷嘴连接的罐中装入 30%乙醇水溶液。通过电连接到液体喷头上的控制器驱动喷头,由此从喷射口中喷出液体。通过激光衍射系统粒度-分布测量装置(Malvern Inc. 制造的 Sprayteck)分析并确认所得液滴(喷出液滴)的粒度和粒度分布。作为分析结果,发现液滴具有以大约 3 微米为中心的尖锐粒度分布。

[0101] 将以上述方式制成的喷射液体装在与含有 3 微米直径喷嘴的液体喷头相连的罐中。喷射(首次喷射)进行 1 秒,同时通过喷射控制器以 20kHz 的频率和 12V 的电压操作喷头。在 3 秒间隔后,进行二次喷射 1 秒。将该操作重复 50 次。目测喷射是否连续进行。液滴连续喷射 50 次或更多次的情况用参考符号○表示;液滴喷射在 15 至 50 次之间中断的情况用参考符号△表示;液滴在少于 15 次时中断的情况用参考符号×表示。此外,在喷射之前和之后,在分析条件(装置:JASCO 制造,柱:YMC-PackDio1-200,500×8.0mm ID,洗脱剂:含有 0.2M NaCl 的 0.1MKH₂PO₄-K₂HPO₄(pH 7.0),流速:0.7mL/min,温度:25℃,检测:215 纳米的紫外线)下对液体进行 HPLC 分析以确定喷射液的组成变化。

[0102] 作为对比例,制备纯净水、胰岛素溶液、仅含氨基酸的胰岛素溶液、和仅含表面活性剂的胰岛素溶液,并进行与实施例中相同的液体喷射实验。

[0103] 注意,实施例和对比例的配方和结果显示在表 1 中。

[0104]

表 1

	蛋白质		氨基酸		表面活性剂		喷射性能 评测
	类型	浓度	类型	浓度	类型	浓度	
实施例 1	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	○
实施例 2	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	○
实施例 3	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	○
实施例 4	胰岛素	4 mg/mL	缬氨酸	5.0 mg/mL	吐温 80	5.0 mg/mL	○
实施例 5	胰岛素	4 mg/mL	谷氨酸	5.0 mg/mL	吐温 80	5.0 mg/mL	○
实施例 6	胰岛素	4 mg/mL	天冬氨酸	5.0 mg/mL	吐温 80	5.0 mg/mL	○
实施例 7	胰岛素	4 mg/mL	苏氨酸	5.0 mg/mL	吐温 80	5.0 mg/mL	○
实施例 8	胰岛素	4 mg/mL	丙氨酸	5.0 mg/mL	吐温 80	5.0 mg/mL	○
实施例 9	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	N-月桂酰基肌氨酸	2.5 mg/mL	○
实施例 10	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	10 mg/mL	N-月桂酰基肌氨酸	0.2 mg/mL	○
实施例 11	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	2.5 mg/mL	N-月桂酰基肌氨酸	2.5 mg/mL	○
实施例 12	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	2.5 mg/mL	N-月桂酰基肌氨酸	2.5 mg/mL	○
实施例 13	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	5.0 mg/mL	N-椰子油脂肪酸甘氨酸	1.0 mg/mL	○
实施例 14	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	5.0 mg/mL	N-椰子油脂肪酸甘氨酸	1.0 mg/mL	○
实施例 15	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	5.0 mg/mL	N-椰子油脂肪酸甘氨酸	1.0 mg/mL	○
实施例 16	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	N-椰子油脂肪酸谷氨酸盐	2.5 mg/mL	○
实施例 17	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	2.5 mg/mL	N-椰子油脂肪酸谷氨酸盐	2.5 mg/mL	○
实施例 18	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	2.5 mg/mL	N-椰子油脂肪酸谷氨酸盐	2.5 mg/mL	○
实施例 19	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	月桂酰胺丙基甜菜碱	2.5 mg/mL	○
实施例 20	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	10 mg/mL	月桂酰胺丙基甜菜碱	0.2 mg/mL	○
实施例 21	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	2.5 mg/mL	月桂酰胺丙基甜菜碱	2.5 mg/mL	○

[0105]

