



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104302349 A

(43) 申请公布日 2015.01.21

(21) 申请号 201380025634.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013.03.15

A61M 37/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61M 5/158 (2006.01)

61/611,603 2012.03.16 US

B81C 1/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.11.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2013/000108 2013.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/137831 EN 2013.09.19

(71) 申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡肯特岗

(72) 发明人 康立峰 陈瑞容

加斯普瑞特·辛格·科赫哈 吴伟江

(74) 专利代理机构 北京市百伦律师事务所

11433

代理人 周红力 陈少丽

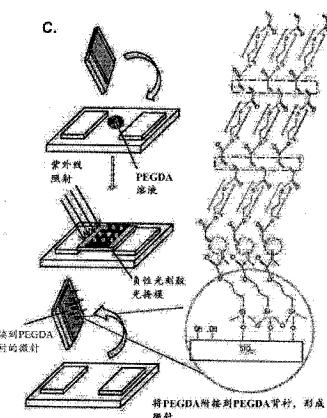
权利要求书4页 说明书39页 附图20页

(54) 发明名称

制造聚合物微针的新方法

(57) 摘要

本公开总体上涉及微针设备以及用于使用光刻术由生物相容聚合物制造微针的方法。更具体而言，本公开的方面针对使用生物相容聚合物（生物聚合物）通过生物相容、基本上生物相容或者充分地生物相容的制造技术制造微针设备。



1. 一种用于微针设备制造的方法,包括:

提供背衬结构;

将至少一个微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触以便在背衬结构的表面上形成微针形成生物相容聚合物层,该微针形成生物相容聚合物层具有厚度,该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到背衬结构;以及

执行曝光工艺,包括选择性地将电磁能引导至背衬结构和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合,

其中在基本上不存在涉及形成微针集合而不是从微针集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下,该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

2. 权利要求 1 的方法,其中在执行曝光工艺之前,背衬结构和微针形成生物相容聚合物层中的至少一个携带至少一种生物物质,并且其中曝光工艺包括以避免所述至少一种生物物质的显著降解的方式将电磁能引导至背衬结构和微针形成生物聚合物层的部分中。

3. 权利要求 1 的方法,其中在执行曝光工艺之前,背衬结构和微针形成生物相容聚合物层中的至少一个携带至少一种生物物质,并且其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似 80% 的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

4. 权利要求 3 的方法,其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似 90% 的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

5. 权利要求 3 的方法,其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似 95% 的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

6. 权利要求 2 的方法,进一步包括在微针设备制造的每个步骤期间将所述至少一种生物物质维持在其中预期发生显著的生物物质降解的生物物质降解阈值温度以下的温度处。

7. 权利要求 6 的方法,其中生物物质降解阈值温度为近似 40℃。

8. 权利要求 6 的方法,其中生物物质降解阈值温度为近似 30℃。

9. 权利要求 6 的方法,其中生物物质降解阈值温度为近似 27℃。

10. 权利要求 2 的方法,进一步包括避免将所述至少一种生物物质暴露于反应性血浆物种和碳基化学溶剂。

11. 权利要求 2 的方法,进一步包括至少基本上避免将所述至少一种生物物质暴露于不同于水的溶剂。

12. 权利要求 11 的方法,进一步包括避免将所述至少一种生物物质暴露于不同于水的溶剂。

13. 权利要求 1 的方法,其中微针设备制造的每个步骤发生在洁净室环境外部。

14. 权利要求 2 的方法,其中执行曝光工艺包括曝光事件集合,每个曝光事件包括在预期避免所述至少一种生物物质的显著降解的时间段内将电磁能引导至背衬结构和微针形成生物聚合物层的部分中。

15. 权利要求 13 的方法,其中执行曝光工艺包括单个曝光事件。

16. 权利要求 13 的方法,其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于超过近似 60 焦耳的紫外光能量。

17. 权利要求 15 的方法,其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于

超过近似 50 焦耳的紫外光能量。

18. 权利要求 16 的方法,其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于超过近似 45 焦耳的紫外光能量。

19. 权利要求 1 的方法,其中执行曝光工艺包括 :

至少邻近背衬结构设置光掩模,该光掩模在其中具有开口集合,该开口集合与微针截面区域集合相应;以及

引导电磁能通过开口集合、背衬结构的部分以及微针形成生物相容聚合物层的部分中的每一个。

20. 权利要求 1 的方法,其中背衬结构包括支撑构件和生物相容聚合物背衬层中的至少一个。

21. 权利要求 1 的方法,其中背衬结构排除生物相容聚合物背衬层。

22. 权利要求 20 的方法,其中微针形成生物相容聚合物包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的聚合物。

23. 权利要求 22 的方法,其中生物相容聚合物背衬层包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的聚合物。

24. 权利要求 1 的方法,其中将微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触包括 :

提供具有内表面集合的腔室,该内表面集合的至少一个内表面包括背衬结构的预期用于接触微针形成生物相容聚合物的表面;以及

将微针形成生物相容聚合物引入到腔室中。

25. 权利要求 24 的方法,其中将微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触进一步包括:确立与微针集合内的微针的预期长度相应的腔室深度。

26. 权利要求 24 的方法,其中执行曝光工艺包括选择性地将电磁能引导到腔室中。

27. 权利要求 1 的方法,其中提供背衬结构包括 :

提供支撑构件;

提供具有内表面集合的腔室,该内表面集合内的至少一个内表面包括支撑构件的表面;

将至少一个生物相容聚合物引入到腔室中;

将所述至少一个生物相容聚合物和支撑构件的与内表面集合的内表面相应的表面接触,从而形成由支撑构件的表面承载的生物相容聚合物层;以及

将电磁能引导到腔室中以便使所述至少一个生物相容聚合物层的部分交联,从而形成由支撑构件的表面承载的生物相容背衬层。

28. 一种用于制造微针设备的装置,包括 :

腔室,该腔室包括 :

腔室主体,其具有内表面集合;

背衬结构接纳部分,其被配置成承载背衬结构,使得背衬结构的表面形成内表面集合内的内表面;以及

腔室开口,其被配置用于将生物相容聚合物引入到腔室中。

29. 权利要求 28 的装置,进一步包括被配置用于选择性地确立与微针长度相应的腔室深度的腔室深度调节机构。

30. 权利要求 28 的装置, 进一步包括紫外光固化站, 该紫外光固化站被配置用于引导紫外光通过背衬结构的表面, 该表面形成腔室的内表面集合内的内表面。

31. 权利要求 30 的装置, 其中腔室包括被配置用于冲洗介质通过其进行流体连通的至少一个开口集合。

32. 一种微针设备, 包括 :

微针集合, 其包括微针形成生物相容聚合物的交联区, 该微针形成生物相容聚合物被配置用于响应于表现出交联波长集合的电磁能而交联; 以及

背衬结构, 其承载微针集合, 该背衬结构关于交联波长集合至少部分地透射,

其中微针集合和背衬结构中的至少一个携带至少一种生物物质, 并且

其中微针形成生物相容聚合物在非交联时是水溶性的。

33. 权利要求 32 的微针设备, 其中背衬结构包括支撑构件和生物相容聚合物层中的至少一个。

34. 权利要求 32 的微针设备, 其中微针形成生物相容聚合物和背衬结构中的至少一个包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的材料。

35. 一种用于微针设备制造的方法, 包括 :

提供具有前表面和后表面的第一背衬结构;

将至少一个微针形成生物相容聚合物与第一背衬结构的前表面接触以便在第一背衬结构的前表面上形成微针形成生物相容聚合物层, 该微针形成生物相容聚合物层具有厚度, 该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到第一背衬结构的前表面; 以及

执行曝光工艺, 包括选择性地将电磁能引导至第一背衬结构和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合, 其中微针集合化学耦合到第一背衬结构的前表面;

提供第二背衬结构; 以及

将具有化学耦合到第一背衬结构的前表面的微针的第一背衬结构与第二背衬结构组合, 其中第二背衬结构化学耦合到第一背衬结构的后表面;

其中在基本上不存在涉及形成微针集合而不是从微针集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下, 该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

36. 一种微针设备, 包括 :

微针集合, 其包括微针形成生物相容聚合物的交联区, 该微针形成生物相容聚合物被配置用于响应于表现出交联波长集合的电磁能而交联; 以及

第一背衬结构, 其具有前表面和后表面, 该第一背衬结构在第一背衬结构的前表面上承载微针集合, 该第一背衬结构关于交联波长集合至少部分地透射; 以及

第二背衬结构, 其承载承载微针集合的第一背衬结构, 该第二背衬结构化学耦合到第一背衬结构的后表面;

其中微针集合、第一背衬结构和第二背衬结构中的至少一个携带至少一种生物物质, 并且

其中微针形成生物相容聚合物在非交联时是水溶性的。

37. 一种用于制造微针的方法, 包括 :

提供玻璃光掩模，在玻璃光掩模中蚀刻了微透镜；

将至少一个微针形成生物相容聚合物与玻璃光掩模的表面接触以便在玻璃光掩模的表面上形成微针形成生物相容聚合物层，该微针形成生物相容聚合物层具有厚度，该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到玻璃光掩模；以及

执行曝光工艺，包括选择性地将电磁能引导至玻璃光掩模和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合，

其中在基本上不存在涉及形成尖锐微针集合而不是从微针集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下，该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

制造聚合物微针的新方法

技术领域

[0001] 本公开总体上涉及微针设备以及用于使用光刻术从生物相容聚合物制造微针的方法。更具体而言，本公开的各方面针对使用生物相容聚合物（生物聚合物）通过生物相容、基本上生物相容或者充分生物相容的制造技术制造微针设备。依照本公开的特定实施例，制造微针设备，其可以例如在微针轴和 / 或微针背衬层上和 / 或内携带诸如药物 / 蛋白质之类的生物物质（例如罗丹明 B 或者牛血清白蛋白 (BSA)）。生物相容、基本上生物相容或者充分生物相容的制造工艺可以包括针对有限的时间量通过图案化掩模的聚合物的基于紫外线的光交联，以便确保高的生物物质结构和 / 或功能完整性或者稳定性。图案化掩模促进在生物聚合物中逐渐形成特定图案，这导致微米级针结构或者微针的形成。在多个实施例中，用来制造微针的生物相容聚合物包括基于聚（乙二醇）(PEG) 的聚合物。

背景技术

[0002] 随着新生物技术方法和重组技术的出现，许多新的且有效的生物治疗药物正被合成。药物学家们被提出开发新颖的药物输送系统以便有效地将这些分子输送至作用位点的挑战。这些新输送系统必须能够克服生物化学和解剖学上的障碍以帮助药物运输，控制药物释放的速率和持续时间，防止大分子酶促或者原位降解，并且将药物输送至目标位点。

[0003] 口服给药是输送常规的药物中迄今最成功的。然而，这些新的生物治疗药物易于经受胃肠道的严酷酸性和酶促环境下的降解以及肝脏中的首过代谢，导致低的生物利用度。

[0004] 相比较而言，皮下注射是一种更有效的药物输送系统，因为静脉注射输送的药物绕开了首过代谢。然而，皮下注射具有它们自身的限制。这些限制包括疼痛、感染的风险、需要经过训练的人员给药，以及要求尖锐件处置。

[0005] 作为这些限制的结果，寻求一种更有效的药物输送方法，其具有很少的或者没有皮下注射针的限制，或者通过口服给药途径。经皮药物输送已经发展到在药物输送界具有显著的影响，并且争相提供口服给药和皮下注射的可行替代方案。通过该途径输送药物提供了若干优点，例如避免了药物在肠道和肝脏中的过早新陈代谢，导致剂量节省，并且比皮下注射疼痛更小，皮下注射产生危险的生物医学废物并且在针重复使用的情况下造成疾病传播的风险。经皮系统是非侵入式的，并且服从自我施用，从而增大了患者顺应性并且降低了医疗成本。

[0006] 经皮输送系统包括局部用配方，并且最近包括经皮贴片。诸如凝胶剂、软膏剂和乳膏剂之类的局部用配方如今使用了数十年，并且对于利用小的亲脂性和低剂量药物进行局部和短期治疗是成功的。用于诸如东莨菪碱、烟碱、芬太尼以及雌二醇之类的亲脂性药物的经皮贴片被批准销售，并且广泛用于各种各样的条件。每年，超过 10 亿的经皮贴片被制造出来，并且 2003–2007 年之间每 7.5 个月批准一种新的贴片。

[0007] 尽管在各种各样的条件下是有利的，但是这些经皮药物输送系统不适于诸如蛋白质、多肽和疫苗之类的新颖生物治疗药物。这些新的化合物由于其亲水性和大分子重

量的原因而不能以治疗上有用的速率跨过角质层的生物学障碍。表皮的最外层角质层为 10–15 μm 厚，并且阻止了大于 400Da 的分子被动地扩散到皮下组织。这由以下事实例证：贴片中当前制造的最小药物是烟碱 (162Da)，并且最大的是奥昔布宁 (359Da)。创建输送这些大分子的输送系统在过去十年成为配方科学家的主要挑战。

[0008] 为了输送这些大分子，研究了一批方法，包括化学渗透增强剂、离子导入、超声、激光和电穿孔。已经针对其渗透增强效果研究了制药配方中破坏角质层的双层结构的许多化学赋形剂。这些化学制剂的主要缺陷是伴随的与增大的渗透相关的皮肤刺激。主要取决于跨角质层驱动带电分子的电动力的离子导入法由于破坏皮肤障碍的有限能力而在用于大分子的应用中受限。因此，它被用于重量仅为数千道尔顿的分子。超声是一种振荡压力波，被认为通过生成将药物分子驱动到皮肤中的压力梯度和振荡而增大皮肤渗透率。像离子导入法一样，超声也能够增大小的亲脂性药物分子的渗透率。电穿孔法使用短的高压脉冲破坏角质层的脂质双层，帮助亲脂性和亲水性药物的扩散。然而，由于高电场和产生的肌肉刺激而引起的关联的疼痛是一个关注的领域，并且由于设备装置的复杂要求的原因，该技术未被广泛地研究。尽管所有这些方法在概念上都是合理的，但是它们中没有一个能够在跨角质层输送高分子重量和亲水性分子中形成令人信服的影响。

[0009] 近来，首先适用于半导体工业中的高精度微电子工具和微型化技术被定制为设计诸如微针之类的微米级药物输送系统。微针是由许多突起组成的小的微米级设备，其中这样的突起的高度和形状由制造工艺决定。微针以类似于经皮贴片的方式应用到皮肤，并且在角质层中产生微米级范围的孔隙，从而允许亲水性以及大分子重量的药物通过皮肤并且模仿皮下注射针的各方面。因此，微针可以被认为是一种介于安全且方便的经皮贴片与高效的皮下注射之间的混合药物输送系统。

[0010] 由于微针处于微米级 (600–700 微米长, 10–60 微米尖端直径)，因而它们不足够深地刺入皮肤中以刺激痛觉感受器，并且因此是相对无疼痛的。由于微针尺寸小的原因，对于应用位点的创伤也是低的，并且因此伤口愈合相对较快。也已经证明，微针产生的暂时孔隙在移除微针之后的 72 小时内闭合。这使得微针的使用对于康复受损或者需要经常注射的患者（例如糖尿病患者）是非常有吸引力的。最后，微针无需专门的使用培训。

[0011] 药物的部分可能涂敷在微针上或者封装在其核心中并且输送至皮下组织。由于其尺寸小的原因，预期微针规避留在皮层中的任何神经纤维或者血管，并且这在先前的研究中在临幊上被证明。

[0012] 许多研究组大量研究和使用了各种不同的材料和制造技术。微针由硅、金属、沸石和聚合物制造。硅在微电子学工业中的广泛使用及其相对较低的成本使得它在微针发展的早期阶段成为用于微针制造的合适材料。

[0013] 聚合物微针近年来受到来自药物输送科学家的大量关注，开发了由聚合物制造微针的若干方法。各种不同的聚合物被使用，包括聚 (乙烯吡咯烷酮)、它与甲基丙烯酸的共聚合物以及聚交酯共乙醇酸。糖和糖的衍生物（比如右旋糖、麦芽糖、半乳糖、羧甲基纤维素和支链淀粉）也用于制造微针。使用的这些材料是生物相容、成本有效的，并且不生成生物危害性废物。

[0014] 药物通过涂敷到硅或金属微针的轴上而输送。然而，利用这种方法，只有有限数量的药物可以被装载到微针轴上，缩减显著的药物剂量。另一种方法涉及利用微针对皮肤预

处理以便产生暂时的孔隙，并且以药物溶液的形式施加药物。硅和金属微针的易碎性质是个严重的问题。这些材料不可生物降解，并且其生物相容性有问题，包含它们断在皮肤中或者不经意间误用的风险。另一方面，除了药物涂敷以及利用其前驱预处理皮肤之外，聚合物微针也用来封装药物。大多数这些先前开发的聚合物微针着眼于诸如胰岛素、肝素和疫苗之类的蛋白质药物。它们被证明在插入到皮肤中时释放负载。从微针释放的药物可以形成储存库，它们可以从那里吸收到体循环或者淋巴管。将药物封装在聚合物核心内提供了以下优点：载药量更高并且方便省略多个步骤的配方。因此，将药物封装在微针内在过去2-3年受到了来自经皮药物输送科学家的最多关注。然而，用于这些微针的制造方法是苛刻的，并且不能推广以便确保蛋白质的稳定性。高温(150-160°C)已经用于糖微针的微成型，而长时间暴露于紫外光已经用于从聚(乙烯吡咯烷酮)发展出来的微针。其他组使用的铸造方法利用需要使用高温和真空浓缩水凝胶的聚合物或者糖衍生物，其已经表现出其对于易碎蛋白质分子的有害作用。像湿法硅蚀刻、反应离子蚀刻和基于激光的方法那样的其他复杂的过程涉及精细的处理，其增加了工艺的总体成本。

发明内容

[0015] 本公开的第一方面提供了一种用于微针设备制造的方法，该方法可以包括：提供背衬结构；将至少一个微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触以便在背衬结构的表面上形成微针形成生物相容聚合物层，该微针形成生物相容聚合物层具有厚度，该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到背衬结构；以及执行曝光工艺，包括选择性地将电磁能引导至背衬结构和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合，其中在基本上不存在涉及形成微针集合而不是从微针集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下，该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

[0016] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括其中在执行曝光工艺之前，背衬结构和微针形成生物相容聚合物层中的至少一个携带至少一种生物物质，并且其中曝光工艺包括以避免所述至少一种生物物质的显著降解的方式将电磁能引导至背衬结构和微针形成生物聚合物层的部分中。