	蛋白质		氨基酸		表面活性剂		喷射性能 评测
	类型	浓度	类型	浓度	类型	浓度	
实施例 22	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	2.5 mg/mL	0
实施例 23	胰岛素	4 mg/mL	精氨酸	2.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	2.5 mg/mL	0
实施例 24	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	2.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	2.5 mg/mL	0
对比例 1	水		无	-	无	-	0
对比例 2	胰岛素	4 mg/mL	脯氨酸	10 mg/mL	无	-	x
对比例 3	胰岛素	4 mg/mL	甘氨酸	10 mg/mL	无	-	x
对比例 4	胰岛素	4 mg/mL	谷氨酸	10 mg/mL	无	-	x
对比例 5	胰岛素	4 mg/mL	苏氨酸	10 mg/mL	无	-	x
对比例 6	胰岛素	4 mg/mL	丙氨酸	10 mg/mL	无	-	x
对比例 7	胰岛素	4 mg/mL	无	-	吐温 80	2.5 mg/mL	Δ
对比例 8	胰岛素	4 mg/mL	无	-	N-月桂酰基肌氨酸	2.5 mg/mL	Δ
对比例 9	胰岛素	4 mg/mL	无	-	N-椰子油脂肪酸甘氨酸	2.5 mg/mL	Δ
对比例 10	胰岛素	4 mg/mL	无	-	N-椰子油脂肪酸谷氨酸盐	2.5 mg/mL	Δ
对比例 11	胰岛素	4 mg/mL	无	-	月桂酰胺丙基甜菜碱	2.5 mg/mL	Δ

[0106] 对比例 1 的纯净水因为不含胰岛素,所以连续且稳定喷射;但是,含有胰岛素以及氨基酸的纯净水没有表现出实质喷射。此外,在含有胰岛素以及表面活性剂的纯净水的情

况下,喷射量不稳定。相反,对于实施例 1 至 24,喷射以稳定的喷射状态适当地进行。当对实施例的样品进行 HPLC 分析时,在喷射之前和之后没有观察到峰位置和强度的差异。据此,没有观察到组成变化。当以相同方式对比例 7 的样品进行 HPLC 分析时,胰岛素峰降低。据此,证实发生了组成变化。

[0107] 实施例 25

[0108] (药理活性的证实)

[0109] 在喷射之前和之后分析实施例 10 中所示的组合物的药理活性。在对禁食一天的 Wistar(Wister)大鼠(雄性,8 周大,重量:大约 250 克)注射麻醉剂戊巴比妥钠后,从尾部静脉中提取血液。将其用作基准(对照物)。此后,根据热喷墨系统喷射具有实施例 10 的组成的溶液。收集所得液滴并以 1.6U/kg 的剂量皮下注入大鼠。在注射 15、30、60 和 120 分钟之后,从尾部静脉中提取血液。将由此提取的血液样品离心分离并分析所得血清的血糖水平(由 6 只大鼠组成的一组)。使用不含添加剂且不根据热喷墨系统喷射的胰岛素溶液进行相同实验以作为对比。根据用实施例 10 的液滴(根据热喷墨系统喷射形成)注射的大鼠的血糖水平变化分析是否存在药理活性。结果显示在图 7 中。

[0110] 从结果明显看出,用胰岛素注射的大鼠的血糖水平迅速降低。观察胰岛素降低血糖水平的作用。此外,观察实施例 10 的制剂(根据热喷墨系统喷射)降低血糖水平的作用。从对比中,在任何测量点没有观察到降低血糖水平的显著差异。经证实,在根据喷墨系统喷射实施例 10 的制剂之后,适当地保持了活性。

[0111] 实施例 26

[0112] (喷射效率)

[0113] 根据热喷墨系统喷射含和不含添加剂的含有 1.0 毫克/毫升浓度的胰岛素的溶液。在溶液中添加和不添加添加剂的情况下评测溶液的喷射量及其再现性。

[0114] 使用下列溶液进行评测

[0115] 含有 10 毫克/毫升脯氨酸和 1.0 毫克/毫升吐温 80 的 1.0 毫升/毫升胰岛素溶液(Ins/Pro/Tw);

[0116] 含有 10 毫克/毫升脯氨酸的 1.0 毫升/毫升胰岛素溶液(Ins/Pro);

[0117] 含有 1.0 毫克/毫升吐温 80 的 1.0 毫升/毫升胰岛素溶液(Ins/Tw);

[0118] 仅含 1.0 毫克/毫升胰岛素的溶液。

[0119] 通过由气泡喷射打印机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)改装的液体喷射装置喷射这些溶液,以收集液体。以按照相同方式喷射的纯净水的喷射量为 100%,将每一溶液的喷射量绘制在图(图 8)中。对于每一溶液,相同的实验重复 5 次以获得平均和标准偏差值,其显示在图中。

[0120] 仅含胰岛素的溶液和补充了脯氨酸的含胰岛素的溶液没有表现出实质喷射。喷射效率极低。补充了吐温 80 的含胰岛素的溶液的喷射量为纯净水的大约 40%;但是,喷射量无再现性地变化。另一方面,补充了脯氨酸和吐温 80 的含胰岛素的溶液的喷射量与纯净数的基本相同并具有高再现性。补充了脯氨酸和吐温 80 的含胰岛素的溶液的喷射量不低于仅含胰岛素的溶液和补充了脯氨酸的含胰岛素的溶液的 100 倍,且大约为补充了吐温 80 的含胰岛素的溶液的 2.5 倍。因此,经证实,补充了脯氨酸和吐温 80 的含胰岛素的溶液在喷射量方面的效率极高。

[0121] (实施例 27 至 58 和对比例 12 至 25)

[0122] (对各种蛋白质和添加剂的浓度的影响)

[0123] 随后,选择含有脯氨酸+吐温 80 和脯氨酸+精氨酸椰子油脂肪酸盐的溶液并以预定浓度添加到各种类型的蛋白质中。如下制备喷射溶液:将适当浓度的蛋白质/肽溶于缓冲剂(pH 7.4),在搅拌的同时在所得溶液中添加氨基酸及其盐和表面活性剂,并用缓冲剂(pH 7.4)调节溶液以包含预定浓度的蛋白质/肽。按照与实施例 1 中相同的方式对喷射溶液进行喷射试验以评测喷射性能。注意,实施例中所用的配方和结果显示在下表 2 中。

[0124]

表 2

	蛋白质		氨基酸		表面活性剂		喷射性 能评测
	类型	浓度	类型	浓度	类型	浓度	
实施例 27	胰高血糖素	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	吐温 80	1.0 mg/mL	0
实施例 28	GLP-1	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	吐温 80	1.0 mg/mL	0
实施例 29	hGH	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	吐温 80	1.0 mg/mL	0
实施例 30	促红细胞生成素	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 31	IFN α	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 32	IFN γ	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 33	降钙素	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 34	γ -球蛋白	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 35	白蛋白	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 36	IL-2	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 37	IL-6	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 38	G-CSF	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 39	TNF α	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 40	抗凝血酶 (Antithrombin) III	1 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 41	LHRH	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	吐温 80	1.0 mg/mL	0
实施例 42	溶菌酶	5 mg/mL	脯氨酸	2.5 mg/mL	吐温 80	2.5 mg/mL	0
实施例 43	胰高血糖素	1 mg/mL	脯氨酸	0.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	0.5 mg/mL	0
实施例 44	GLP-1	1 mg/mL	脯氨酸	0.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	0.5 mg/mL	0
实施例 45	hGH	1 mg/mL	脯氨酸	0.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	0.5 mg/mL	0
实施例 46	促红细胞生成素	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0

[0125]

	蛋白质		氨基酸		表面活性剂		喷射性能评测
	类型	浓度	类型	浓度	类型	浓度	
实施例 47	IFN α	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 48	IFN γ	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 49	降钙素	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 50	γ -球蛋白	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 51	白蛋白	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 52	IL-2	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 53	IL-6	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 54	G-CSF	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 55	TNF α	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 56	抗凝血酶 (Antithrombin) III	1 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
实施例 57	LHRH	1 mg/mL	脯氨酸	0.5 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	0.5 mg/mL	0
实施例 58	溶菌酶	5 mg/mL	脯氨酸	1.0 mg/mL	精氨酸椰子油脂脂肪酸盐	1.0 mg/mL	0
对比例 12	胰高血糖素	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 13	GLP-1	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 14	hGH	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 15	促红细胞生成素	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 16	IFN α	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 17	IFN γ	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 18	降钙素	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 19	γ -球蛋白	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 20	白蛋白	1 mg/mL	无	-	无	-	x
对比例 21	IL-2	1 mg/mL	无	-	无	-	x

[0126]

	蛋白质		氨基酸		表面活性剂		喷射性能评测
	类型	浓度	类型	浓度	类型	浓度	
对比例 22	IL-6	1 mg/mL	无	-	无	-	×
对比例 23	G-CSF	1 mg/mL	无	-	无	-	×
对比例 24	TNF α	1 mg/mL	无	-	无	-	×
对比例 25	抗凝血酶 (Antithrombin) III	1 mg/mL	无	-	无	-	×

[0127] 在实施例 27 至 58 (其中将脯氨酸和表面活性剂添加到 16 种蛋白质 / 肽中) 中, 证实喷射恰当地进行。如实施例 (对比例) 12 至 25 (在这些蛋白质 / 肽中没有添加添加剂)

中所示,几乎或完全没有观察到实质喷射。因此证实,这些制剂在稳定地喷射蛋白质/肽溶液方面是有效的。此外,作为实施例 27 至 58 的溶液的 HPLC 分析的结果,在图中没有观察到峰的任何变化。证实该液体组合物在喷射之前和之后没有改变。