[0017] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括其中在执行曝光工艺之前，背衬结构和微针形成生物相容聚合物层中的至少一个携带至少一种生物物质，并且其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似80%的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

[0018] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似90%的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

[0019] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括其中以维持所述至少一种生物物质的至少近似95%的结构和功能完整性的方式执行曝光工艺。

[0020] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括在微针设备制造的每个步骤期间将所述至少一种生物物质维持在其中预期发生显著的生物物质降解的生物物质降解阈值温度以下的温度处。

[0021] 在实施例中，上面描述的本公开的方法可以包括其中生物物质降解阈值温度为近似40°C。

[0022] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中生物物质降解阈值温度为近似 30℃。

[0023] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中生物物质降解阈值温度为近似 27℃。

[0024] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括避免将所述至少一种生物物质暴露于反应性血浆物种和碳基化学溶剂。

[0025] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括至少基本上避免将所述至少一种生物物质暴露于不同于水的溶剂。

[0026] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括避免将所述至少一种生物物质暴露于不同于水的溶剂。

[0027] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中微针设备制造的每个步骤发生在洁净室环境外部。

[0028] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括曝光事件集合,每个曝光事件包括在预期避免所述至少一种生物物质的显著降解的时间段内将电磁能引导至背衬结构和微针形成生物聚合物层的部分中。

[0029] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括单个曝光事件。

[0030] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于超过近似 60 焦耳的紫外光能量。

[0031] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于超过近似 50 焦耳的紫外光能量。

[0032] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括避免将所述至少一种生物物质暴露于超过近似 45 焦耳的紫外光能量。

[0033] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括:至少邻近背衬结构设置光掩模,该光掩模在其中具有开口集合,该开口集合与微针截面区域集合相应;以及引导电磁能通过开口集合、背衬结构的部分以及微针形成生物相容聚合物层的部分中的每一个。

[0034] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中背衬结构包括支撑构件和生物相容聚合物背衬层中的至少一个。

[0035] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中背衬结构排除生物相容聚合物背衬层。

[0036] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中微针形成生物相容聚合物包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的聚合物。

[0037] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中生物相容聚合物背衬层包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的聚合物。

[0038] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中将微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触包括:提供具有内表面集合的腔室,该内表面集合的至少一个内表面包括背衬结构的用于接触微针形成生物相容聚合物的表面;以及将微针形成生物相容聚合物引入到腔室中。

[0039] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中将微针形成生物相容聚合物与背衬结构的表面接触进一步包括:确立与微针集合内的微针的预期长度相应的腔室深度。

[0040] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中执行曝光工艺包括选择性地将电磁能引导到腔室中。

[0041] 在实施例中,上面描述的本公开的方法可以包括其中提供背衬结构包括:提供支撑构件;提供具有内表面集合的腔室,该内表面集合内的至少一个内表面包括支撑构件的表面;将至少一个生物相容聚合物引入到腔室中;将所述至少一个生物相容聚合物和支撑构件的与内表面集合的内表面相应的表面接触,从而形成由支撑构件的表面承载的生物相容聚合物层;以及将电磁能引导到腔室中以便使所述至少一个生物相容聚合物层的部分交联,从而形成由支撑构件的表面承载的生物相容背衬层。

[0042] 本公开的第二方面提供了一种用于制造微针设备的装置,该装置可以包括腔室,该腔室包括:腔室主体,其具有内表面集合;背衬结构接纳部分,其被配置成承载背衬结构,使得背衬结构的表面形成内表面集合内的内表面;以及腔室开口,其被配置用于将生物相容聚合物引入到腔室中。

[0043] 在实施例中,上面描述的本公开的装置可以包括被配置用于选择性地确立与微针长度相应的腔室深度调节机构。

[0044] 在实施例中,上面描述的本公开的装置可以包括紫外光固化站,该紫外光固化站被配置用于引导紫外光通过背衬结构的表面,该表面形成腔室的内表面集合内的内表面。

[0045] 在实施例中,上面描述的本公开的装置可以包括其中腔室包括被配置用于冲洗介质(medium)通过其进行流体连通的至少一个开口集合。

[0046] 本公开的第三方面提供了一种微针设备,该微针设备可以包括:微针集合,其包括微针形成生物相容聚合物的交联区,该微针形成生物相容聚合物被配置用于响应于表现出交联波长集合的电磁能而交联;以及背衬结构,其承载微针集合,该背衬结构关于交联波长集合至少部分地透射,其中微针集合和背衬结构中的至少一个携带至少一种生物物质,并且其中微针形成生物相容聚合物在非交联时是水溶性的。

[0047] 在实施例中,上面描述的本公开的微针设备可以包括其中背衬结构包括支撑构件和生物相容聚合物层中的至少一个。

[0048] 在实施例中,上面描述的本公开的微针设备可以包括其中微针形成生物相容聚合物和背衬结构中的至少一个包括基于聚(乙烯)乙二醇(PEG)的材料。

[0049] 本公开的第四方面提供了一种用于微针设备制造的方法,该方法可以包括:提供具有前表面和后表面的第一背衬结构;将至少一个微针形成生物相容聚合物与第一背衬结构的前表面接触以便在第一背衬结构的前表面上形成微针形成生物相容聚合物层,该微针形成生物相容聚合物层具有厚度,该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到第一背衬结构的前表面;以及执行曝光工艺,包括选择性地将电磁能引导至第一背衬结构和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合,其中微针集合化学耦合到第一背衬结构的前表面;提供第二背衬结构;以及将具有化学耦合到第一背衬结构的前表面的微针的第一背衬结构与第二背衬结构组合,其中第二背衬结构经由预聚物溶液化学耦合到第一背衬结构的后表面;其中在基本上不存在涉及形成微针集合而不是从微针

集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下,该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

[0050] 本公开的第五方面提供了一种微针设备,该微针设备可以包括:微针集合,其包括微针形成生物相容聚合物的交联区,该微针形成生物相容聚合物被配置用于响应于表现出交联波长集合的电磁能而交联;以及第一背衬结构,其具有前表面和后表面,该第一背衬结构在第一背衬结构的前表面上承载微针集合,该第一背衬结构关于交联波长集合至少部分地透射;以及第二背衬结构,其承载承载微针集合的第一背衬结构,该第二背衬结构经由预聚物溶液化学耦合到第一背衬结构的后表面;其中微针集合、第一背衬结构和第二背衬结构中的至少一个携带至少一种生物物质,并且其中微针形成生物相容聚合物在非交联时是水溶性的。

[0051] 本公开的第六方面提供了一种用于制造微针的方法,该方法可以包括:提供玻璃光掩模,在玻璃光掩模中蚀刻了微透镜;将至少一个微针形成生物相容聚合物与玻璃光掩模的表面接触以便在玻璃光掩模的表面上形成微针形成生物相容聚合物层,该微针形成生物相容聚合物层具有厚度,该微针形成生物相容聚合物层可化学耦合到玻璃光掩模;以及执行曝光工艺,包括选择性地将电磁能引导至玻璃光掩模和生物相容聚合物层的每一个的部分中以便在生物相容聚合物层内形成微针集合,其中在基本上不存在涉及形成微针集合而不是从微针集合移除非交联生物相容聚合物材料的附加制造工艺的情况下,该微针集合包括适合于刺入到皮肤中的交联生物相容聚合物材料。

[0052] 在实施例中,上面描述的本公开的用于制造微针的方法可以包括其中具有与其化学耦合的微针集合的光掩模部分地浸没到包含预聚物溶液的容器中,其中微针集合的部分浸没到预聚物溶液中,并且其中预聚物溶液包围微针的浸没部分以形成背衬层。

附图说明

[0053] 这里,参照附图描述本公开的实施例,在附图中:

[0054] 图 1A 为依照本公开实施例的代表性微针设备制造工艺的流程图。

[0055] 图 1B 和图 1C 为依照本公开实施例的微针设备制造工艺的示意图:(B) 制造工艺的图解机构。PEGDA 使用 UV 辐射经由自由基聚合附接到涂敷 TMS 的盖玻片,形成用于微针的背衬。(C) 使用载玻片作为支撑,将 PEGDA 背衬安装到所述机构上,PEDGA 填充到封闭的腔体中。随后,用 UV 光照射该机构。UV 光只能穿过光掩模上的透明区,形成依照本公开实施例的微针。

[0056] 图 2 为依照本发明实施例的光掩模模板的图示。

[0057] 图 3A-3D 示出了依照本公开的代表性实施例的微针阵列中的药物结合:(A) 没有罗丹明 B;(B) 罗丹明 B 在微针轴中;(C) 罗丹明 B 在背衬层中;(D) 依照本发明实施例,罗丹明 B 在微针轴和背衬二者中(杆 100 微米)。

[0058] 图 4A-4C 示出了垫片数量增加对于以下各项的影响:(A) 各个不同垫片处的图像;(B) 微针长度随着垫片的增加而增大;(C) 依照本公开实施例,尖端直径随着垫片的增加而减小。

[0059] 图 5A-5F 示出了 UV 参数对于微针几何结构的影响:(A) 聚合时间(C) 强度(E) 与 UV 源的距离对于微针长度的影响,(B) 强度(D) 聚合时间(F) 依照本公开实施例,与 UV 源

的距离对于尖端直径的影响。

[0060] 图 6A-6H 示出了垫片数量增加的影响。(A-F) 各个不同(2-7个盖玻片)垫片处的图像,微针长度分别为 252 μm、441 μm、680 μm、820 μm、1044 μm 和 1211 μm;(G) 微针长度随着垫片的增加而增大;以及(H) 依照本公开实施例,尖端直径随着垫片的增加而减小。

[0061] 图 7A-7D 示出了微针刺入死猪皮肤中:(A) 用台盼蓝着色的微针刺入区域;(B) 使用 27 号皮下注射针(4x3 阵列)刺入皮肤和通过台盼蓝对孔着色的正控制;(C) 应用到随后被台盼蓝着色的皮肤上的负控制(无微针);(D) 依照本公开实施例,应用微针之后利用苏木精和曙红着色的皮肤组织切片。

[0062] 图 8A-8B 示出了跨 1 周时段的封装在微针中的罗丹明 B 的释放曲线:(A) 释放的百分比数量在不同的封装浓度之间不显著地变化;以及(B) 依照本公开实施例,释放的累积量。

[0063] 图 9 示出了依照本公开实施例的在跨 48 小时时段利用微针贴片或者罗丹明 B 的丙二醇溶液应用时通过老鼠皮肤渗透的罗丹明 B 的累积量。

[0064] 图 10A-10F 示出了牛血清白蛋白得克萨斯红轭合物(TR-BSA)在表现出均匀分布的聚合物微结构中的封装。均匀分布的 TR-BSA 在:(A) 微针背衬中;(B) 通过共焦显微镜观察的微针轴中;(C) 通过立体显微镜观察的微针阵列中。荧光强度的定量估计表现出均匀分布;(D) 背衬层的不同区域(n=3)中;(E) 微针轴上的不同长度(n=6)中;以及(F) 依照本公开实施例的阵列的不同微针中。

[0065] 图 11 示出了依照本公开实施例的 24、48、72 小时之后从微针释放的蛋白质标准标记物、牛血清白蛋白标准和牛血清白蛋白(M.W.:66kDa)的 SDS-PAGE 图像。

[0066] 图 12A-12B 示出了评估封装的 BSA 的稳定性的圆二色性分析。将 37°C 下储存 3 天之后从微针释放的 BSA 的稳定性与新鲜制备的 BSA 溶液以及 75°C 和 pH 2 酸性条件下通过加热降解的 BSA 进行比较:(A) 平均残基椭圆率,以及(B) α 螺旋百分比。所有结果证实,依照本公开实施例,在跨越 3 天时段的封装和释放期间,BSA 的 α 融合结构被保持。

[0067] 图 13 示出了评估封装的 BSA 的三级结构的荧光光谱分析。通过分析 BSA 的发射光谱将 37°C 下储存 3 天之后从微针释放的 BSA 的稳定性与新鲜制备的 BSA 溶液以及 75°C 和 pH 2 酸性条件下通过加热降解的 BSA 进行比较。依照本公开实施例,发现峰值 BSA 发射波长对于所有样本是相似的。在降解的 BSA 样本中没有观察到荧光。

[0068] 图 14A-14B 示出了跨 6 小时时段的封装在微针中的 BSA 的释放曲线:(A) 释放的百分比数量,以及(B) 依照本公开实施例,释放的累积量。

[0069] 图 15A-15B 示出了作为依照本公开实施例的微针设备的应用结果,每单位面积渗透通过老鼠皮肤的牛血清白蛋白(BSA)的累积量与 BSA 的丙二醇溶液相比的增量。

[0070] 图 16A-16C 示出了使用以下细胞的体外生物相容性测试:(A) 人类真皮成纤维(HDF)细胞;(B) HaCaT 细胞;以及(C) 人类胚肾 293(HEK293) 细胞,其展示了高细胞存活率,表明依照本公开实施例的 PEGDA 微针的生物相容性。

[0071] 图 16D-16F 为这样的曲线图,其说明使用乳酸脱氢酶测定利用(D) 人类真皮成纤维细胞(HDF)、(B) 成人低钙高温(HaCaT) 细胞和(C) 人类胚肾 293(HEK293) 细胞的体外细胞毒性试验展示了低毒性,表明依照本公开实施例的 PEGDA 微针的生物相容性。

[0072] 图 17A-17D 为用于制造依照本公开实施例的微针集成厚贴片设备的工艺的示意

图 : (A) 在涂敷 TMSPMA 的盖玻片上制造薄背衬层 ;(B) 使用高强度紫外光辐射制造微针 ;(C) 使用低强度紫外光辐射制造厚背衬层贴片 ; 以及 (D) 将薄背衬层上的微针与厚背衬层贴片组合的最终步骤。

[0073] 图 18A-18B 示出了依照本公开实施例的在制造本公开的微针集成厚贴片设备期间形成的微针阵列的图像, 其中这些图像使用尼康 AZ100 多用途变焦显微镜采集 : (A) 没有罗丹明 B 的纯微针阵列, 以及 (B) 罗丹明 B 封装在所有层中的微针阵列。

[0074] 图 18C-18F 示出了依照本公开实施例使用皮肤模型施加不同力之后微针集成厚贴片设备的微针阵列的图像, 其中这些图像证明微针的锐度被维持, 并且其中这些图像使用尼康 AZ100 多用途变焦显微镜采集 : (C) 施加 10N 的力 ; (D) 施加 30N 的力 ; (E) 施加 50N 的力 ; 以及 (F) 施加 70N 的力。

[0075] 图 18G 为这样的曲线图, 其图示出依照本公开实施例的将变化的力应用于微针阵列上和应用到微针阵列之后的微针长度。

[0076] 图 19A-19D 为这样的图像, 其示出依照本公开实施例的通过在老鼠皮肤上施加变化量的力将微针刺入该皮肤中 : (A) 施加 10N 的力 ; (D) 施加 30N 的力 ; (E) 施加 50N 的力 ; 以及 (F) 施加 70N 的力。

[0077] 图 19E 为这样的曲线图, 其图示出依照本公开实施例的基于如通过台盼蓝着色所示应用或施加的力刺入皮肤的微针的数量和百分比。

[0078] 图 20A-20B 为这样的曲线图, 其示出来自依照本公开实施例的封装了利多卡因的微针集成厚贴片设备的体外释放测试的结果 : (A) 跨 24 小时体外释放利多卡因, (B) 跨前两个小时体外释放利多卡因。释放的利多卡因的累积量随着利多卡因的封装浓度的增加而增加。

[0079] 图 20C-20D 为这样的曲线图, 其图示出依照本公开实施例的来自微针集成厚贴片设备的利多卡因通过老鼠皮肤的渗透 : (C) 跨 24 小时的渗透, (D) 跨前两个小时的渗透。依照本公开实施例, 从本公开的 21% 利多卡因微针集成厚贴片渗透的利多卡因的量比 Lignopad (一种商业贴片) 的更高。对于依照本公开实施例的 21% 利多卡因微针集成厚贴片, 观察到更高的初始利多卡因渗透率。

[0080] 图 21 为这样的曲线图, 其示出以下各项的依照本公开实施例的 FTIR-ATR 光谱学结果 : (A) 预聚物溶液 ; (B) 利多卡因粉末 ; (C) 21% 利多卡因溶解在预聚物溶液中的预聚物溶液 ; (D) 聚合的预聚物膜 ; 以及 (E) 具有 21% 利多卡因膜的聚合的预聚物。

[0081] 图 22A-22C 为用于制造锋利或尖锐的依照本公开实施例的微针的工艺的示意图, 其中锋利或尖锐的微针可以用于依照本公开实施例的高效的经皮生物活性物质 (即药物和 / 或蛋白质) 输送。图 21(A) 为依照本公开实施例的透镜或微透镜嵌入其中的光掩模的制造工艺的示意图 : (1) 4" 玻璃晶片 ; (2) 使用电子束蒸发器沉积的 Cr/Au 层 ; (3) 利用光掩模将 Cr/Au/ 光刻胶掩蔽层暴露于 UV 光 ; (4) 使用 Cr/Au 蚀刻剂在层上形成图案 ; (5) 在假硅晶片上临时粘合玻璃 ; (6)-(7) 使用 HF/HC1 蚀刻剂的湿法蚀刻 (各向同性) 工艺, 接着是超声波处理 ; 以及 (8) 对假硅晶片脱粘和移除光刻胶层。图 21(B) 为依照本公开实施例的锋利或尖锐的微针的制造工艺的示意图 : 通过图 21(A) 中所示的制造工艺所制备的、微透镜嵌入其中的涂敷铬的光掩模 (9x 9 阵列) 置于包含预聚物溶液的腔体上方并且暴露于 UV 辐射。图 21(C) 为依照本公开实施例的背衬层的制造工艺的示意图 : 微透镜嵌入其中且

具有附接到光掩模的、通过图 21(B) 中所示的制造工艺所制备的锋利或尖锐的微针的光掩模置于填充有预聚物溶液的容器中并且暴露于 UV 辐射。

[0082] 图 23A-23D 为图示出依照本公开实施例的具有嵌入或者蚀刻于其中的微透镜的光掩模的表征的图像：(A) UV (365nm) 曝光将光聚焦到锥形路径上，产生渐细的微针；(B) 蚀刻到玻璃衬底中的微透镜阵列的部分的 SEM 图像；(C) 微透镜的 SEM 图像；以及 (D) 模仿微透镜的 PDMS 模具复制品阵列的部分，其在立体显微镜下表现出变平的凸表面。