[0128] (实施例 59)

[0129] (使用喷墨打印机制备抗体芯片和感应操作)

[0130] 图 9 是显示该实施例的实验方法的模型。在该图中,参考数字 30 是指基板,31 是掩蔽剂、32 是特异性地与试验物质反应的物质(例如蛋白质,肽),33 是试验物质,34 是对试验物质的特异性物质,35 是标记物。该图示意性显示了使用本文制成的抗体芯片的一系列感应操作。

[0131] 下面更具体地解释操作。以 0.1 至 500 μ g/mL 的浓度制备人 IL2 单克隆抗体、人 IL4 单克隆抗体和人 IL6 单克隆单体(溶液)。然后,在每一抗体溶液中添加脯氨酸和吐温 80 以使两者浓度均变成 0.1% (w/w)。将由此制成的每一喷射液装在喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)的喷头中,并以斑点形式根据预定分布图案喷到用聚-L-赖氨酸(Poly-L-lysine)涂布的玻璃板上。

[0132] 将其上带有液体斑点的玻璃板在 4°C 培养,此后将玻璃板的(上)表面用 1% BSA 掩蔽。在掩蔽之后,将玻璃板充分洗涤以制备抗体芯片基板。随后,以 1 μ g/mL 的浓度制备含有试验物质、重组体 IL2、IL4 和 IL6 的溶液,然后添加脯氨酸、吐温 80 和 BSA 分别至 0.5% (w/w)、0.5% (w/w) 和 0.1% (w/w) 的浓度。将每一溶液装在喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)的喷头中,并以如上所述相同的图案喷到抗体-芯片基板上。将添加了试验物质的抗体-芯片基板用盖玻片覆盖,并在 4°C 进行反应。反应完成之后,将抗体-芯片基板充分洗涤,干燥并用作检测基板。

[0133] 随后,进行标记以检测在检测基板上捕获的试验物质。作为标记物,使用能够特异性结合到试验物质上的生物素。在各以 1 μ g/mL 的浓度含有生物素标记的人类 IL2 单克隆抗体、生物素标记的人类 IL4 单克隆抗体和生物素标记的人类 IL6 单克隆抗体的抗体溶液中,添加脯氨酸、吐温 80 和 BSA 分别至 0.5% (w/w)、0.5% (w/w) 和 0.1% (w/w) 的最终浓度。此后,将每一溶液装在喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)的喷头中,并以相同图案喷到检测基板上。将含有标记斑点的检测基板用盖玻片覆盖,并在 4°C 进行反应。反应完成之后,将检测基板充分洗涤并干燥。

[0134] 为了光学检测标记物,制备以 10 微克/毫升的浓度含有 Cy3 标记的链霉亲和素的溶液。在该溶液中,添加脯氨酸、吐温 80 和 BSA 分别至 0.5% (w/w)、0.5% (w/w) 和 0.1% (w/w) 的最终浓度。将每一溶液装在喷墨打印机(商品名:PIXUS 950i, Canon Inc. 制造)的喷头中,并以与上文相同的图案喷到检测基板上。完成喷射操作之后,将检测基板用盖玻片覆盖,并在 4°C 进行反应。反应之后,将检测基板充分洗涤,干燥,此后用激发光照射。通过具有可被波长 532 纳米透过的滤光器的荧光扫描仪检测 Cy3 发射光的量(荧光信号的量)。由此,检测到根据样品类型和浓度变化的荧光信号。

[0135] 本发明不限于上述实施方案,可以在本发明的精神和范围内进行各种变化和修改。因此,为了使公众了解本发明的范围,作出下列权利要求。

[0136] 本申请要求 2004 年 9 月 27 日提交的日本专利申请 2004-279864 和 2005 年 8 月 31 日提交的日本专利申请 2005-252270 的优先权,这两个申请经此引用并入本文。

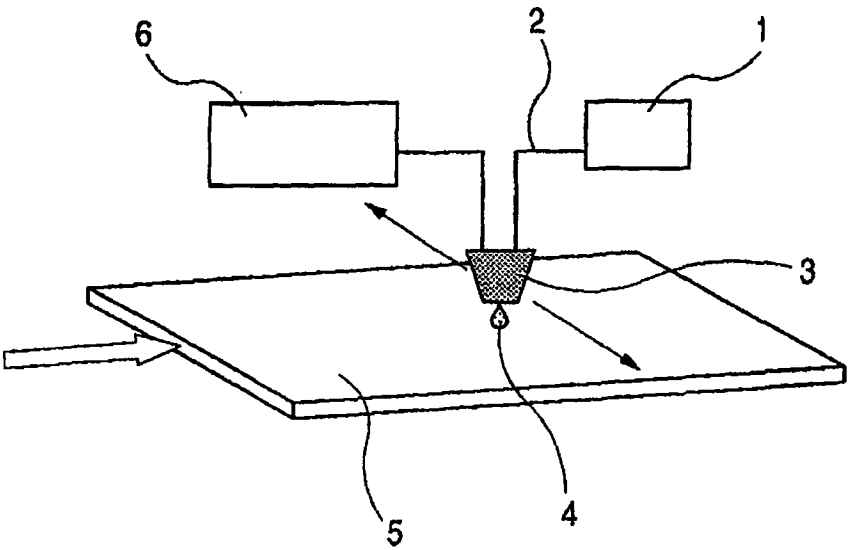


图 1

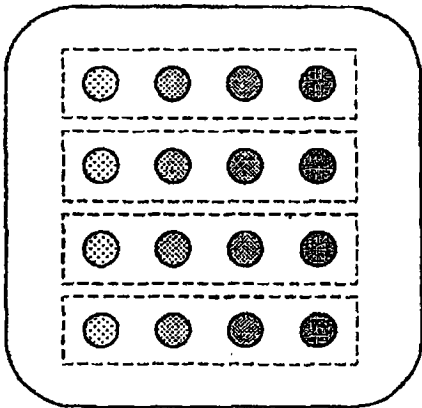


图 2