[0083] 图 24A-24D 为图示出 UV 参数对于依照本公开实施例的微针几何结构的影响的曲线图。图 23A-23B 图示出 (A) 强度和 (C) 垫片厚度对于依照本公开实施例的微针长度的影响。图 23C-23D 图示出 (B) 强度和 (D) 垫片厚度对于依照本公开实施例的微针尖端直径的影响。

[0084] 图 25A-25C 为微针阵列的图像，其图示出改变用于制造依照本公开实施例的背衬层的预聚物体积的影响：(A-C) 各个不同预聚物体积（例如 300 μ l、400 μ l 和 550 μ l）下分别具有得到的 1224、813 和 583 的平均微针长度的微针阵列的图像。

[0085] 图 25D-25F 为断裂力测试之后与图 24A-24C 相应的微针阵列的图像。

[0086] 图 25G-25I 为这样的曲线图，其图示出：(G) 依照本公开实施例，微针长度随着预聚物体积的增加而减小；(H) 依照本公开实施例，微针基部直径随着预聚物体积的增加而减小；以及 (I) 依照本公开实施例，跨三个不同的预聚物体积的中性或可比较微针断裂力。

[0087] 图 26A-26D 为通过台盼蓝着色所示的图像，其示出依照本公开实施例的微针刺入老鼠腹部皮肤中：(A-C) 分别由平均长度为 1224 μ m、813 μ m 和 583 μ m 的微针用拇指的力刺入；以及 (D) 通过台盼蓝着色的负控制（无微针处理）。

[0088] 图 26E-26F 为这样的曲线图，其图示出：(E) 依照本公开实施例的平均长度为 1224 μ m、813 μ m 和 583 μ m 的成功刺入的微针的数量；以及 (F) 依照本公开实施例的平均长度为 1224 μ m、813 μ m 和 583 μ m 的微针的刺入百分比。

[0089] 图 27A-27D 为这样的图像，其图示出依照本公开实施例的通过微针预处理的皮肤的增强的胶原蛋白渗透：(A) 死鼠皮肤的自发荧光；以及 (B-D) 分别针对胶原蛋白浓度 0.025、0.05 和 0.075% w/v，与老鼠皮肤的自发荧光一起的牛胶原蛋白 1 型 FITC 鞍合物的荧光。

具体实施方式

[0090] 在以下具体实施方式中，参照了形成其一部分的附图 / 绘图。在图中，相似的符号典型地标识相似的部件，除非上下文另有规定。具体实施方式、附图和权利要求中描述的说明性实施例并不预期是限制性的。可以在不脱离本文给出的主题的精神或范围的情况下利用其他的实施例并且可以做出其他的改变。

[0091] 在本公开中，给定元素的描述，或者特定图中的特定元素编号的考虑或使用，或者相应描述材料中对其的引用可以涵盖另一图中或者与其关联的描述材料中标识的相同、等效或者类似的元素或元素编号。在图中或者关联的文字中使用“/”被理解为表示“和 / 或”，除非另有指示。此外，特定数值或者值范围的记载分别被理解为近似数值或者值范围的记载。

[0092] 当在本文中使用时，措词“集合”依照已知的数学定义（例如以与 An Introduction

to Mathematical Reasoning:Numbers, Sets, and Functions,"Chapter11:Properties of Finite Sets"(例如如第140页所指示的),by Peter J.Eccles,Cambridge University Press(1998)中所描述的相应的方式)相当于或者被限定为元素的非空有限组织,其在数学上表现为至少为1的基数(即,本文所限定的集合可以相当于一个单元、单峰或者单元素集合或者多元素集合)。通常,根据考虑的集合类型,集合的元素可以包括或者可以是系统、装置、设备、结构、对象、过程、物理参数或者值。

[0093] 除非另有规定,当在本文中使用时,措词“包含”和“包括”及其语法变型意在表示“开放式”或者“包容性”语言,使得它们包括记载的元素,但是也允许包括附加的未记载的元素。

[0094] 当在本文中使用时,在成分的测量值、条件、浓度等的背景下,措词“大约”表示所述值的 $+/-5\%$,或者所述值的 $+/-4\%$,或者所述值的 $+/-3\%$,或者所述值的 $+/-2\%$,或者所述值的 $+/-1\%$,或者所述值的 $+/-0\%$ 。

[0095] 在整个本公开中,一些实施例可以以范围格式公开。应当理解的是,范围格式的描述仅仅为了方便和简洁起见,并且不应当被视为对于所公开的范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,诸如从1至6之类的范围的描述应当被认为具体地公开了诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等等之类的子范围,以及该范围内的各个数字,例如1、2、3、4、5和6。不管该范围的宽度如何,这都适用。

[0096] 依照本公开的各个不同的实施例针对包括生物相容聚合物材料、物质或者合成物(此后称为“生物聚合物”)的微针装置、结构或设备;以及用于通过程序上直接的、成本有效的且生物相容、基本上生物相容或者充分生物相容的制造工艺制造微针设备的技术。这样的制造工艺避免了将生物聚合物携带的一种或多种生物物质、生物化合物、生物合成物或者生物分子(例如一种或多种药物、蛋白质、氨基酸、生长因子、疫苗或者其他生物活性或生物治疗物质、化合物、合成物或分子)暴露或者显著暴露于可能显著不利地影响、改变或者退还生物活性/生物治疗物质的结构和功能特性、属性或完整性的环境、加工条件和/或加工助剂、物种或物质,从而充分地保持或者最大化这样的生物活性/生物治疗物质的结构和功能完整性和/或这样的生物活性/生物治疗物质在由微针设备携带时保持存活的程度。

[0097] 依照本公开的微针设备制造工艺避免了将由此携带的生物聚合物和生物物质集合暴露于与常规微米级生产或制造工艺关联的加工环境/装备/条件/能量、反应物种和/或化学物质/物种,这将防止不利地影响生物物质完整性或存活率的显著可能性或风险。依照本公开的多个实施例避免将生物聚合物携带的一种或多种生物物质暴露于不必要的或者不希望的高温(例如在该温度下预期发生显著的蛋白质变性),例如显著超过室温的温度,例如高于近似40°C的温度、高于近似30°C的温度,或者高于或显著高于室温的温度,例如超过近似27°C的温度。因此,在微针制造过程或工艺期间,依照本公开的若干实施例将生物聚合物携带的一种或多种生物物质维持或者大体维持在很可能或者预期发生显著的生物物质降解的生物物质降解阈值温度之下(例如,这样的阈值温度可以被限定为近似40°C、30°C,或者高于或显著高于室温的温度,例如27°C)。给定的生物物质降解阈值温度可以基于考虑的一种或多种生物物质类型以相关领域普通技术人员容易理解的方式确定。

因此,依照本公开的实施例可以避免可能不利地影响生物物质完整性或存活率的常规微米级制造过程,例如软烘烤和硬烘烤(例如,在若干实施例中,可以完全避免或排除软烘烤和硬烘烤)。

[0098] 依照本公开的实施例可以进一步充分地或者完全地避免将这样的生物物质暴露于微米级制造工艺中常规上遇到的诸如血浆物种之类的潜在地有害的反应物种;以及微米级制造工艺中常规上遇到的诸如有机溶剂(例如碳链/碳基溶剂)或者光刻胶显影剂之类的化学物质。根据依照本公开的若干微针设备制造工艺,不同于水的溶剂被避免、至少部分地排除、被排除或者是不必要的。

[0099] 除了以上所述之外,依照本公开各个不同实施例的微针设备制造工艺减少或者最小化了制造微针设备所需的装备的数量、类型、复杂性和/或成本。例如,依照本公开实施例的微针设备制造工艺可以消除对于特定类型的常规微米级制造装备(例如旋涂机或者湿法/干法蚀刻装备)的需求。依照本公开实施例的微针设备制造工艺可以进一步最小化或者避免/消除对于洁净室设施的需求。微针设备制造工艺的各个不同的实施例涉及直接的光刻技术,需要诸如与生物聚合物固化站关联的UV光源之类的装备。

[0100] 而且,依照本公开各个不同实施例的微针设备制造工艺在少量或者最少量的步骤中以排除、避免或者消除对于常规微针制造工艺中通常遇到的一个或多个模具、模板、印模或者其他中间结构的需求的方式提供了微针或微针阵列的直接、基本上直接或者充分直接的制造。例如,依照本公开的多个微针设备制造工艺在提供或者制造例如下文所述的背衬结构之后在联合或者单一步骤中提供了微针或微针阵列的直接制造。因此,依照本公开各个不同实施例的各个不同微针设备制造工艺以无模具、无模板或者无印模的方式提供了微针阵列的制造或形成。

[0101] 代表性制造工艺的方面

[0102] 图1(A)为依照本公开实施例的代表性微针设备制造工艺100的流程图。在一个实施例中,工艺100包括第一工艺部分110,其涉及提供或者制造背衬结构,该结构包括诸如玻璃、石英、塑料、表面处理硬材料或者其他类型的基本上固态的支撑或衬底之类的支撑构件或结构和生物聚合物背衬层中的至少一个。在若干实施例中,背衬结构包括生物聚合物背衬层和支撑构件中的每一个,其中支撑构件可以被配置用于临时地、基本上永久地或者永久地承载背衬层。

[0103] 生物聚合物背衬层包括作为暴露于电磁能的结果而可交联的生物聚合物集合,例如光敏生物相容聚合物。在各个不同的实施例中,生物聚合物背衬层包括至少一种类型的可光交联的生物聚合物,诸如基于(PEG)的生物聚合物(例如丙烯酸盐PEG聚合物,诸如PEG丙烯酸酯、二丙烯酸酯(PEGDA)、甲基丙烯酸酯、甲基醚丙烯酸酯),和/或另一种生物相容聚合物。取决于实施例细节,生物聚合物背衬层可以以相关领域普通技术人员理解的方式排除或者包括一种或多种生物活性物质或合成物,例如药物、蛋白质和/或其他物质集合。

[0104] 支撑构件包括:第一表面或侧面;第二表面或侧面;以及第一与第二侧面之间限定的厚度。在各个不同的实施例中,支撑层包括平坦或者大体平坦的表面。可以是平坦或者大体平坦的表面的支撑构件的一侧(例如支撑构件的第二侧面)预期或者被配置用于承载背衬层。支撑构件的第二侧面包括或者提供可以与背衬层形成化学键的接口。在多个实施

例中,支撑构件和背衬层可以例如与支撑构件表面处理相关联或者通过该表面处理彼此化学耦合、链接或者接合,所述表面处理例如硅烷化处理,其涉及将硅烷化试剂或者基于硅烷的化学耦合试剂(例如3-[三(三甲基硅氧基)甲硅烷基]丙基甲基丙烯酸酯(TMSPMA))应用到支撑构件的第二侧面(例如依照如下文所描述的硅烷化工艺)。

[0105] 在适当的支撑构件表面处理之后,可以在支撑构件的第二表面上设置或者向该表面应用未曝光的或者非交联的生物聚合物材料,并且将其暴露于UV光以便形成背衬层。依照本公开的多个实施例,支撑构件关于形成背衬层的生物聚合物集合响应于其而光交联的电磁能波长或波长范围至少部分地透射。在若干实施例中,支撑构件关于可以使用来形成背衬层的生物聚合物材料光交联的UV光波长至少部分地透射(例如显著地或者非常显著地透射)。

[0106] 在各个不同的实施例中,将诸如UV光之类的电磁能应用到用来形成背衬层的生物聚合物材料以降低或者避免显著地降解或者不利地影响背衬层携带的生物活性物质的结构和/或功能属性的可能性的方式执行。例如,将UV光应用到用来形成背衬层的生物聚合物材料可以被调整或者控制,使得瞬时的平均或者总能量剂量维持在可能或者将预期不利地影响背衬层的生物活性物质的希望的目标或最大水平处或者以下。输送至形成背衬层的生物聚合物材料的能量剂量的调整或控制可以通过限制能量强度、功率或幅度和/或限制能量输送时间而完成。

[0107] 如下文进一步详述的,在若干实施例中,包括支撑构件和交联生物聚合物背衬层的背衬结构通过使用第一腔室或者腔体装置或结构而形成。更具体而言,可以提供第一腔体结构,其一个侧面或表面包括支撑构件或者由支撑构件形成。第一腔体结构的内表面可以由预期承载背衬层的支撑构件的第二表面的部分形成。第一腔体结构表现出或者限定了预期的内部几何维度或者预期的内部几何形状,其提供了截面区域(例如大体矩形的截面区域)和背衬层深度或厚度。可以以符合或者大体符合第一腔体结构的内部几何形状的方式将未曝光的或者非交联的生物聚合物材料引入到第一腔体结构中。这样的非交联的生物聚合物材料可以例如通过前面提到的支撑构件表面处理促进或者允许的化学键化学耦合或者键合到支撑构件。

[0108] 在将未曝光的或者非交联的生物聚合物材料引入或者输送到腔体中之后,可以引导UV光通过支撑构件并且进入第一腔体结构内的未曝光的生物聚合物材料中,从而使第一腔体结构内的生物聚合物材料交联并且形成由支撑构件承载的凝固的生物聚合物背衬层。因此,背衬层可以包括:第一表面,其耦合或者化学键合到支撑构件的第二表面;以及第二表面,其可以暴露于另外的加工,以便例如通过包括或者提供可以与微针形成生物聚合物形成化学键的接口而制造如下文进一步详述的从那里延伸或突起的微针。

[0109] 尽管上面的描述针对一种制造背衬结构的方式,但是在其他实施例中,背衬结构(即支撑构件和交联的生物聚合物背衬层)可以例如通过不同类型的腔室结构或者另一种类型的背衬结构制造装置配置而以不同的方式制造。

[0110] 所述工艺100进一步包括第二工艺部分120,该部分涉及提供第二腔室或腔体装置或结构,例如与用于制造背衬结构的装置或结构相同、充分相同或者相似的腔体装置或结构。在若干实施例中,第二腔体结构可以包括第一腔体结构本身的一个或多个部分。第二腔体结构被配置成承载背衬结构或者包括背衬结构作为第二腔体结构的表面,使得背衬

层驻留在第二腔体结构的预定内部部分或者体积（例如第二腔体结构的上面的部分、区块或者分段）内。

[0111] 第二腔体结构进一步被配置成提供 (a) 背衬层表面, 例如第二背衬层表面, 其可以是平坦或者大体平坦的表面, 其暴露在第二腔体结构内; 与 (b) 第二腔体结构的相对的或者下面的界限、边界或表面之间的深度或厚度, 其中该深度或厚度可以相应于、确定或者限定微针长度。在若干实施例中, 该深度或厚度可以以促进或者允许制造具有可选择或者可调节微针长度范围内的预期长度的微针的方式进行选择或调节（例如可自动地、半自动地或者人工地选择 / 调节）。例如, 第二腔体结构的深度可以通过机械方式（例如步进马达）、气动方式、流体方式或者插入 / 移除垫片元件而进行调节。在其他实施例中, 在第二背衬层表面与第二腔体结构的相对或者下面的内表面之间限定的第二腔体结构的深度是预定的或者固定的。

[0112] 第三工艺部分 130 涉及在第二腔体结构内提供、引入或者输送微针形成生物聚合物, 使得微针形成生物聚合物可以 (a) 通过暴露于背衬层的暴露的第二表面或者与该第二表面交互而耦合或者化学键合到背衬层; 并且 (b) 体积上占用或者基本上占用背衬层的第二表面与第二腔体结构的下表面之间的第二腔体结构的内部几何结构。微针形成生物聚合物材料包括至少一种类型的生物相容聚合物, 并且在各个不同的实施例中, 微针形成生物聚合物与形成背衬层的生物聚合物相同、基本上相同或者充分相同、相似或者大体相似。因此, 在若干实施例中, 微针形成生物聚合物包括基于 PEG 的生物聚合物（例如丙烯酸盐 PEG 聚合物, 诸如 PEG 丙烯酸酯、二丙烯酸酯 (PEGDA)、甲基丙烯酸酯、甲基醚丙烯酸酯), 和 / 或另一种生物相容聚合物。取决于实施例细节, 微针形成生物聚合物材料可以包括或者排除一种或多种生物活性物质或合成物, 例如药物、蛋白质和 / 或其他物质集合。

[0113] 第四工艺部分 140 涉及邻近或者接近背衬结构或者在背衬结构上提供或设置光掩模。更具体而言, 在各个不同的实施例中, 邻近支撑构件的第一表面或者在该第一表面上设置光掩模, 其保持在其中驻留了微针形成生物聚合物的第二腔体结构的内部的外部。如下文进一步详述的, 光掩模选择性地限定与预期的微针截面区域相应的图案化区域、区块或开口, UV 光可以通过其传播。在实施例中, 微针的形状、长度和尖端直径可以通过修改要使用的光掩模而加以修改。

[0114] 第五工艺部分 150 涉及引导 UV 光 (a) 朝着或者到光掩模; (b) 通过选择性图案化的光掩模开口; (c) 通过支撑构件的部分; (d) 通过背衬层; 以及 (e) 进入与选择性图案化光掩模开口相应的微针形成生物聚合物层的部分, 从而选择性地使微针形成生物聚合物层的部分交联并且在微针形成生物聚合物层内形成微针（例如微针阵列, 其中各微针依照光掩模开口的空间分布在空间上组织或分布）。因此, 微针形成聚合物材料的特定部分的选择性交联以及因而微针的形成通过穿过光掩模开口、背衬层和微针形成聚合物层中的每一个的特定空间上相应或对齐的部分或区块的电磁能（例如 UV 光）而发生。这样的微针具有这样的长度, 该长度相应于第二腔体结构内的背衬层的暴露的第二表面与第二腔体结构的内部的相对的或者下面的边界、界限或表面之间的前面提到的第二腔体结构的深度（例如固定或者可调节的深度）或者由该深度确定或限定。更具体而言, 相对于背衬层, 起始于背衬层的第二表面的微针的近端或基部与微针的远端或尖端之间的空间距离相应于第二腔体结构的深度或者由该深度确定或限定。

[0115] 依照本公开的多个实施例，包括作为 UV 光通过光掩模开口、这样的光掩模开口下方的支撑构件的那些部分、支撑构件和这样的光掩模开口下方的背衬层的部分传播并且进入微针形成生物聚合物材料中的结果而形成的微针形成生物聚合物材料的交联区的微针在涉及一个或多个 UV 光曝光事件（例如多个时间隔离的 UV 光曝光事件或者单个 UV 光曝光事件）的联合或单个工艺部分或步骤中形成。鉴于以上所述，交联的背衬层至少部分地透射或者充分地透射用来使微针形成背衬层交联的 UV 光。

[0116] 在各个不同的实施例中，将诸如 UV 光之类的电磁能应用到微针形成生物聚合物以降低或者避免显著地降解或者不利地影响由 (a) 背衬层和 (b) 微针形成生物聚合物层中的每一个携带的生物活性物质集合的结构和 / 或功能属性的可能性的方式执行。例如，UV 光通过背衬层且进入微针形成生物聚合物的应用可以被调整或控制，使得瞬时、平均或者总体能量剂量维持在可能或者将预期不利地影响由背衬层和 / 或微针形成生物聚合物携带的生物活性物质的希望的目标或最大水平处或者以下。输送至背衬层和 / 或微针形成生物聚合物材料的能量剂量的调整或控制可以通过限制能量强度、功率或幅度和 / 或限制能量输送时间而完成。

[0117] 第六工艺部分 160 涉及移除经由引导 UV 光通过光掩模、通过光掩模下方的支撑构件的部分、通过背衬层并且进入微针形成生物聚合物材料而形成的微针周围的未曝光 / 非交联的生物聚合物。在各个不同的实施例中，第六工艺部分 160 涉及冲洗过程，其中从微针冲洗或者洗掉微针周围的未曝光 / 非交联的生物聚合物材料。冲洗过程可以涉及例如利用冲洗介质的一次或多次冲洗（例如，其中冲洗介质包括或者是水），并且在多个实施例中，可以进一步排除或避免使用与水不同的溶剂或化学物质。取决于实施例细节，冲洗过程可以涉及将冲洗介质送入并且通过第二腔体结构（例如通过与第二腔体结构相应的开口、通路和 / 或通道集合）；和 / 或从第二腔体结构移除背衬结构交联微针单元（即承载交联的微针集合的至少一个背衬结构），并且将背衬结构交联微针单元暴露于第二腔体结构外部的冲洗介质。

[0118] 第七工艺部分 170 可以涉及进一步的加工、处理和 / 或储存通过第一到第六工艺部分 110-160 形成的一个或多个微针设备或者微针设备阵列。在一些实施例中，第七工艺部分 170 可以涉及从支撑构件移除背衬层和那里承载的微针，而在其他实施例中，支撑构件 / 背衬层 / 微针可以作为整体单元而保留或者维持。因此，任何给定的微针设备包括至少一个背衬层，所述背衬层承载从其延伸的微针或微针阵列。微针设备可以进一步包括支撑构件。

[0119] 第八工艺部分 180 可以涉及将一个或多个微针设备应用到对象的皮肤（例如人类或者动物皮肤），使得微针刺入皮肤，例如皮肤的目标位置、位点或者解剖结构。背衬层和 / 或微针携带的生物活性物质或合成物可以随后例如以与下文详细描述的方式相同或相似的一种或多种方式释放或者扩散到这样的目标皮肤位置、位点或结构中。由于依照本公开实施例的微针设备制造工艺保持或者最大化了微针设备的背衬层和 / 或微针携带的生物活性物质、化合物或合成物的结构和功能完整性和存活率，因而当与现有类型的微针设备相比较时，依照本公开实施例制造的微针设备可以预期促进或者提供生物活性物质、化合物或合成物到皮肤中的更加可靠、更加可预测和 / 或效能增强的输送。

[0120] 在一些实施例中，背衬结构生物聚合物和微针形成生物聚合物层中的一个或每一

个可以包括生物相容、惰性、生物可吸收或者生物可降解材料、合成物或结构的集合。例如，在特定实施例中，微针形成生物聚合物可以包括 PEGDA 和明胶（例如其可以在微针内形成生物物质输送基质）。

[0121] 在一些实施例中，背衬结构可以排除生物相容聚合物背衬层。更具体而言，在一些实施例中，背衬结构包括支撑构件，例如玻璃、石英、塑料或者其他硬质材料中的一种或多种，其可以被表面处理，使得 (a) 支撑构件可以直接牢固地耦合或者化学键合到支撑构件表面承载的微针形成生物聚合物层；并且 (b) 通过微针形成生物聚合物层的选择性或者优选地交联的部分制造的微针保持牢固地耦合或者化学键合到支撑构件本身。因此，在这样的实施例中，微针不接合到支撑构件承载的生物相容聚合物背衬层，而是接合到固体构件本身的一个或多个表面处理的部分。因此，微针制造经由选择性地引导电磁能通过支撑构件并且进入那里承载的微针形成生物聚合物层的部分中（例如经由引导 UV 光 (a) 朝着、到和通过邻近支撑构件或者在支撑构件上设置的光掩模中的开口集合；(b) 通过与这样的开口相应的支撑构件的部分；并且 (c) 进入由支撑构件承载且接合到支撑构件的微针形成生物聚合物层的相应部分中）而发生。其他实施例可以包括具有表面的背衬结构，该表面包括：(a) 第一表面区域或区块，其包括生物相容聚合物背衬层；以及 (b) 第二表面区域或区块，其排除生物相容聚合物背衬层。可以以与上面描述的方式相同、充分相同或者类似的方式将微针接合到每个这样的表面区域上以及在每个这样的表面区域上制造微针。

[0122] 在实施例中，本公开的微针阵列设备可以具有 1cmx1cm 或更小或者 1.5cmx1.5cm 或更小的维度。在实施例中，本公开的微针阵列设备可以具有 1cmx1cm 或更大或者 1.5cmx1.5cm 或更大的维度。也可以设想其他的维度。

[0123] 在实施例中，本公开的微针设备制造可以用来由生物相容聚合物制造具有均匀微针分布的大尺寸微针阵列，从而缓解在治疗大皮肤区域时对于多个微针应用的需求。在实施例中，具有均匀微针分布的大微针阵列可以是 2.0cmx2.0cm 或更大、5cmx5cm 或更大、10cmx10cm 或更大、15cmx15cm 或更大、20cmx20cm 或更大或者 25cmx25cm 或更大。也可以设想其他的维度。使用一个大微针阵列设备而不是几个更小的微针阵列以治疗大皮肤区域可以导致患者或者顾客的更低的总治疗成本。

[0124] 在实施例中，本公开的微针设备制造工艺可以被扩展以便制造具有更大区域的微针阵列。在实施例中，本公开的微针设备制造工艺可以被扩展以便通过利用更大的紫外光曝光区域，利用更大的光掩模以及利用更大的衬底而制造具有更大区域的微针阵列。在实施例中，具有更大区域的微针阵列的微针的均匀性和健壮性可以通过优化紫外参数以及制造期间使用的光掩模的几何维度进行控制。

[0125] 在实施例中，本公开的微针设备制造工艺可以被扩展以便制造可以在不重复使用微针的情况下产生用于更大数量的生物活性物质（即药物和 / 或蛋白质）候选的通过皮肤的多个通路的大尺寸一次性微针阵列。

[0126] 在实施例中，本公开的微针设备制造工艺可以是一种工业规模的微针设备制造工艺。

[0127] 特定代表性微针设备 / 微针设备制造工艺的方面

[0128] 在下文中，详细地描述了依照本公开的一些代表性实施例以便帮助理解。

[0129] 在本文描述的若干代表性实施例中，制造工序包括利用 TMSPMA 溶液涂敷诸如玻

璃盖玻片之类的支撑构件；通过使用 UV 辐射经由自由基聚合将至少一个涂敷 TMSPMA 的盖玻片共价链接到 PEGDA 甲基丙烯酸酯组而制造微针背衬层，其形成用于微针的 PEGDA 背衬层。所述背衬层可以为例如近似 175 μm 厚。所述包含作为光引发剂的 0.5% 的 HMP 的 PEGDA 用作预聚物溶液。该制造工序进一步包括使用载玻片作为用于控制微针长度的支撑或垫片制造微针，其中使用图案化的膜 / 光掩模将 PEGDA 背衬安装到填充了 PEGDA 预聚物溶液的封闭腔体中，其然后利用 UV 光照射。UV 光将仅仅穿过光掩模上的透明区，并且通过相关领域普通技术人员理解的交联过程形成微针。微针长度的控制通过经由增加堆叠在基部载玻片上的盖玻片的数量调节或者操纵垫片厚度而实现。

[0130] 与要求洁净室设施、蚀刻和其他复杂的微制造过程相对的是，该制造技术中的唯一主要的投资是 UV 固化站。因此，在各个不同的实施例中，微针设备制造的每个部分可能发生在诸如与制造半导体类型设备或结构相应的一种类型的微米级制造设施之类的洁净室环境外部。

[0131] 该技术中的 UV 曝光限制为仅仅几秒，这远小于利用较长曝光时间以用于聚合的其他技术。蛋白质分子和 / 或其他生物活性物质尤其是在存在 UV 光的情况下可能非常易碎，并且因此需要具有最小曝光时间、曝光能量和 / 或曝光剂量的工艺以便确保最大稳定性。聚（乙二醇）已经用在各种不同的药物输送应用中，并且因此非常适合于微针制造。本公开因此提出了一种与现有技术相比时不那么复杂、不那么耗时且相对廉价的工艺，其提供了用于这种新颖且有效的药物输送系统的商业规模制造的范围。

[0132] 依照本公开的另一个方面，微针被制造成在微针的轴或者背衬层或者二者中包含典型（model）药物 / 蛋白质（即罗丹明 B 和牛血清白蛋白（BSA））。

[0133] 代表性微针设备制造和测试实验

[0134] 依照本公开的特定实施例，进行了若干实验以制造包含代表性 / 典型药物 / 蛋白质罗丹明 B 和牛血清白蛋白（BSA）的微针并且确定微针的某些属性（例如几何特性）：

[0135] 实验 1：用于制造包含代表性生物活性物质（例如诸如罗丹明 B 之类的药物）的生物相容聚合物微针的代表性工艺

[0136] 在该实验中，针对其药物封装效率通过将典型药物罗丹明 B 封装在微针轴或背衬层或者二者中对微针进行测试。制造方法基于光刻术，涉及在单步骤工艺中通过图案化掩模将聚合物暴露于 UV 光。该技术提供了暂时暴露于 UV 光的优点。

[0137] 1.1 实验过程：

[0138] 材料

[0139] 从西格玛奥瑞奇公司（密苏里州圣路易斯）购买聚（乙二醇）二丙烯酸酯 [PEGDA (M_n 258)]、2-羟基-2-甲基苯丙酮（HMP）、3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基甲基丙烯酸酯 (TMSPMA) 和台盼蓝溶液 (0.4%)。从阿法埃莎公司（英国兰开斯特）购买罗丹明 B。使用的所有材料都是试剂纯并且像接收的那样使用。研究中使用了使用 Millipore Direct-Q[®]（法国莫尔塞姆）净化的水。

[0140] 玻璃盖玻片的涂敷

[0141] 通常将玻璃盖玻片（英国威尔士 Cell Path, 160–190 微米厚, 22x 22mm）浸没到 TMSPMA 溶液中以用于涂敷。然后，在 70°C 下烘烤盖玻片 2 小时；图 1(B) 中描绘了得到的化学相互作用。

[0142] 微针背衬层的制造

[0143] 如图 1(B) 所示,两个未涂敷的盖玻片在载玻片(中国赛欧品牌)任一侧受支撑,以便创建具有近似 175 μm 深或厚的空间的腔体或腔室。然后,将涂敷 TMSPMA 的盖玻片置于该机构上 / 上方。包含 0.5% v/v 的 HMP 的 PEGDA(称为预聚物溶液)通过毛细作用被吸到盖玻片与载玻片之间的间隙中(即到腔室的内部)。该机构使用 EXFO OmniCure® S200-XL UV 固化站(UV 滤光器 320–500nm)(加拿大光子解决方案公司的 EXFO)利用 12.4W/ cm^2 的高强度紫外光照射 1 秒钟。UV 光的强度利用 OmniCure® R2000 辐射计(加拿大光子解决方案公司的 EXFO)测量。准直适配器(EXFO810-00042)与 UV 光探针一起使用。键合到玻璃盖玻片的 TMSPMA 分子经由自由基聚合共价链接到 PEGDA 甲基丙烯酸酯组(图 1(B),虚线椭圆内)。近似 175 μm 厚的背衬层容易从该机构中移除。

[0144] 微针的制造

[0145] 在若干实施例中,除了垫片的数量之外,用于制造微针的机构与用于微针背衬的机构类似或相似。垫片数量将决定制造的微针的长度。如图 1(C) 所示,增加垫片厚度通过增加堆叠在基部载玻片的任一侧的盖玻片数量而实现。于是,预聚物溶液在制造背衬层期间通过毛细作用类似地被吸到该间隙中。塑料膜特别地以微针阵列设计的图案涂上墨。膜的背景被涂上墨,在阵列图案中留下透明的小圆圈以允许 UV 光穿过(新加坡无限图形私人有限公司)。该图案化的膜(也称为光掩模,图 2)被设计成在阵列图案中具有不同直径的透明圆圈,其决定微针的基部直径。类似地,可以控制两个微针之间的中心 - 中心间距。这样的膜置于制造机构上,其随后利用高强度 UV 光照射。光掩模的使用阻挡 UV 访问涂墨区并且允许 UV 光穿过透明圆圈,这导致微针结构的形成,从而形成微针,这些微针与背衬层中的 PEGDA 大分子单体共价键合以便形成互穿聚合物网络(IPN)(参见图 1(C),虚线矩形内)。从基部载玻片小心地移除附接到盖玻片的微针结构,并且利用去离子水清洗以便移除非交联的前驱溶液。然后,使用尼康 SMZ 1500 立体显微镜对制备的微针成像(图 3(A))。也针对其药物封装效率通过将典型药物罗丹明 B 封装在微针轴(图 3(B))或背衬层(图 3(C))或者二者(图 3(D))中测试微针。

[0146] 微针长度的控制

[0147] 为了将药物对准皮肤的特定或目标区域、位置、位点或结构,微针长度应当是可适当控制的 / 适当控制。本发明人通过增加堆叠在基部载玻片上的盖玻片的数量而操纵垫片厚度(图 1(C))。基部载玻片与涂敷 TMSPMA 的盖玻片(其承载 PEGDA 微针背衬层)之间的空间的这种连续增大增加了微针长度(ANOVA, p<0.001)。在每个步骤,将一个盖玻片添加到叠层,从而增加垫片厚度近似 175 微米。垫片厚度可以容易地在 350–1225 微米之间变化。按照这种或者类似、相似或概念上相应或相关的方式,微针长度可以例如在 230 微米至 1150 微米之间变化,每一个由 175 微米的平均盖玻片厚度证实(图 4(A) 和图 4(B))。垫片厚度的增加也导致微针尖端直径的相应减少。例如,尖端直径可以在 67 至 45 微米之间变化(图 4(C))。微针的长度和尖端直径是重要的几何参数,其决定微针刺入皮肤的容易程度和深度,这对于特定于位点的生物物质(例如药物 / 蛋白质)输送是有意义的。

[0148] 微针插入猪皮肤中

[0149] 查明微针刺入皮肤,将 8x8 阵列的 PEGDA 微针插入到从本地屠宰场获得(在使用 CO_2 窒息宰杀猪之后)的切除的死猪皮肤中。首先使用电推剪(香港飞利浦公司)移除

毛发,接着使用脱毛膏 Veet(波兰利洁时公司)完全移除毛发。皮肤样本被清洁并且储存在-80°C下,直到使用。在使用之前,使用解剖刀移除皮下脂肪。将皮肤完全拉伸地固定在薄橡皮泥平台上以模仿组织状机械支撑。使用背衬层上的拇指力插入微针近似1分钟。

[0150] 接着,移除微针阵列,并且利用台盼蓝对插入区域着色5分钟,其特别地对角质层穿孔的位点着色。过量的着色剂用水洗掉。利用染料着色的区域使用Eikona图像软显微镜通过明场显微术观看。由27号皮下注射针组成的正控制用来产生4x3阵列形式的穿孔。利用台盼蓝着色的完好皮肤用作负控制。

[0151] 皮肤的组织学检查也通过10μm切片的微针处理的皮肤样本使用微型恒温器(德国莱卡)执行。组织学切片用苏木精和曙红着色并且通过立体显微术成像。所有动物实验都由新加坡国立大学(NUS)机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准。

[0152] 典型药物的封装:成像和体外释放

[0153] 罗丹明B分别以0.09、0.17和0.44重量的浓度溶解在预聚物溶液中。装载药物的微针样本使用荧光立体显微镜(日本尼康)成像。封装在微针中的药物的量根据药物在预聚物溶液中的百分比重量和制造的微针的重量计算。罗丹明B在背衬层或者微针轴中的选择性结合通过使用包含典型药物的预聚物溶液以分别制造背衬层或微针而成为可能。罗丹明B的体外释放通过在37°C下使制造的微针阵列悬浮在15ml的1xPBS中进行测试,并且以规则的间隔采样。在每个采样点处,撤回整个15ml释放介质并且用15ml新鲜1xPBS代替。在分析之前在4°C下储存样本。释放的量通过利用Tecan 2000酶标仪(奥地利Tecan公司)分别测量554nm和586nm的激发和发射波长处的罗丹明B荧光而进行定量。

[0154] 体外渗透通过老鼠皮肤

[0155] 为了分析应用微针之后的皮肤渗透率的增加,使用死老鼠皮肤。用解剖刀移除皮下脂肪。将包含50μg的罗丹明B的微针应用到皮肤样本。作为一种比较控制,使用供体室的丙二醇溶液中的相似浓度的罗丹明B。将皮肤安装在具有包含4.5ml的具有0.005%v/v叠氮化钠(英国兰开斯特的阿法埃莎)的1xPBS的受体室的并排扩散池(TK-6H1,中国上海佳凯科技有限责任公司)上。对于每个组,使用六个复制品。水在37°C下循环,并且利用磁力搅拌器以250rpm连续地搅拌供体和受体溶液。跨48小时的时段以规则的间隔收集样本。在每个采样点处,撤回1ml的受体介质并且利用1ml的新鲜PBS代替。在分析之前在4°C下储存样本。所有的样本小瓶在10000rpm下受离心作用,并且通过测量如先前所提到的罗丹明B荧光分析上清液。相对于时间和皮肤渗透率渗透的药物的累积量通过假设稳态流量进行计算。

[0156] 统计分析

[0157] 测试微针几何属性,针对研究的每个参数制造八个微针阵列,并且报告均值±标准偏差。对于其他的实验而言,来自三次或者更多次的测量的结果用来计算均值和标准偏差。将单向方差分析(ANOVA)用于分析多组数据或统计差异。具有小于0.05的p值的结果被认为统计上显著的。