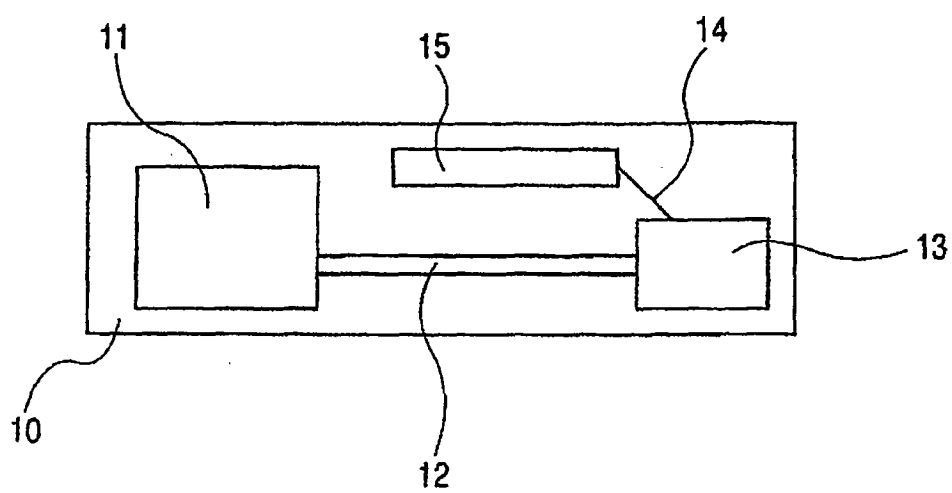


图 3

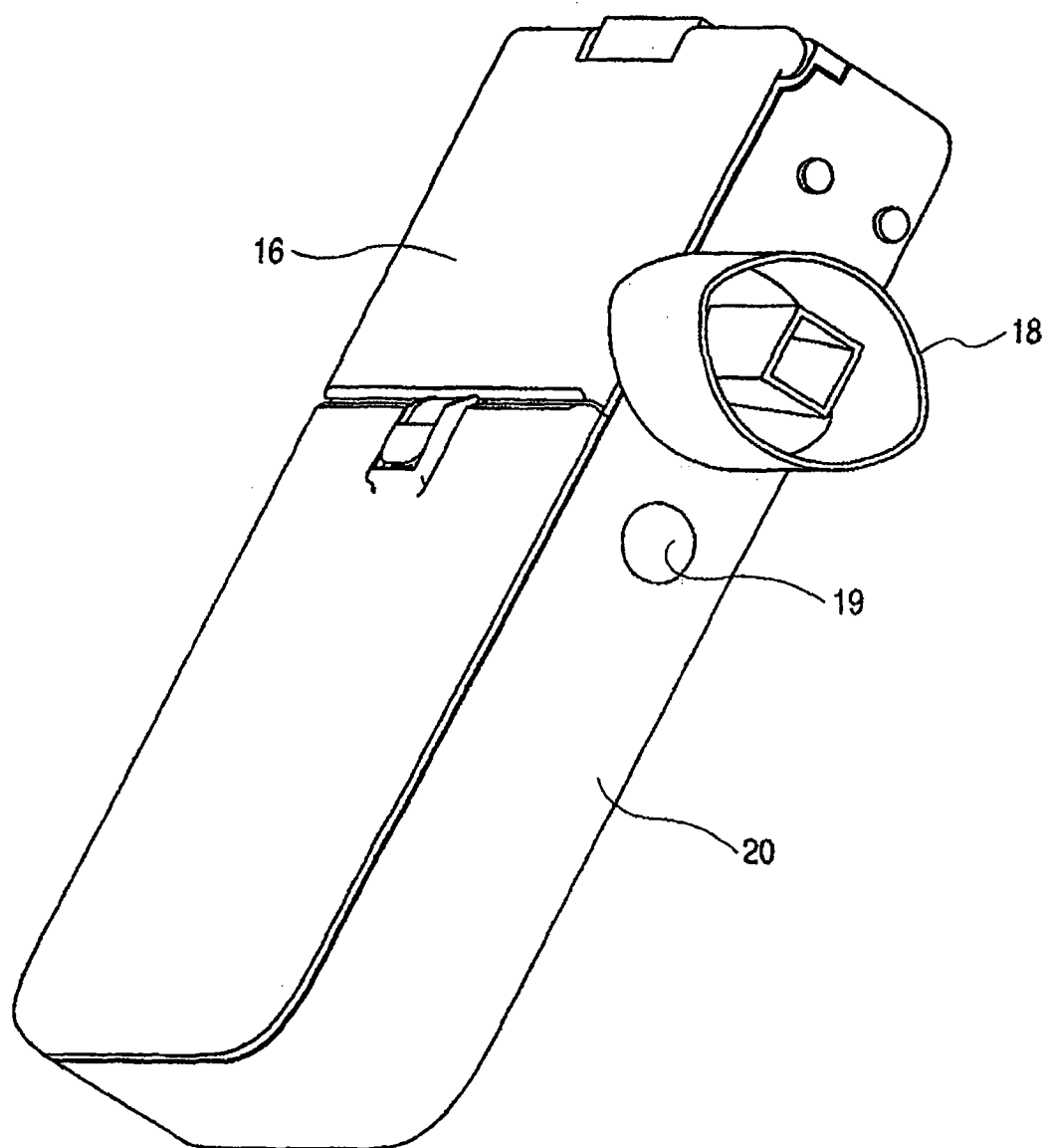


图 4

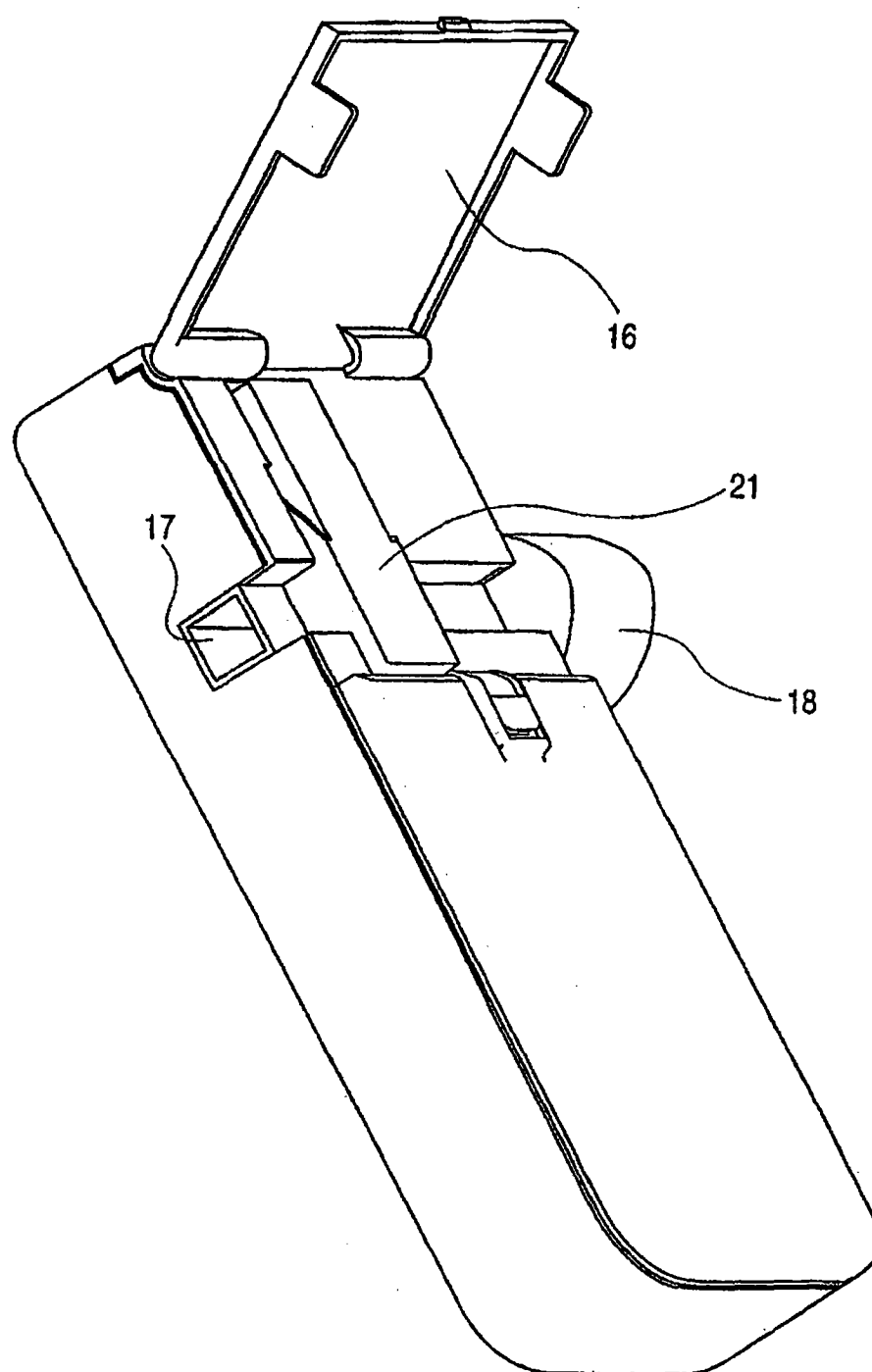