[0158] 1.2 结果和讨论

[0159] 1.2.1 聚合物微针的制造

[0160] 改变UV光参数的影响

[0161] 制造微针以查明诸如聚合时间、UV光强度以及离UV光源的距离之类的不同变量

对于微针长度和尖端直径的影响。所有制造的微针具有 $300 \mu\text{m}$ 的基部直径以及 $1500 \mu\text{m}$ 的中心 - 中心间距。基部载玻片与涂敷 TMSPMA 的盖玻片（微针背衬层附接到它）之间的垫片厚度保持在 $1330 \mu\text{m}$ 不变。所有微针被查看，并且通过使用尼康 SMZ 1500 立体显微镜测量维度。

[0162] 改变聚合时间的影响

[0163] 在范围从 0.5 秒至 4 秒的不同聚合时间下，保持 UV 光强度 (11.0W/cm^2) 以及离 UV 光源的距离 (3.5cm) 不变，制造微针。均匀的微针阵列不能在低于 1 秒的时间下形成。在超过 1 秒的聚合时间下，微针开始形成，平均长度为 $1218 \pm 18 \mu\text{m}$ ，直到 2 秒的曝光时间 ($p > 0.05$)。除此之外，微针长度增加到平均 $1268 \pm 16 \mu\text{m}$ ，直到 4 秒的最大曝光时间（图 5(A)）。类似地，对于高达 2 秒的时间，尖端直径平均为 $131 \pm 18 \mu\text{m}$ ，其随着曝光时间在 2.5 秒与 4 秒之间的增加而增加到 $163 \pm 17 \mu\text{m}$ （图 5(B)）。更高的聚合时间可能导致更高的微针强度，这可能对于微针刺入皮肤中是重要的。

[0164] UV 光强度的影响

[0165] 强度在 $1.15\text{--}11.0\text{W/cm}^2$ 之间变化，维持聚合时间 (3.5 秒) 以及离 UV 光源的距离 (3.5cm) 不变。均匀的微针阵列不能在 2.21W/cm^2 的强度以下形成。微针长度平均为 $1250 \pm 4 \mu\text{m}$ 并且改变强度对于微针长度具有不显著的影响 ($p > 0.05$)（图 5(C)）。据发现，微针尖端的平均尖端直径为 $154 \pm 8 \mu\text{m}$ ($p > 0.05$)（图 5(D)）。 11.0W/cm^2 下制造的微针被观察到足够强以用于后续的刺入实验。

[0166] 改变离 UV 光源的距离的影响

[0167] 针对其对于微针长度和尖端直径的影响，测试 UV 光强度随着离光源的距离的增加而变化。为此目的，制造载物台 (stage) 置于离光源的范围为 3.5–9.5cm 的距离处。保持聚合时间 (3.5 秒) 和紫外光强度 (11.0W/cm^2) 的其他变量不变，在该范围内的若干距离处制造微针。据观察，随着距离的增加，微针长度从 $1256 \pm 21 \mu\text{m}$ 减小至 $1190 \pm 70 \mu\text{m}$ 。然而，在距离 3.5cm–6.5cm 与 3.5cm–9.5cm 之间，发现差异在统计学上不显著（图 5(E)）。将制造载物台的距离增加到超过 9.5cm 导致具有可变长度的非均匀微针阵列的形成。随着距离从 3.5cm 增加到 9.5cm，尖端直径平均为 $156 \pm 10 \mu\text{m}$ （图 5(F)）。

[0168] 1.2.2 非 UV 光参数的影响

[0169] 垫片距离的影响

[0170] 为了将药物对准皮肤的特定区域，应当适当地控制微针长度。本发明人通过增加堆叠在基部载玻片上的盖玻片的数量而操纵垫片厚度（图 1(C)）。基部载玻片与涂敷 TMSPMA 的盖玻片（其具有在其上制造的 PEGDA 背衬）之间的空间的这种连续增大增加了微针长度（图 6(A)–6(F)）。在每个步骤，将一个盖玻片添加到叠层，并且从而增加垫片厚度近似 $190 \mu\text{m}$ 。垫片厚度可以在 $380\text{--}1330 \mu\text{m}$ 之间变化。UV 参数在 UV 强度 (11.0W/cm^2)、聚合时间 (3.5 秒) 以及离 UV 源的距离 (3.5cm) 处保持不变。按照这种方式，微针长度可以在 $299 \pm 8 \mu\text{m}$ 至 $1387 \pm 35 \mu\text{m}$ 之间变化 (ANOVA, $p < 0.001$)，每一个由 $190 \mu\text{m}$ 的平均盖玻片厚度证实（图 6(G)）。垫片厚度的增加也导致微针尖端直径的相应减小。尖端直径范围从 $174 \pm 22 \mu\text{m}$ 至 $260 \pm 13 \mu\text{m}$ （图 6(H)）。

[0171] 微针插入猪皮肤中

[0172] 将长度测量为 $921 \pm 31 \mu\text{m}$ 的微针插入死猪皮肤中。微针阵列刺入皮肤中使用台

盼蓝着色法演示。图 7(A) 示出了着色之后微针阵列刺入的图像。蓝色斑特别地在微针插入点处着色。图 7(B) 中显示了利用作为正控制的皮下注射针的刺入以及利用台盼蓝的着色以查明染料的着色特异性和能力。作为负控制, 将染料应用到完整皮肤上。在清洗之后, 移除着色剂, 证明蓝色染料仅仅对角质层穿孔的位点着色 (图 7(C))。微针在从皮肤移除时未变形, 表明它们足够健壮以刺入皮肤。图 7(D) 示出了将微针插入并且随后移除之后制备的组织切片。着色以可视化皮肤层的苏木精和曙红显示出通过微针刺入留下的明显的凹陷。微针几乎完全刺入皮肤中表明封装的药物可以高效地输送。

[0173] 封装的典型药物的封装和体外释放

[0174] 图 3(A) 示出了其中没有结合典型药物的由 PEGDA 制造的微针。如从图 3(B) 观察到的, 微针轴包含红色的罗丹明 B, 而从背衬层没有观察到荧光。相反地, 在图 3(C) 中, 微针轴不包含任何罗丹明 B 染料, 并且荧光仅在特别地包含染料的背衬层中观察到。药物也可以结合到微针以及背衬二者中, 这二者也在该研究期间制造 (图 3(D))。

[0175] 跨 1 周的时段研究封装的罗丹明 B 的释放。据观察, 如图 8(A) 中所示, 将近 30% 的封装的药物在第一小时内释放。药物释放继续, 因为装载在背衬层中的药物潜在地用作储存器。释放的百分比数量与微针和背衬层中的药物浓度无关。图 8(B) 中示出了释放的实际数量。

[0176] 体外渗透通过老鼠皮肤

[0177] 评估微针增大罗丹明 B 的皮肤渗透率的能力。与罗丹明 B 的丙二醇溶液相比, 微针增大渗透的总量 3.89 倍 (图 9)。稳态流量对于微针为 $0.299 \pm 0.1 \mu\text{g/cm}^2/\text{hr}$, 对于丙二醇溶液为 $0.067 \pm 0.01 \mu\text{g/cm}^2/\text{hr}$, 低 4.35 倍 ($p < 0.05$)。

[0178] 依照本公开的各个不同的实施例可以提供一种统一或者单步的曝光工艺, 例如一步光刻工艺, 以便制造微针。该技术中的主要装备是 UV 固化站⁴⁴。制造工艺涉及使用光引发剂 HMP 的自由基聚合, 所述光引发剂在存在 UV 的情况下启动聚合反应。此外, 依照本公开实施例的制造机构没有真空或者加热布置的特定要求。使用强度 11W/cm^2 、范围为 1-4 秒的聚合时间 (例如使用 4 秒曝光时间输送 44 焦耳的能量) 并不显著地损害所考虑的生物物质的稳定性和 / 或结构和功能可行性 (viability)。通常, 这样的聚合时间 / 强度 / 能量条件预期充分地保持或者维持生物物质的稳定性和 / 或结构和功能可行性。

[0179] 从 PEGDA 制造微针开始于优化制造条件的过程。本发明人在开发本方法以便使用紫外光决定的光聚合制造微针时, 研究了若干变量。聚合时间 (聚合物暴露于紫外光的时间)、紫外光的强度以及制造组件离紫外光源的距离被认为是影响微针制造的因素, 并且就其对于微针几何结构的影响进行了评价。

[0180] 限定为聚合时间的暴露于 UV 光的时间关于微针几何属性以及封装的药物稳定性是重要的。众所周知紫外光造成主要的光氧化, 这是药物降解的主要贡献者。发明人的实验的主旨之一是研究几何属性并且开发一种以最短可能的聚合时间制造微针的方法。迄今使用的光聚合方法涉及 30 分钟范围内的 UV 长曝光时间。利用该新方法, 在 1-4 秒的低聚合时间下获得微针结构。尽管微结构也可以在更低聚合时间下形成, 但是随着时间的增加, 微针强度增大。3.5 秒的聚合时间用于当前研究中制造的微针, 因为它导致允许刺入皮肤中的健壮的微针阵列。另一方面, 光聚合反应也可以受使用的光源的强度影响。发明人旨在找到用于制造健壮微针的聚合时间和 UV 强度的正确组合。据发现, 3.5 秒的聚合时间以及

11.0W/cm² 的强度的组合适合于发明人的方法。

[0181] 微针刺入死猪皮肤中揭示了微针以小的拇指力刺入皮肤。台盼蓝是一种疏水性染料并且已知特别地对角质层穿孔的位点着色,这通过皮肤的组织切片证实。微针预期在皮肤结构中产生暂时的孔隙,并且通过这些孔隙释放药物。这些孔隙先前证明在微针移除时在 72 小时内闭合,并且与皮下注射针相比,微针应用与低的微生物感染风险关联。

[0182] 与其中药物只能涂敷在预制的微针上的硅或金属对等物相比,聚合物微针提供了将药物结合到聚合物基质中的优点。将药物结合到由 PEGDA 制造的微针中证明了 PEGDA 微针的封装效率。将药物结合到微针轴中以便推注 (bolus) 释放或者结合到背衬层中以便持续释放或者结合到这两层中以用于延长的效果。周围的皮下组织中来自微针的药物释放之后跟随背衬层中封装的药物的释放,其通过微针产生的暂时的孔隙继续释放药物。由于与微针相比,有可能将更大量的药物结合到背衬层中,因而有用的是将药物结合到微针和背衬层二者中以便增大药物装载。封装的药物在第一小时前期突发释放,其后是跨研究的一周的时段缓慢释放。这可以归因于背衬层的储存器容量,其可以通过插入到皮肤中的微针释放药物。在实施例中,药物释放属性可以通过利用诸如壳聚糖之类的释放修改聚合物涂敷微针或者结合变化量的所述释放修改聚合物以便控制药物从 PEGDA 基质的释放而进行修改。其他的光可交联聚合物也可以用来改变药物的释放曲线。

[0183] 当刺入老鼠皮肤模型时,装载药物的微针产生暂时的孔隙,这与包括包含一个微针阵列中的相同药物量的丙二醇溶液的控制相比,导致更高的流量。与罗丹明 B 通过角质层中的毛细管细胞间通路被动扩散相比,微针增大流量超过四倍,所述被动扩散是针对丙二醇溶液而言药物跨皮肤运输的主要模式。

[0184] 实验 2 :用于制造包含代表性蛋白质 (例如 BSA) 的生物相容聚合物微针的代表性工艺

[0185] 在该实验中,将微针制造成包含典型蛋白质牛血清白蛋白 (BSA)。报道了一种将药物封装在微针的聚合物核心中的方法,其确保了药物在整个微针贴片上均匀分布。为了测试制造和体外释放时封装的蛋白质的稳定性,使用一批分析技术分析了 BSA 的主要、次要和第三位的结构特征。

[0186] 2.1 实验过程 :

[0187] 材料

[0188] 从西格玛奥瑞奇公司 (密苏里州圣路易斯) 购买聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 (M_n 258)、2-羟基-2-甲基苯丙酮和牛血清白蛋白。从安倍医疗公司 (美国俄亥俄州) 购买 (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物) 和二甲基亚砜。从分子探针、英杰公司 (美国奥兰多) 购买牛血清白蛋白得克萨斯红轭合物。所有其他化学品都是分析纯并且像接收的那样使用。

[0189] 聚合物微针的制造和表征

[0190] 微针通过新颖的基于软光刻的工艺制造。简单地说,此后称为“预聚物”溶液的包含 0.5% v/v 的 2-羟基-2-甲基苯丙酮的聚 (乙二醇二丙烯酸酯) 暴露于高强度 (20.9W/cm²) 紫外 (UV) 光源 (加拿大魁北克的 EXFO® Omnicure) 以便形成背衬层。在类似步骤中,预聚物溶液被吸取到该背衬层上并且通过特别图案化的光掩模暴露于 UV。由于预聚物溶液优选地暴露于光掩模的透明区中,这样形成的微结构代表了定义为“微针”的微米尺寸

的杆。过量的未聚合的预聚物溶液使用净化水洗掉，并且让微针在空气中干燥。微针的几何特性（长度、基部和尖端直径）使用 SMZ-1500 立体显微镜（日本东京尼康公司）进行研究。

[0191] 微针中的均匀药物分布

[0192] 以在预聚物溶液中的 0.045% w/w 的浓度将牛血清白蛋白得克萨斯红轭合物结合到微针背衬层和轴中以便查明聚合的微针中的药物的均匀分布。然后，使用尼康 A-1R 共焦显微镜对制造的微结构成像以便观察背衬层的不同区域以及微针轴的不同长度下的荧光强度。荧光强度使用尼康 NIS 元件 BR3.1 分析软件计算。也利用 SMZ-1500 立体显微镜对微针阵列成像。

[0193] 微针中的 BSA 的稳定性测试

[0194] 主要结构稳定性

[0195] 使用 Laemmli 方法执行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 以便评估 UV 启动的光聚合对于牛血清白蛋白的构象稳定性的影响。它通过浇注 10% 电泳胶和 5% 浓缩胶进行。将通过 BCA 蛋白质测定 (Pierce®, IL, 美国) 所确定的包含 10 μg 的蛋白质样本的每个配方与等量的 Laemmli 样本缓冲液和 5% 的 β - 疏基乙醇混合。在 100°C 下将溶液加热 2 分钟，其后将它们装载到堆叠到浇注在电泳单元格中的凝胶上的梳状物上。凝胶在 100 伏特下运行 2.5 小时。在从电泳单元格中移除之后，在定轨振荡器上利用考马斯亮蓝 R-250 着色溶液对凝胶着色 2 小时。过量的着色剂通过脱色溶液 (20% 甲醇 : 10% 冰醋酸 : 70% 水) 移除，并且使用三星数字照相机对凝胶成像。

[0196] 次要结构稳定性

[0197] 对样本执行圆二色性 (CD) 光谱法以便评价制造的微针中的牛血清白蛋白的次要结构特性。该分析在 Jasco J-810 分光偏振计 (日本东京 Jasco) 利用 1m 光路石英电池 (德国米尔海姆 Hellma) 执行。数据在 0.1nm 的带宽下采集，扫描速度为 50nm/min 并且响应时间为 8 秒。跨 260nm-200nm 的波长范围扫描样本和标准 BSA。首先使用微型离心浓缩器 (30kDa 截止) (Vivaspin 20, GE, UK) 对微针释放样本过滤，以便将蛋白质与聚合物分离。来自三次测量的平均值用来绘出摩尔椭圆率 - 波长曲线。摩尔椭圆率使用以下等式计算：

[0198]

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot M_p}{10,000 \cdot n \cdot C \cdot l} \quad (1)$$

[0199] 其中 M_p 为 BSA 的分子重量 (66000Da)，n 为 BSA 上的氨基酸残基的数量 (583)，C 为 BSA 溶液的浓度 (0.000026g/ml)，并且 l 为电池的路径长度 (0.1cm)。 α 螺旋的百分比根据以下等式计算

[0200]

$$\alpha\text{-helix}(\%) = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33,000 - 4000} \times 100 \quad (2)$$

[0201] 三级结构稳定性

[0202] 为了评价蛋白质构象中的三级结构的变化，针对蛋白质样本分析荧光光谱。制备净化水中浓度为 0.026mg/ml 的标准 BSA 溶液以便将光谱数据与从微针样本释放的 BSA 进行比较。使用日立 F-7000 荧光分光光度计研究 280nm 的固定激发波长下 300-400nm 范围

内的发射光谱。相对波长绘出荧光强度，作为三次测量的平均值。

[0203] 从微针体外释放 BSA

[0204] 在三个不同的浓度下（预聚物溶液中的 0.5、0.8 和 1.3% w/w BSA）将 BSA 封装在微针中以便获得包含 0.4–1.6mg 的蛋白质的微针阵列。体外释放通过在 37°C 下将微针阵列悬浮在 15ml 的 1x 磷酸盐缓冲液中而确定。释放介质周期性地完全撤回并且利用 15ml 的新鲜介质代替以便维持水槽条件。收集的样本保持在 4°C，直到分析。释放样本中的蛋白质浓度通过 BCA 蛋白质测定工具包（美国伊利诺伊州皮尔斯）进行分析。每个浓度分析三次，并且均值用于分析。相对时间绘出释放的 BSA 的以 mg 为单位的累积量和百分比。

[0205] BSA 体外渗透通过老鼠皮肤

[0206] 体外渗透研究在水套水平扩散池（TK-6H1，中国上海佳凯科技有限责任公司）中执行。老鼠皮肤在受体溶液（具有 0.005% v/v 叠氮化钠的 1x 磷酸盐缓冲盐水）中通宵与水化合。将皮肤拉伸地置于十层 Kimwipe（金佰利，罗斯威尔，GA）上以便提供组织状机械支撑。在移除皮下脂肪之后，将包含 0.7%、1.42% 和 1.85% w/w BSA 的微针应用到老鼠腹部皮肤。不包含 BSA 的微针用来除去从皮肤释放的固有蛋白质。溶解在丙二醇中的 BSA 用来比较通过微针的 BSA 渗透相对于被动扩散的增强。微针阵列使用思高牌胶带固定在皮肤上，并且皮肤置于供体室和受体室之间。受体室填充有 4.5mL 的受体溶液，使用涂敷特氟龙的磁力搅拌器在 250rpm 下连续搅拌该溶液。在每个采样点处，撤回 1mL 的受体溶液并且利用新鲜受体溶液代替。在 4°C 下储存收集的样本，直到对它们进行分析。所有样本都在 10000rpm 下受离心作用 5 分钟，并且收集上清液以用于分析。渗透的 BSA 的浓度通过紫外 $A_{215}-A_{225}$ 方法确定。每个样本分析三次。相对时间绘出每单位面积渗透的药物的累积量。