图 5

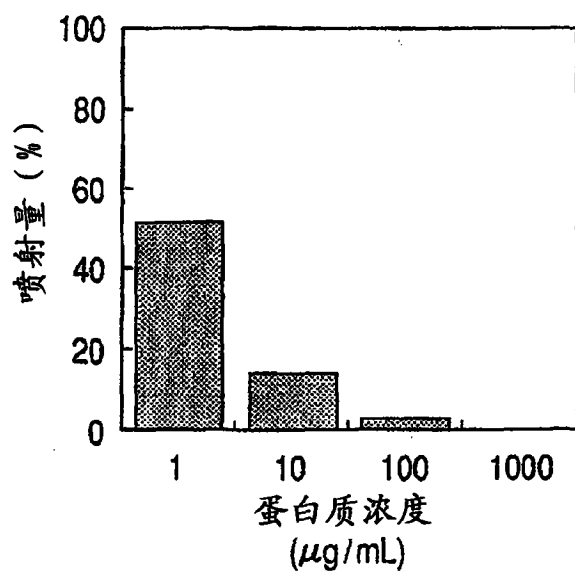


图 6

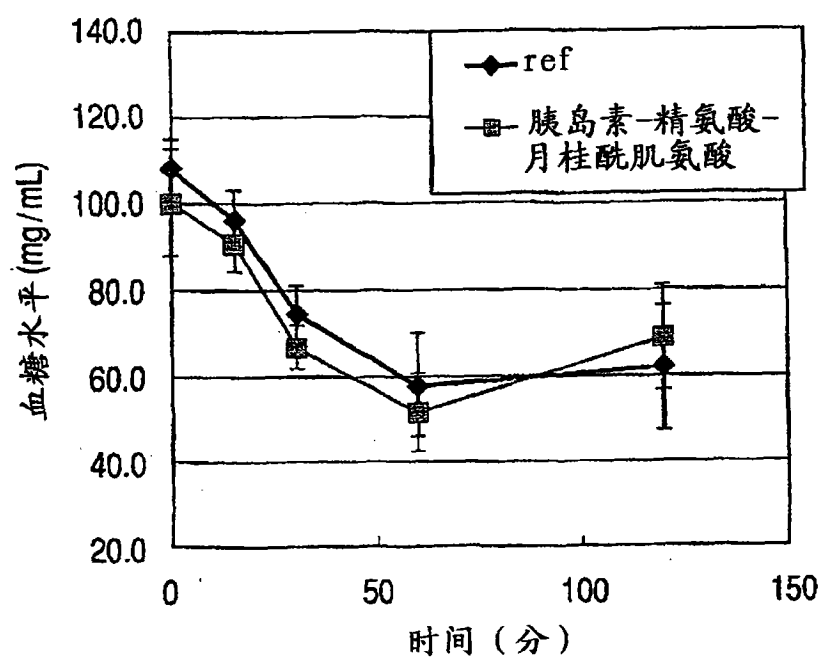