[0207] 聚合物微针的体外细胞毒性

[0208] 聚（乙二醇二丙烯酸酯）的细胞毒性通过使用常规的 MTT（3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物）测定对线粒体琥珀酸脱氢酶活性进行比色法确定而由三种不同的细胞系的存活率评估。人类真皮成纤维细胞（HDF）、成人低钙高温（HaCaT）角质细胞和人类胚肾（HEK 293）细胞用来评估制造微针中使用的聚合物的毒性。细胞在通过 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素溶液补充的 Dulbecco 改性鹰介质中生长。在细胞实现 80–90% 的融合之后，对它们进行胰蛋白酶作用和计数。将所有三种细胞（ 1×10^4 细胞 / 容器）涂布到 200 μL 的生长介质中的 96 容器微量滴定板（美国纽约康宁公司）中。在 24 小时涂布之后，将聚合物提取物（通过在 37°C 下从制造的微针中提取 1xPBS 中的聚合物 24 小时而制备）添加到每个容器。正控制由包含 20 μL 1xPBS 的容器组成。在 37°C 下潮湿的 5% CO₂ 中对板温育 24、48 和 72 小时。在各分析点处抽吸介质，并且将 20 μL 的 MTT 溶液（PBS 中 5mg/ml）添加到每个容器，接着是 200 μL 的生长介质。在 37°C 下对板温育 4 小时。在 4 小时之后，再次抽吸介质，并且将 150 μL 添加到每个容器以便溶解形成的甲瓒晶体，所述晶体借助于以 100rpm 操作的板振荡器溶解。比色法测定通过使用帝肯 2000 酶标仪（德国帝肯公司）测量 595nm 处的吸收率而执行。将细胞存活率计算为控制的百分比。

[0209] 聚合物的毒性也通过分析从损坏的细胞膜释放的乳酸脱氢酶的量进行评估。细胞以上面描述的类似方式涂布，并且利用聚合物提取物和磷酸盐缓冲盐水进行处理。最大的乳酸脱氢酶释放通过利用制造商提供的裂解液（9% w/v Triton X-100）处理细胞而实现。测定依照制造商的协议执行。百分比毒性使用以下等式计算，其中 Polymer_{LDH}、Vehicle_{LDH} 和

Triton_{LDH} 表示从利用聚合物、磷酸盐缓冲盐水和 Triton X-100 处理的容器中获得的对应荧光值。

$$[0210] \quad \text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Polymer}_{\text{LDH}} - \text{Vehicle}_{\text{LDH}}}{\text{Triton}_{\text{LDH}} - \text{Vehicle}_{\text{LDH}}} \times 100$$

[0211] 统计数据

[0212] 使用微软 Excel 2007 绘出曲线图。所有实验至少执行三次，并且将数据报告为均值 ± 标准偏差。统计数据分析使用 PASW 18 统计软件 (SPSS 公司)。各组之间的比较通过计算方差分析 (ANOVA) 做出。差异被认为对于 p<0.05 在统计上是显著的。

[0213] 2.2 结果和讨论：

[0214] 微针的制造和表征

[0215] 使用立体显微镜对微针成像并且发现其具有 820 μm 的平均长度、基本直径 300 μm、针间的中心 – 中心间距 1500 μm 以及平均尖端直径 140 μm。微针贴片由跨 1.44cm² 的区域散布的 8x8 针阵列组成，这对于微针的自我施用是小的，相对于常规的基于注射的输送方法具有独特优势，从而提供更高的患者顺应性。

[0216] 微针中的结合和均匀药物分布

[0217] 与将药物分子涂敷在制造的微针上相对，药物在微针形成之前结合到聚合物基质中允许更高的药物装载。在本研究中，本发明人可以实现每微针阵列高达 1.6mg 的 BSA。本发明人的工艺克服了使用先前的方法形成微针所需的、可能影响蛋白质稳定性的长紫外曝光和大量的预加工。而且，本发明人的工艺并不涉及任何基于模具或者基于模板的加工，潜在地避免了模具或模板材料与易碎蛋白质分子之间的相互作用。

[0218] 任何药物输送系统的一个重要方面是药物在整个系统的均匀分布，以便确保恒定的剂量被封装并且随后输送。由于依照本公开实施例制造的聚合物微针可以是用于经皮蛋白质输送的高效载体，本发明人封装牛血清白蛋白得克萨斯红轭合物 (TR-BSA) 以便可视化微针背衬和轴中的蛋白质的分布。TR-BSA 分别在 596nm 和 615nm 处表现出峰值激发 (λ_{ex}) 和发射 (λ_{em})，这可以使用荧光显微法进行量化。本发明人采用共焦成像作为工具对微针样本成像以便评估微结构的不同区域和深度处的荧光分布。如从图 10(A) 和图 10(D) 所观察的，荧光跨背衬层的不同区域以均匀的模式分布 (p>0.05)。然而，随着微针长度从阵列的底部 (长度 = 10 μm) 增加到微针尖端 (长度 = 700 μm)，观察到荧光从 377 减小到 3.1 (图 10(B) 和图 10(E))。这可以归因于固有的微针几何结构，因为由于更少的药物封装在微针的尖端区中，微针轴在基部比在尖端更宽。阵列中的不同微针之间的药物分布是恒定的，大多数微针表现出均匀的荧光 (图 10(F))。这预期确保了跨 1.44cm² 的贴片区域的均匀药物输送。图 10(C) 示出了完整微针阵列的立体显微镜图像，揭示出药物在整个微针贴片上均匀分布。

[0219] 微针中的 BSA 的稳定性测试

[0220] 微针被认为是输送治疗多肽、蛋白质和疫苗的理想药物输送系统。由于蛋白质的生物功能取决于其构象，因而当务之急是设计一种不会不利地影响这些易碎分子的稳定性的剂型。在本发明人的制造工艺中，本发明人使用了一种基于紫外光的光交联方法以便创建聚合物微结构。先前报道过 UV 光造成蛋白质变性以及蛋白质的主要、次要和第三位结构的结构变化。本发明人在本研究中通过调研封装在微针中的牛血清白蛋白的十二烷基硫酸

钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、圆二色性光谱和荧光强度测量查明这三个结构特征。尽管这里的结果证明了 BSA 的构象在整个制造工艺以及后续的释放实验中被维持,但是其他蛋白质的结构和生物属性可能不同,并且取决于各蛋白质特性。

[0221] SDS-PAGE 是蛋白质分离和蛋白质分子重量确定中最常见的方法。它先前用来确定微球中的 BSA 的结构完整性。在本研究中,本发明人使用 SDS-PAGE 确定 BSA 的氨基酸序列,并且分析 UV 辐射对于蛋白质的任何有害影响(图 11)。将从配方释放的 BSA 与新制备的溶液和蛋白质标准标记物进行比较。出现在 66kDa 处的单带线表明蛋白质在制造工艺期间是稳定的,并且在剂型中保持稳定达 72 小时的时段。电泳分离期间没有观察到其他带,提供否定形成二聚体或多聚体的任何蛋白质聚集或者破碎成更小的子单位的证据,表明 BSA 的主要结构在制造工艺期间保持完整。

[0222] BSA 的次要结构通过称为圆二色性的常用技术评估。BSA 包含 67% 的 α 螺旋、10% 的匝并且没有 β 折叠。远 UV CD 光谱 (260–200nm) 用来表征 BSA 的结构稳定性。 α 融合结构由 208nm 和 22nm 处的两个负峰指示,最小峰在 208nm 处,这归因于 α 融合结构的 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。据观察,封装在微针中的 BSA 的次要结构类似于图 12(A) 中所示的新制备的 BSA 溶液。

[0223] 用作控制的降解的 BSA 表现出比标准 BSA 和微针释放样本低得多的椭圆率值。 α 融合的百分比使用等式 2 计算,并且被证实且与原生 BSA 结构中的报告的螺旋量(大约 67%)一致。从微针样本释放的 BSA 中的 α 融合的百分比比得上新制备的 BSA 溶液($p>0.05$) (图 12(B)),并且与热变性和酸变性的 BSA 样本 ($p<0.05$) 截然不同。这些结果证明了或者演示了在依赖于紫外 (UV) 的光聚合期间维持了 BSA 的次要结构完整性。

[0224] 一种表征、分析、估计或者确定微针制造之后(例如基于 UV 的光交联之后)保持稳定的蛋白质的相对量的方式是检验% α 融合数据。例如,在标准偏差极限内,对于在体外介质 (PBS) 中释放平均达 3 天的蛋白质而言,与新制备的 BSA 溶液相比,保持稳定的蛋白质的相对量为 $94.99 \pm 9.5\%$ 。

[0225] 由于蛋白质包含像酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸那样的内在发荧光的芳香族氨基酸,荧光光谱和强度可以用作蛋白质结构稳定性的标记物。色氨酸是显示最大的消光系数的最占优势的荧光团。因此,可以例如在一个或多个波长(例如 280nm 的固定激发波长)处测量蛋白质的发射光谱。水中色氨酸的发射最大值被观察为大约 350nm,并且取决于溶剂的极性。在 300–400nm 之间扫描 BSA 发射光谱,并且对于所有释放样本和标准 BSA 溶液在 338nm 处观察到发射最大值(图 13)。这与先前报道的结果一致并且证明了本发明人的制造工艺保持微针中的蛋白质稳定性的可行性。另一方面,使用热或酸变性的 BSA 样本没有表现出任何荧光(280nm 的激发波长和 300–400nm 的发射波长)。鉴于以上所述,一种附加的或者可替换的表征、分析、估计或者确定微针制造之后(例如基于 UV 的光交联之后)保持稳定的蛋白质的相对量的方式是监视、检验或者分析荧光光谱,例如关于荧光的强度及其考虑到参考荧光光谱集合的荧光光谱的最大值和 / 或变化或移动的波长。这样的检验可以与参考荧光光谱相比较,所述参考荧光光谱涉及新鲜蛋白质和 / 或经受一次或多次参考变性 UV 辐照曝光、一个或多个参考变性温度和 / 或一种或多种参考化学变性剂的蛋白质。

[0226] 典型蛋白质 BSA 的主要、次要和第三位结构稳定性的综合分析表明,微针可以用作用于蛋白质、蛋白质片段或者基于蛋白质 / 蛋白质片段的药物的载体。基于 UV 的光交联

不显著地改变 BSA 的结构属性,这可能地归因于高强度下的短时间曝光。

[0227] 从微针体外释放 BSA

[0228] 图 14(A) (百分比释放) 和图 14(B) (累积量) 中绘出了 BSA 的释放曲线。本发明人使用 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲盐水作为释放介质,因为它非常类似于细胞外液和血浆。据观察,封装在微针阵列中的大多数药物在 6 小时时段内释放。释放的量由封装在微针中的量证实,证明可以封装并且有效地释放到体外环境中的药物量的控制。大多数药物封装在微针背衬层 ($\sim 90\%$) 中,并且由于其微米级几何结构的原因而包含较少的药物。

[0229] 由于 BSA 是一种亲水性分子,因而它以快的速率从微针释放。如果在结合到微针中之前将药物封装在聚合物壳或者制造的结构 (例如微球) 中,则可以预期更加受控的释放曲线。

[0230] 微针产生的暂时孔隙和药物通过聚合物层扩散到表皮和真皮区以创建蛋白质药物储存库有牵连。药物可以随后被吸收到血流或者淋巴循环中。预期的是,释放的蛋白质将在亚表皮组织中累积并且从位于下方的高度血管化区快速吸收。

[0231] 通过老鼠皮肤的 BSA 体外渗透

[0232] 与 BSA 的被动扩散相比,微针增加了渗透的牛血清白蛋白 (BSA) 的量。由于 BSA 是大分子 (66kDa),它不可能通过皮肤被动扩散。图 15A-15B 示出了与实际中在 48 小时结束时表现出没有 BSA 的 BSA 丙二醇溶液相比,在应用微针时每单位区域渗透的累积量的增加。微针情况下渗透的量随着封装的 BSA 的量的增加而增加。渗透曲线类似于 PBS 缓冲液中观察到的体外释放曲线,初始突发释放之后是缓慢释放阶段。这样的渗透曲线对于诸如钙黄绿素之类的其他高度水溶性药物 ($\log p = -5.02$) 而言是常见的。然而,本发明人在其先前的研究中观察到,亲脂性药物 (例如罗丹明 B, $\log P = 2.43$) 没有表现出渗透的突发,并且其吸收一定程度上受其与角质层脂质的相互作用限制。 $A_{215}-A_{225}$ 方法先前用在体外渗透研究中确定 BSA 浓度。BSA 的浓度是 215nm 与 225nm 处的消光差异的线性函数。该方法对于低至 5ng/mL 的蛋白质浓度是灵敏的,在体外渗透研究中通常预期这些蛋白质浓度。蛋白质浓度使用以下等式计算:

$$\text{BSA 浓度 } (\mu \text{g/mL}) = 144x (A_{215} - A_{225}) \quad (3)$$

[0234] 不含 BSA 的微针用作最小化来自溶解的聚合物的任何吸收的控制。当封装较低量的 BSA 时,渗透曲线展示出接近 18 小时处的高台,因为大多数药物被释放了。当封装较高的量时,蛋白质在 2 天结束时继续释放,表明本研究中开发的微针阵列服从按照治疗方案的要求调节剂量。与微针相比,使用丙二醇溶液的 BSA 的被动扩散不导致任何显著量的药物渗透通过皮肤。

[0235] 其中可以确立稳态的常规皮肤渗透基于以下事实:供体浓度在整个扩散过程中是恒定的。这可以通过用于膜扩散的菲克第一定律证明。然而,在本研究中,供体浓度在渗透过程期间减小。而且,它不是一个纯粹的膜扩散过程,因为微通路被这些微针创建,使得这个过程成为通过皮肤膜扩散以及通过跨皮肤的微米尺寸通道的物质运输的组合。

[0236] 聚合物微针的体外细胞毒性

[0237] 两个细胞系,即人类真皮成纤维细胞 (HDF) 和成人低钙高温 (HaCaT) 角质细胞,代表真皮和表皮皮肤细胞并且因此用来评估聚合物微设备对于皮肤的毒性。这些细胞系先前用来研究经皮聚合物剂型的毒性。第三细胞系人类胚肾 (HEK293) 细胞被使用,因为它代表

健康人类细胞。HEK293 细胞在许多体外毒性研究中用作人类细胞的代表,因为它们提供了在细胞水平评价毒性的方便模型。先前在来自外用凝胶的经皮毒性中也报道过它们。使用三种不同的细胞,本发明人旨在评估本发明人的新颖聚合物微针的经皮和全身生物相容性。

[0238] 最常用的 MTT 测定用来评估聚(乙二醇)二丙烯酸酯对于这些细胞的毒性。具有活性线粒体琥珀酸-四氮唑还原酶系统的存活细胞将 MTT 还原为通过比色法确定进行定量的甲臜晶体。细胞存活率作为控制的%被计算为 $A_{\text{polymer}}/A_{\text{control}} \times 100$, 其中 A_{polymer} 和 A_{control} 分别为包含聚合物提取物和控制(PBS)的容器的吸收率测量。每个值是六个复制品的平均值。

[0239] 针对用于将细胞暴露于聚合物提取物高达 72 小时的 HDF 和 HaCaT 细胞, 报道了关于所述控制的高细胞存活率(图 16(A) 和图 16(B)), 细胞存活数在 24-72 小时存活率测定之间在统计上不显著($p>0.05$)。这确保了用于制造微针的聚合物对于经皮使用是安全的, 并且对于表皮和真皮细胞是无刺激的。这强调了生物相容聚合物用于局部应用的优点。HEK293 细胞存活率测定对于前 24 小时给出了相似的存活率, 其随后减小($p<0.05$)(图 16(C))。然而, 文献中已经报道了分子重量小于 20000Da 的 PEGDA 可以通过溶解在体液中由肾快速地清除。因此, 本发明人预期 PEGDA 由于其快速清除而引起最小的全身毒性。

[0240] 从损坏的细胞膜泄漏到上清液介质中的乳酸脱氢酶的荧光光度法确定已经被接受为一种确定化合物的细胞毒性的方法并且先前也用于聚合物。在本发明人的研究中, 对于利用聚合物提取物处理的细胞, 在所有三种细胞系中观察到低细胞毒性。如图 16D-16F 中所示, 对于从 24 小时至 72 小时处理的细胞的百分比细胞毒性没有显著地变化($P>0.05$), 支持来自 MTT 测定的结果并且进一步证明了聚乙二醇二丙烯酸酯的生物相容性。

[0241] 总的说来, 体外毒性结果表明了聚合物微针在经皮和全身上的无毒性行为, 并且因此依照本公开的微针设备实施例可以提供一种用于封装和输送生物物质的安全而高效的药物载体。

[0242] 在实施例中, 本公开的光刻技术可以用来封装生物活性物质(即药物、蛋白质和/或蛋白质药物)。药物分布可以跨微针阵列是均匀。而且, 制造本公开的微针设备的工艺可以维持生物活性物质稳定性, 并且因此可以保持封装的生物活性物质的生物活性。在实施例中, 封装的生物活性物质可以被释放并且与被动扩散相比以大得多的量渗透通过皮肤。本公开的聚合物微针的体外生物相容性已经由聚合物提取物对于不同细胞系的低毒性证明, 表明了这些微针的安全性。在实施例中, 本公开的微针可以用作输送生物活性物质的有用的生物活性物质输送系统。

[0243] 代表性微针集成厚贴片设备制造和测试实验

[0244] 本公开也涉及一种可以用于封装大量或者更大量的一种生物活性物质(即一种药物和/或蛋白质)或者多种生物活性物质(即多种药物和/或蛋白质)的微针集成厚贴片。本公开进一步涉及一种用于制造可以用于封装更大量的一种或多种生物活性物质的微针集成贴片的工艺。

[0245] 在实施例中, 本公开的微针集成厚贴片可以用于封装更大量的一种生物活性物质(即一种药物和/或蛋白质)或者多种生物活性物质(即多种药物和/或蛋白质)。在实施例中, 本公开的微针集成厚贴片可以用来增大微针的生物活性物质装载容量。封装更大

量的一种或多种生物活性物质和 / 或增大微针的生物活性物质装载容量对于治疗其中需要高剂量的一种或多种生物活性物质的诸如慢性疼痛和 / 或神经性疼痛之类的疾病是有意义的和有用的。在实施例中,本公开的微针集成厚贴片可以用来治疗其中需要高剂量的一种或多种生物活性物质的诸如慢性疼痛和 / 或神经性疼痛之类的疾病。

[0246] 实验 : 可以用于封装大量或者更大量的生物活性物质 (例如诸如罗丹明 B 之类的典型药物或者诸如利多卡因之类的药物) 的代表性生物相容聚合物微针集成厚贴片以及用于制造该贴片的代表性工艺

[0247] 在实验中,制造用于封装大量或者更大量的生物活性物质 (即诸如罗丹明 B 之类的典型药物或者诸如利多卡因之类的药物) 的微针集成厚贴片。罗丹明 B 用作证明微针集成贴片的药物封装以及微针集成厚贴片的不同层中的选择性药物封装的典型药物。微针的断裂力被确定。此外,调研了用于封装利多卡因和管理神经性疼痛的微针集成厚贴片的效能。所述制造方法基于光刻术,涉及通过图案化掩模将聚合物暴露于 UV 光。该技术提供了短时间暴露于 UV 光的优点。

[0248] 实验过程、结果和讨论 :

[0249] 材料

[0250] 从西格玛奥瑞奇公司 (密苏里州圣路易斯) 购买聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 [PEGDA (M_n 258)]、2-羟基-2-甲基苯丙酮 (HMP) 和 3-(三甲氧基甲硅烷基) 丙基甲基丙烯酸酯 (TMSPMA)。从阿法埃莎公司 (英国兰开斯特) 购买罗丹明 B。从西格玛奥瑞奇公司购买利多卡因。使用的所有材料都是试剂纯并且像接收的那样使用。

[0251] 玻璃盖玻片的涂敷

[0252] 通宵将玻璃盖玻片 (英国威尔士 Cell Path, 160–190 微米厚, 22x 22mm) 浸没到 TMSPMA 溶液中以用于涂敷。然后, 在 70°C 下烘烤盖玻片 2 小时; 图 1(B) 中描绘了得到的化学相互作用。

[0253] 微针背衬层的制造

[0254] 如图 1(B) 和图 17(A) 所示,两个未涂敷的盖玻片在载玻片 (中国赛欧品牌) 任一侧受支撑,以便创建具有近似 175 μm 深或厚的空间的腔体或腔室。然后,将涂敷 TMSPMA 的盖玻片置于该机构上 / 上方。包含 0.5% 的 HMP 的 PEGDA (称为预聚物溶液) 通过毛细作用被吸到盖玻片与载玻片之间的间隙中 (即到腔室的内部)。该机构使用 EXFO OmniCure® S200-XL UV 固化站 (UV 滤光器 320–500nm) (加拿大光子解决方案公司的 EXFO) 利用 12.4W/ cm^2 的高强度紫外光照射 1 秒钟。UV 光的强度利用 OmniCure® R2000 辐射计 (加拿大光子解决方案公司的 EXFO) 测量。准直适配器 (EXFO810-00042) 与 UV 光探针一起使用。键合到玻璃盖玻片的 TMSPMA 分子经由自由基聚合共价链接到 PEGDA 甲基丙烯酸酯组 (图 1(B), 虚线椭圆内)。近似 175 μm 厚的背衬层容易从该机构中移除。在实施例中,背衬层可以具有 $212 \pm 22 \mu\text{m}$ 的厚度或高度。在实施例中,背衬层可以具有 $175 \mu\text{m}$ 至 $350 \mu\text{m}$ 之间的厚度或高度。

[0255] 高度为 $212 \pm 22 \mu\text{m}$,而厚贴片高度为 $1054 \pm 34 \mu\text{m}$ 。

[0256] 薄背衬可以范围介于 175 – $350 \mu\text{m}$ 之间。

[0257] 微针的制造

[0258] 在若干实施例中,除了垫片的数量之外,用于制造微针的机构与用于微针背衬的

机构类似或相似。垫片数量将决定制造的微针的长度。如图 1(C) 和图 17(B) 所示, 增加垫片厚度通过增加堆叠在基部载玻片的任一侧的盖玻片数量而实现。于是, 前驱溶液在制造背衬层期间通过毛细作用类似地被吸到该间隙中。塑料膜特别地以微针阵列设计的图案涂上墨。膜的背景被涂上墨, 在阵列图案中留下透明的小圆圈以允许 UV 光穿过 (新加坡无限图形私人有限公司)。该图案化的膜 (也称为光掩模, 图 2) 被设计成在阵列图案中具有不同直径的透明圆圈, 其决定微针的基部直径。类似地, 可以控制两个微针之间的中心 - 中心间距。这样的膜置于制造机构上, 其随后利用高强度 UV 光照射。光掩模的使用阻挡 UV 访问涂墨区并且允许 UV 光穿过透明圆圈, 这导致微针结构的形成, 从而形成微针, 这些微针与背衬层中的 PEGDA 大分子单体共价键合以便形成互穿聚合物网络 (IPN) (参见图 1(C), 虚线矩形内)。从基部载玻片小心地移除附接到盖玻片 / 背衬层的微针结构, 并且利用去离子水清洗以便移除非交联的前驱溶液。然后, 使用尼康 SMZ1500 立体显微镜对制备的微针成像 (图 18(A))。制造的微针具有大约 $889 \pm 48 \mu\text{m}$ 的平均长度、大约 $334 \pm 43 \mu\text{m}$ 的基部直径以及大约 $1474 \pm 39 \mu\text{m}$ 的中心 - 中心长度。

[0259] 厚背衬层贴片的制造

[0260] 如图 16C 中所示, 厚背衬层被单独地制造。两个未涂敷的载玻片在如图所示的载玻片 (中国赛欧品牌) 任一侧受支撑, 以便创建具有近似 $1100 \mu\text{m}$ 深或厚的空间的腔体或腔室。然后, 将盖玻片置于该机构上 / 上方。包含 0.5% 的 HMP 的 PEGDA (称为预聚物溶液) 通过毛细作用被吸到盖玻片与载玻片之间的间隙中 (即到腔室的内部)。该机构使用 EXFO **OmniCure® S200-XL** UV 固化站 (UV 滤光器 320–500nm) (加拿大光子解决方案公司的 EXFO) 利用 5.8mW/cm^2 的低强度紫外光照射 15 秒钟。UV 光的强度利用 **OmniCure® R2000** 辐射计 (加拿大光子解决方案公司的 EXFO) 测量。准直适配器 (EXF0810-00042) 与 UV 光探针一起使用。玻璃盖玻片经由自由基聚合共价链接到 PEGDA 甲基丙烯酸酯组。 $1054 \pm 34 \mu\text{m}$ 厚的厚背衬层贴片容易从该机构中移除。厚背衬层贴片的制造通过暴露于 5.8mW/cm^2 的低强度紫外光 15 秒钟而实现。在实施例中, 厚背衬层贴片可以通过暴露于 5.8mW/cm^2 、小于 5.8mW/cm^2 或者大于 5.8mW/cm^2 的低强度紫外光而制造。在实施例中, 厚背衬层贴片可以通过暴露于低强度紫外光 15 秒钟、小于 15 秒钟或者大于 15 秒钟而制造。在实施例中, 厚背衬层贴片可以具有 $1000\text{--}3000 \mu\text{m}$ 之间的厚度或高度。

[0261] 微针集成厚贴片的制造

[0262] 参照图 16D, 厚背衬层贴片然后通过将预聚物溶液液滴浇注在背衬层表面与厚背衬层贴片表面之间并且将背衬层和厚背衬层贴片二者暴露于 12.9W/cm^2 的高强度紫外光 3 秒钟而与制造的微针集成在一起。厚背衬层贴片经由预聚物溶液化学耦合到背衬层。如上面所提到的, 制造的微针具有大约 $889 \pm 48 \mu\text{m}$ 的平均长度、大约 $334 \pm 43 \mu\text{m}$ 的基部直径以及大约 $1474 \pm 39 \mu\text{m}$ 的中心 - 中心长度。在实施例中, 背衬层和厚背衬层贴片中的每一个可以由不同的生物相容聚合物制成。

[0263] 典型药物的封装以及典型药物的选择性封装

[0264] 作为典型药物, 罗丹明 B 用来证明药物封装以及微针集成厚贴片的不同层中的选择性药物封装。罗丹明 B 以 0.075 weight% (重量百分比) 的浓度溶解在预聚物溶液中。罗丹明 B 选择性结合到背衬层、微针轴和 / 或厚背衬层贴片中通过使用包含典型药物的预聚物溶液分别制造背衬层、微针和 / 或厚背衬层贴片而成为可能。参照图 18B, 使用荧光立

体显微镜（日本尼康公司）对装载药物的微针集成厚贴片样本成像。

[0265] 封装在微针中的药物的量根据预聚物溶液中的药物的百分比重量和制造的微针的重量计算。封装在背衬层中的药物的量根据预聚物溶液中的药物的百分比重量和背衬层的重量计算。同样地，封装在厚背衬层贴片中的药物的量根据预聚物溶液中的药物的百分比重量和厚背衬层贴片的重量计算。在实施例中，可以将大量的一种生物活性物质（即一种药物和 / 或蛋白质）或者多种生物活性物质（即多种药物和 / 或蛋白质）封装在本公开的微针集成厚贴片中。在实施例中，可以将一种或多种生物活性物质封装在本公开的微针集成厚贴片的厚背衬层贴片和 / 或背衬层、微针轴中。由于与背衬层和微针相比，有可能将更大量的一种或多种生物活性物质结合到厚背衬层贴片中，因而可能有用的是将所述一种或多种生物活性物质结合到厚背衬层贴片、微针轴和背衬层中以便增大生物活性物质装载。在实施例中，本公开的微针集成厚贴片可以以高达 21weight% 的量封装利多卡因。在实施例中，本公开的微针集成厚贴片可以以 21weight% 或者更多的量封装利多卡因。

[0266] 断裂力测试和微针刺入老鼠皮肤中

[0267] 为了确定集成贴片上的微针的机械强度，使用测试台（狄龙 CT 人工测试台）上保持的电子测力计（美国狄龙型号 GL）。微针的断裂力首先通过将微针置于扁平铝块上并且在柱塞接触贴片时以逆时针方式缓慢地旋转测试台的手轮而确定。当微针折断时，存在施加的力的量的突然减小，并且该点将是微针的断裂力。

[0268] 在铝块上折断代表性微针集成厚贴片的微针所需的平均力为 $91.28 \pm 9.21\text{N}$ ，而拇指将微针按压到对象的皮肤之上和之中的平均力为 $10.72 \pm 0.92\text{N}$ 。拇指将微针按压到皮肤之上和之中的平均力使用五个个人对象池确定。拇指将微针按压到皮肤之上和之中的平均力显著低于微针断裂力（即断裂微针所需的力），表明如果利用拇指力将微针按压到对象的皮肤之上和之中，则微针不会折断。在实施例中，本公开的微针集成厚贴片的微针的断裂力为大约 91N 或更多，或者大约 100N 或更多。在实施例中，拇指将本公开的微针集成厚贴片的微针按压到人类患者或对象的皮肤之上和之中所需的力为大约 12N 或更少，大约 11.64N 或更少，大约 10N 或更少，大约 9.8N 或更少，或者大约 9N 或更少。

[0269] 依照本公开的实施例，针对其上施加了不同力的微针集成厚贴片设备的微针阵列确定微针的长度和折断的微针的百分比。随着力的增加，微针的长度保持相似（图 18G）。10N 的力施加于其上的微针的平均长度为 $865 \pm 22\mu\text{m}$ ，而 70N 的力施加于其上的微针的平均长度为 $848 \pm 23\mu\text{m}$ 。因此，当不同的力应用到微针阵列上时，没有观察到微针长度的显著减小 ($p > 0.05$)，并且甚至在单次施用到皮肤模型上之后，微针阵列看起来也是尖锐的（图 18C-F）。对于 10–30N 的力施加于其上的所有微针样本阵列，没有观察到折断的微针。对于 50N 的力施加于其上的微针阵列样本，观察到两 (2) 根折断的微针。对于 70N 的力施加于其上的微针阵列样本，观察到四 (4) 根折断的微针。

[0270] 改变施加的力的量对于微针集成厚贴片设备的微针的影响也被调研。将包括去脂肪的老鼠皮肤的皮肤模型置于 10 层 Kimwipes® 上以便提供组织状机械支撑。将变化的力 (10N, 30N, 50N, 70N) 施加到置于老鼠皮肤上的微针上 1 分钟，并且对微针成像以确定长度的百分比减小量以及折断的微针的数量（图 19A–19E）。针刺入老鼠皮肤中的程度也通过台盼蓝着色方法确定。利用滴管将台盼蓝置于微针处置的皮肤上 5 分钟，并且使用 Kimwipes 和 70% 的乙醇将其轻轻移除。然后，在手持式显微镜（中国的 Eikona 图像软件）下观看皮

肤样本。为了与微针刺入皮肤所需的拇指的力进行比较,要求 5 位个人对象使用其惯用手的拇指在测力计的柱塞上施加力。

[0271] 在将本公开的微针集成厚贴片设备的微针应用到皮肤模型上以便确定微针的机械强度之后,在皮肤模型上进行台盼蓝着色测试以便确定皮肤刺入的程度。制造的微针设计利用低至 10N 的力刺穿角质层(图 19A 和图 19E)。64 个微针中的大约 50 个(78%)可以在 10N 下刺入皮肤中,并且当 70N 的力施加到微针阵列时,平均 64 个微针中的 61 个(95%)可以刺入皮肤中。即使施加到微针上的力的量逐渐增加,微针的刺入也与超过 75% 的微针刺入皮肤中相当一致。

[0272] 利多卡因的封装以及慢性疼痛和 / 或神经性疼痛的管理

[0273] 本公开的用于封装大量生物活性物质(在这种情况下为药物利多卡因)的代表性微针集成厚贴片的用于管理慢性疼痛和 / 或神经性疼痛的能力被调研。当前可用的经皮贴片表现出药物的缓慢释放以及药物的较低渗透速率,导致管理慢性疼痛和神经性疼痛中次优的益处。在实施例中,由于通过使用本公开的微针设备而提供的一种或多种药物的渗透增加的原因,包括微针集成厚贴片设备的本公开的微针设备可以用来更快地缓解患有慢性疼痛和 / 或神经性疼痛的对象的痛苦。

[0274] 为了确保利多卡因可以扩散出本公开的微针集成厚贴片,进行体外释放测试。首先,用防水聚氯乙烯绝缘带(3M 乙烯胶带)覆盖微针集成厚贴片的上表面以便防止利多卡因从微针集成厚贴片的上表面扩散。然后,将微针集成厚贴片浸没到 37°C 下温育的离心管中的 15mL 的 1x 磷酸盐缓冲盐水中,并且以规则的间隔采样。在每个采样点处,撤回所有 15mL 的释放溶液并且利用新鲜 PBS 代替。释放到 PBS 中的利多卡因的量通过高性能液相色谱法(HPLC)确定。也进行确定利多卡因从 Lignopad® 的释放的正控制。

[0275] 参照图 20A-B,本公开的代表性微针集成厚贴片用来封装不同浓度的利多卡因(即 2.2 weight% 的利多卡因、15 weight% 的利多卡因和 21 weight% 的利多卡因)。将利多卡因以特定 weight% 溶解在预聚物溶液中。在制造微针集成厚贴片之后,对微针称重,并且根据微针的重量计算利多卡因的量。如图 20A-B 中所示,分别跨 24 小时和 2 小时的时段,微针集成厚贴片表现出利多卡因的快速初始释放,接着是利多卡因的缓慢且一致的释放。

[0276] 根据体外释放测试(图 20A),总共 0.20 ± 0.01 mg 的利多卡因从 2.2% w/w 利多卡因贴片中释放,其构成制造的微针集成厚贴片中的全部利多卡因的 15.1%。更大量的利多卡因(86.24 ± 11.61 mg)从包含 21% w/w 的利多卡因的微针集成厚贴片中释放,其构成封装在贴片中的利多卡因的几乎 100%。从封装的不同药物浓度中释放的利多卡因的量之间的差异是显著的(ANOVA, $p < 0.001$)。当制造的贴片中的利多卡因的浓度增加时,更少的残余药物留在微针集成厚贴片中,这可能归因于聚合物 - 药物比率的降低以及减小药物 - 聚合物相互作用的可能性。

[0277] 在实施例中,利多卡因在背衬层、微针轴和 / 或厚背衬层贴片中的选择性结合可以通过使用包含利多卡因的预聚物溶液以便分别制造背衬层、微针和 / 或厚背衬层贴片而实现。

[0278] 经由使用微针集成厚贴片增强生物活性物质(在这种情况下为药物利多卡因)的渗透

[0279] 经由使用本公开的微针集成厚贴片增强药物渗透被评价。死老鼠皮肤用来确定利

多卡因通过皮肤的渗透。老鼠皮肤上的毛发使用脱毛膏 (Veet[®] 敏感皮肤脱毛膏) 移除。皮下脂肪使用解剖刀移除并且在 1x PBS 中与水化合。将皮肤分成 6 个部分 :3 份 Lignopad 置于完整皮肤上, 并且 3 份使用制造的微针集成厚贴片。当应用贴片时, 模仿下层组织的 10 层 Kimwipes 用来支撑老鼠皮肤。利用拇指的力将微针集成厚贴片应用到皮肤上 1 分钟。然后, 使用 Scotch[®] 胶带将微针阵列固定到皮肤上。

[0280] 将具有贴片的老鼠皮肤安装到具有 1.131cm² 的有效曝光面积的水平扩散池 (TK-6H1, 中国上海佳凯科技有限责任公司) 上。扩散池通过循环水套维持在 37°C, 并且在 250rpm 下连续地搅拌溶液。受体池填充有具有作为抗微生物剂的 0.005w/v 叠氮化钠的 4.5mL 的 PBS, 并且以规则的间隔获取样本。在每个时间间隔处撤回 4mL 的受体溶液, 并且利用相同量的新鲜受体溶液代替。收集时在 4°C 下储存样本, 并且在撤回上清液之前在 10 000rpm 下对它们进行离心作用 5 分钟以用于 HPLC 分析。所有动物实验都由 NUS 的 IACUC 批准。

[0281] 制造了具有 2.2 weight% 的利多卡因、15 weight% 的利多卡因和 21 weight% 的利多卡因的浓度微针集成厚贴片设备。参照图 20C-D, 经由使用微针集成厚贴片增强药物渗透通过将来自微针集成厚贴片的利多卡因通过老鼠皮肤的渗透曲线与来自商业利多卡因贴片 (Lignopad[®]) 的渗透曲线进行比较而评价。

[0282] 当将本公开的 21% w/w 利多卡因微针集成厚贴片与 Lignopad 比较时, 观察到与商业上可获得的贴片相比, 更多的利多卡因从微针集成厚贴片渗透通过皮肤 (图 20C)。对于微针集成厚贴片而言, 总共 25.21 ± 3.41mg/cm² 的利多卡因渗透通过皮肤。形成对照的是, 来自 Lignopad[®] 的总共 19.49 ± 8.01mg/cm² 的利多卡因渗透通过皮肤。与其中仅在 3 小时之后在受体溶液中检测到利多卡因的 Lignopad[®] 相比, 利多卡因在将微针集成厚贴片置于皮肤上的 5 分钟内渗透 (图 20D)。在实施例中, 药物释放的这种更快速初始速率可以允许更快速的疼痛缓解速率, 因为利多卡因可以更快速地输送至疼痛位点。