图 7

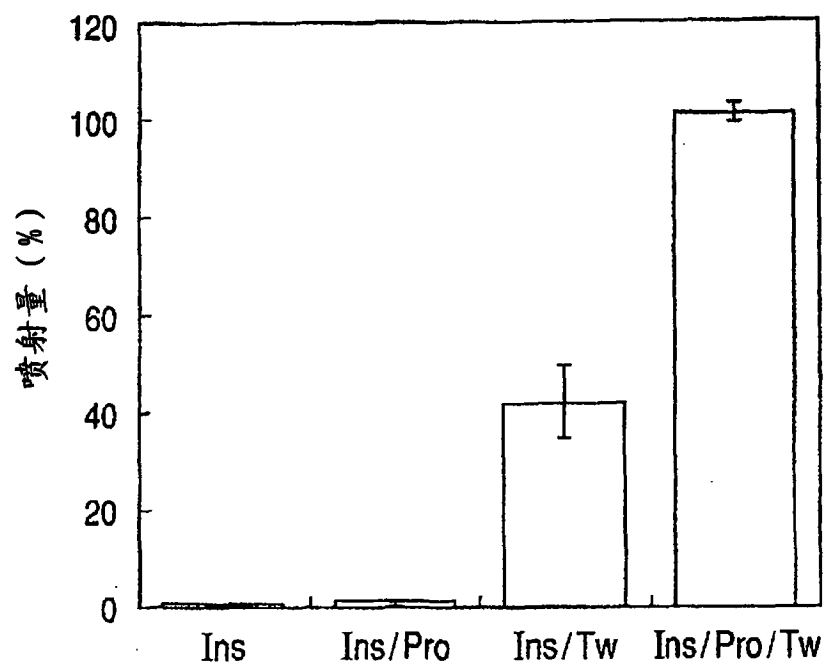


图 8

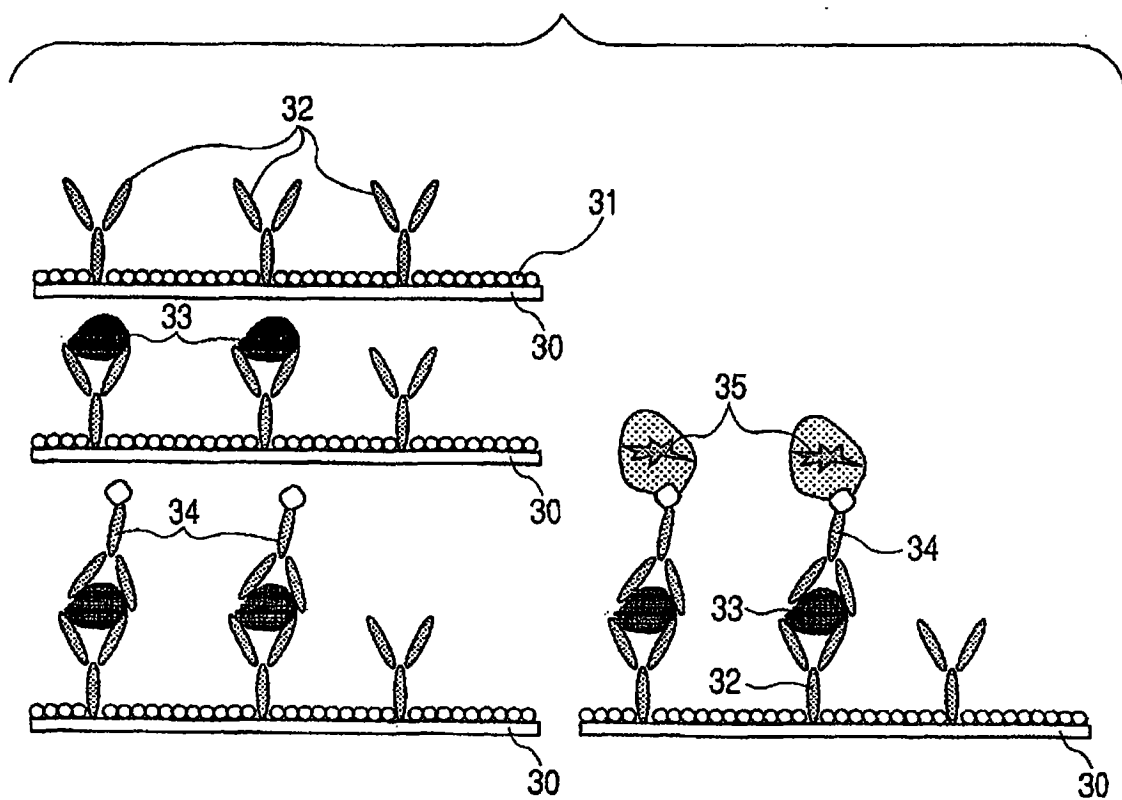


图 9