[0283] 依照渗透研究, 当与商业的利多卡因贴片相比时, 本公开的微针集成厚贴片的使用在前 120 分钟内增加利多卡因的渗透 200%, 在前 180 分钟内增大 188%, 跨 24 小时的时段增大 129%。

[0284] 利多卡因的高性能液相色谱分析

[0285] 释放 / 渗透的利多卡因的量使用具有海波西尔 ODS C₁₈ 反相色谱柱 (ODS 海波西尔, 赛默科技 ;4.6x250mm, 5 μ m) 的日立 L2000LaChrome 精英 HPLC 系统进行分析。使用的移动相为具有 5.5% v/v 三乙胺的乙腈 : 水 (70:30v/v), 其通过尼龙膜过滤器 (德国 Whatman[®]) 过滤, 并且在使用之前进行声处理。泵的流速维持在 0.7mL/min, 并且每次运行长 8.0 分钟。在每次运行期间注射 20 μ L 的样本, 并且在 254nm 的波长下执行 UV 检测。

[0286] 在分析样本之前, 通过制备 0.2、1.0、10.0mg/mL 的标准利多卡因溶液绘出标准利多卡因曲线。2、5、10、15 和 20 μ L 的注射体积从标准溶液中吸取以便获得 3 个校准曲线。然后, 将从样本获得的峰与校准曲线进行比较, 并且外推注射的样本中存在的利多卡因的量。

[0287] PEGDA 和利多卡因的 FTIR-ATR

[0288] 在验证是否存在 PEGDA 与利多卡因之间的相互作用的目的中, 使用珀金埃尔默聚光灯 400FTIR 成像系统进行傅里叶变换红外衰减全反射 (FTIR-ATR) 光谱法。获得具有和没有利多卡因的预聚物溶液的光谱以及具有和没有利多卡因的聚合膜的光谱。膜通过在离光

源 11.5cm 处暴露于高强度 UV 光 2 秒钟, 接着在 3.5cm 处 4.3 秒钟并且在 11.5cm 处 3 秒钟以模仿微针制造中使用的相似条件而制成。为了分析液体样本, 将液滴置于晶体上且覆盖晶体。对于固体样本而言, 将固体置于晶体上, 并且将压臂置于样本上方以便对样本施加~80N 的力。对于 IR 分析, 无需附加的样本制备。

[0289] 为了确定 PEGDA 与利多卡因之间是否存在任何化学相互作用, 比较 FTIR-ATR 光谱以便了解是否存在 IR 伸展的任何移动或加宽。根据从 FTIR-ATR 分析获得的结果(图 21), 来自利多卡因的 N-H 峰从纯利多卡因粉末中的~3271cm⁻¹ 移动到聚合 PEGDA 膜中的利多卡因的~3258cm⁻¹, 并且观察到峰的加宽。再者, 在~1660cm⁻¹ 处存在峰的明显加宽, 这可能表明酰胺 C = O 伸展。由于这些观察结果与先前研究的聚合物中的利多卡因的表征中报道的观察结果相关, 因而可能的氢键合可能存在于利多卡因集成贴片中, 其限制了利多卡因从聚合物中释放, 并且造成一些利多卡因甚至在应用 24 小时之后仍然留在制造的贴片中。

[0290] 此外, 当 PEGDA 聚合到固体膜中(图 20D)时, 与液体 PEGDA 中的丙烯酸基的主要 C = C 键合信号相应的 1635、1621、1409 和 810cm⁻¹ 处的光谱峰不再存在。

[0291] 代表性尖锐或更尖锐生物相容聚合物微针设备制造和测试实验

[0292] 本公开也涉及可以用于高效皮肤刺入和渗透的尖锐或更尖锐生物相容聚合物微针。本公开进一步涉及一种制造可以用于高效皮肤刺入和渗透的尖锐生物相容聚合物微针的工艺。在实施例中, 本公开的尖锐微针可以用于化妆品应用。在实施例中, 本公开的尖锐微针可以用于高效的经皮生物活性物质(即药物和 / 或蛋白质)输送。

[0293] 实验: 代表性尖锐或更尖锐生物相容聚合物微针和用于制造它的代表性工艺

[0294] 在该实验中, 制造了对于高效皮肤渗透有用的尖锐或更尖锐生物相容聚合物微针。用于制造更尖锐微针的工艺基于上面描述的其中使用了光掩模的光刻术的相同原理。然而, 用于制造尖锐微针的光掩模使用涂敷铬的玻璃制备, 该玻璃在光学上图案化以便在光掩模中形成凸透镜, 如图 21(A) 中所示。通过光掩模将包含 0.5% 的 HMP 的 PEGDA 预聚物溶液暴露于紫外光, 从而形成更尖锐微针, 如图 21B 中所示。光掩模中的凸透镜由于折射而使得紫外光合并, 从而使得 PEGDA 聚合物形成更尖锐微针, 如图 24A-C 中所示。在实施例中, 微针的形状、长度和尖端直径可以通过修改要使用的光掩模而修改。

[0295] 实验过程、结果和讨论:

[0296] 材料

[0297] 从西格玛奥瑞奇公司(密苏里州圣路易斯)购买 PEGDA(Mn = 258)、2-羟基-2-甲基苯丙酮(HMP)、牛胶原蛋白 1 型、FITC 鞣合物和台盼蓝溶液(0.4%)。所有材料都是试剂纯并且像接收的那样使用。

[0298] 光掩模的制造

[0299] 首先如图 22A 中所示, 在 120°C 下在食人鱼溶液(H₂SO₄/H₂O₂)中清洁 4" 派瑞克斯玻璃晶片(康宁 7740)20 分钟。之后, 电子束蒸发器用来将 Cr/Au 层(30nm/1 μm)沉积在玻璃晶片上。使用 AZ7220 正性光刻胶的经典光刻工艺被利用来使用 Cr/Au 蚀刻剂在 Cr/Au 层中产生图案。为了提高 Cr/Au/光刻胶掩蔽层的质量, 在 120°C 下在热板上执行硬质烘烤工艺。玻璃晶片的相对表面使用蜡临时粘合在假硅晶片上以便在湿法蚀刻工艺期间保持表面的质量。透镜或微透镜的各向同性蚀刻使用 10/1 的体积比率的优化的 HF(49%)/HC1(37%)、使用磁力搅拌 8.5 分钟(具有 7 μm/min 的蚀刻速率)而执行。玻璃晶片与假

硅晶片的分离通过置于热板（在 100°C 下）上执行。透镜或微透镜的边缘处的悬垂的光刻胶和 Cr/Au 层通过超声波处理而移除。最后，光刻胶掩模和残余蜡的移除通过在 80°C 下在超声槽中的 NMP (N- 甲基 -2- 吡咯烷酮) 中清洗而完成。光掩模维度的显微分析通过分别利用扫描电子显微镜和尼康 SMZ 1500 立体显微镜（日光尼康公司）直接对光掩模和模仿微透镜的 PDMS 模具复制品成像而执行。

[0300] 光掩模和嵌入的微透镜的特性显著地影响微针的几何结构，因为 UV 光线的路径取决于微透镜的凸表面上的折射程度（图 23A）。每个光掩模包括具有恒定的 1000 μm 的中心 - 中心间距的微透镜阵列 (9x9)。每个光掩模包含 81 个微透镜以便在阵列上形成 81 个微针。微透镜的分析揭示每个微透镜具有 350 μm 的直径，平凸表面直径为 130 μm，深度为 62.3 μm，如图 22(B-D) 中所示。为了评价微透镜的估计的焦距，使用毕达哥拉斯定理将第一表面的曲率半径计算为 272.89 μm。考虑这些参数以及 365nm 波长处的玻璃 (1.53627) 和空气 (1.000) 的折射率，经由透镜制造商方程将焦距估计为 509.28 μm。在实施例中，本公开的光掩模可以具有 9x9 或更小的微透镜阵列（即，光掩模可以具有 81 个微透镜或更少）。在实施例中，本公开的光掩模可以具有 9x9 或更大的微透镜阵列（即，光掩模可以具有 81 个微透镜或更多）。

[0301] 光掩模中的薄透镜的特性确定 UV 光线在凸表面处的折射程度。对用来近似薄透镜的焦距的透镜制造商方程就其在本发明人的制造工艺中作为用于微针长度的预测模型的适用性进行评价。测量的微针长度至少是计算的焦距的三倍，而不管 UV 光强度如何。这表明透镜制造商方程可能不是一个精确的预测模型。这可能归因于微透镜的平凸表面的存在。不规则的凸表面可以造成光线的球面像差，使得光线的路径显著地不同于常规凸薄透镜。球面像差允许穿过透镜中心区的平行光线聚焦得比穿过透镜边缘的光线更远，导致有差别的微针长度。然而，据发现，在优化其他参数之后，完美弯曲的透镜的缺乏并不妨碍尖头微针的形成。因此，本发明人断定透镜的当前几何结构适合于其依照本公开的方法。

[0302] 微针轴的制造

[0303] 由 9x9 嵌入式透镜或微透镜阵列组成的光掩模 (1x1cm) 用于制造工艺。如图 22B 中所示，测量 2.5x0.9cm 的腔体使用载玻片产生。使用的载玻片的数量确定腔体的高度（称为垫片厚度）。增加的垫片厚度通过增加堆叠在玻璃的任一侧的载玻片数量而实现。光掩模被定位成确保涂敷铬的表面面向腔体的内部，没有透镜或微透镜被腔体壁的侧面遮蔽。包含 0.5% w/w HMP 的 PEGDA (称为预聚物溶液) 填充到腔体中，直到涂敷铬的表面与溶液接触而没有任何可见的气泡。然后，在离 UV 源 3.5cm 的距离处使用具有 320–500nm 的 UV 滤光范围的 UV 固化站 (OmniCure S200-XL, EXFO 光子解决方案公司，加拿大) 利用希望强度的高强度该机构 1 秒钟。UV 光的强度利用 OmniCure R2000 辐射计测量。准直适配器 (EXFO 810-00042) 与 UV 光探针一起使用。在暴露于 UV 光之后，移除具有微针阵列的光掩模，并且可以重新使用剩余的预聚物溶液。光掩模的使用阻挡 UV 访问铬涂敷区，并且允许 UV 光穿过嵌入式透镜或微透镜，接着是随后光线折射到确定形成的微针的高度的焦点。然后，使用尼康 SMZ 1500 立体显微镜（日本尼康公司）对制备的微针成像以便量化微针长度和尖端直径。

[0304] UV 光强度的影响

[0305] 在维持垫片厚度 (5mm) 并且保持离 UV 光源的距离 (3.5cm) 不变的同时，在 3.14

至 15.1W/cm^2 之间改变 UV 光的强度。当强度从 3.14 增至 9.58W/cm^2 ($p<0.05$) 时, 发现平均微针长度从 $2358\pm144\mu\text{m}$ 增至 $3347\pm156\mu\text{m}$ (图 24A)。然而, 针对使用 9.58 至 15.1W/cm^2 的强度形成的微针测量的平均长度的差异被发现是不显著的 ($p>0.05$)。获得的最小长度是通过焦距量化的估计的微针长度的超过三倍。

[0306] 通过微针的尖端直径量化的锐利度随着强度的增加而减小。如图 24B 中所示, 对于 3.14 – 6.44W/cm^2 的强度 ($p<0.05$), 平均尖端直径从 $41.5\pm8.4\mu\text{m}$ 增大到 $49.0\pm5.8\mu\text{m}$ 。然而, 对于 6.44 – 12.4W/cm^2 的强度, 没有观察到尖端直径的显著变化, 当使用 15.1W/cm^2 的强度时, 获得 $71.6\pm13.7\mu\text{m}$ 的最大尖端直径。有趣的是, 当使用更高的强度时, 观察到微针的更大水平的变形。应当指出的是, 随着强度的增加, 微针的上半部分变得更宽和更呈圆柱形, 下半部分获得更锥形的形成。此外, 微针的尖端也经历变形, 导致更不规则的结构。在 6.44W/cm^2 下制造的微针被观察到形状比更高强度的情况更规则, 没有显著的结构变形, 从而保持了尖锐度。因此, 对于后续的实验, 将该强度选择用于制造微针。

[0307] 垫片距离的影响

[0308] 维持强度 (6.44W/cm^2) 且保持离 UV 光源的距离 (3.5cm) 不变, 在 $1050\mu\text{m}$ 至 $5000\mu\text{m}$ 之间改变垫片厚度。对于 1050 – $2525\mu\text{m}$ 的垫片距离, 观察到平均长度的预期增加 ($p<0.05$)。对于针对 $2525\mu\text{m}$ 至 $3000\mu\text{m}$ 的垫片距离形成的微针, 观察到平均长度的差异不显著 ($p>0.05$)。

[0309] 然而, 对于使用 $5000\mu\text{m}$ 的垫片距离形成的微针, 观察到 $3347\pm156\mu\text{m}$ 的最大微针长度 ($p<0.05$) (图 24C)。该趋势与对于微针的尖端直径观察到的趋势不同。平均尖端直径随着垫片距离从 $1050\mu\text{m}$ 增加至 $3000\mu\text{m}$ 而增大 ($p<0.05$), 超过 $3000\mu\text{m}$ 的垫片距离, 达到恒定尖端直径 ($p>0.05$) (图 24D)。

[0310] 用于聚合过程的 UV 光的强度关于微针几何属性可能是重要的。该实验的宗旨之一是利用允许本发明人实现长的长度与短的尖端直径之间的平衡的最佳强度制造用于高效皮肤刺入的尖锐微针。在该新方法中, 6.44W/cm^2 的强度允许微针达到高的垂直长度, 具有最小的结构变形, 以及不显著地降低锐度的希望的尖端直径。尽管在更低强度下也获得了没有任何可观察到的变形的更尖锐的微结构, 但是微针可能不具备足够的强度, 因为更高的强度导致形成更坚硬的微针, 这改进了刺入效能。

[0311] 观察到的另一个现象是, 当强度增加时, 与假设的圆锥形状相比, 微针的长度随着微针获得更呈圆柱形的形状而显著地增大。光的光学性质可以合理化这种事情的发生。由于微透镜平顶表面的原因, 一些光线以准直的方式行进到焦点之外。此外, 会聚的光线也可能外推至焦点之外。光线的这些特殊光学运动可能导致针的更圆柱形的部分的形成。然而, 聚合程度具有极限。基于光的平方反比定律, UV 光随着离透镜表面的距离的增加而损失能量, 这可以解释焦点之外观察到的微针的渐细外观。随着强度的增加, 更多的光子传输至更远的距离, 导致更大的不均匀聚合, 这由更高强度下形成的变形和非均匀渐细结构证明。

[0312] 微针背衬层的制造

[0313] 参照图 22(C), 将具有与其附接的尖锐微针的光掩模置于或者浸没到填充有预聚物溶液的 24 容器板的容器中。在实施例中, 具有与其附接的更尖锐微针的光掩模可以置于或者部分地下潜至填充有预聚物溶液的 6 容器板或者 12 容器板的容器中。

[0314] 如图 22C 所示, 将具有与其附接的微针的光掩模置于 24 容器板 (美国赛默飞世尔

科技公司)的容器中。将规定体积(300、400 和 550 μL)的预聚物溶液添加到容器,直到针下潜至希望的高度。使用的预聚物溶液的体积确定背衬层的厚度。然后,该机构在离 UV 源[EXFO OmniCure® S200-XL UV 固化站(UV 滤光器 320–500nm)(加拿大光子解决方案公司的 EXFO)]10.5cm 的距离处利用高强度紫外光(6.44W/cm^2)照射 3 秒钟的持续时间。在聚合之后,将具有背衬层的微针与光掩模分离。尖端直径差异最小的三个长度范围的微针可以经由这种方法实现。然后,使用尼康 AZ100 立体显微镜(日本尼康公司)对具有背衬层的制备的微针成像,以便量化微针长度、尖端直径和基部直径。

[0315] 在实施例中,紫外光强度可以从大约 3.14W/cm^2 至大约 15.1W/cm^2 。如图 22(C) 中所示,在照射步骤期间,形成 PEGDA 背衬层,并且背衬层的 PEGDA 大分子单体共价键合到微针。预聚物溶液包围微针的下潜部分以便形成背衬层。

[0316] 背衬层的形成对于增强微针的强度并且允许从光掩模移除微针是至关重要的。本发明人通过从 $300\text{ }\mu\text{L}$ 到 $550\text{ }\mu\text{L}$ 改变使用的预聚物溶液的体积操纵背衬层的厚度。由于聚合的微针与预聚物溶液之间的亲和力以及微针之间的小的中心 – 中心间距的原因,毛细作用是显而易见的。结果,如图 25(A–C) 所示,这导致获得一定长度范围的每个微针贴片的形成,尖端直径未受影响。然而,针对每个体积的长度范围彼此截然不同($p<0.05$)。据观察,随着用来形成背衬层的体积从 $300\text{ }\mu\text{L}$ 增加到 $550\text{ }\mu\text{L}$,平均微针长度从 $1224\pm112\text{ }\mu\text{m}$ 减小至 $583.7\pm105\text{ }\mu\text{m}$ (图 25G)。类似地,如图 25H 中所描绘的,基部直径从 $233\pm20\text{ }\mu\text{m}$ 减小至 $156\pm21\text{ }\mu\text{m}$ ($p<0.05$)。先前的研究推荐了等效的直径而不是基部直径以用于评价渐细微结构的机械故障。针对平均长度分别为 1224 、 813 和 $584\text{ }\mu\text{m}$ 的微针,使用下述等式计算出 111 ± 6.6 、 101 ± 4.3 和 $85\pm7.0\text{ }\mu\text{m}$ 的等效直径:

$$D_{\text{equivalent}} = D_{\text{tip}} + [(D_{\text{base}} - D_{\text{tip}}) \div 3]$$

[0318] 将附接到背衬层的微针小心地从光掩模中移除,并且利用去离子水清洗以便移除非交联的预聚物溶液。

[0319] 在实施例中,在制造微针和制造背衬层期间,紫外线强度的优化可以通过将紫外线强度从大约 3.14W/cm^2 改变为大约 15.1W/cm^2 而执行。在实施例中,在制造微针和制造背衬层期间,垫片长度的优化可以通过将垫片从大约 $1050\text{ }\mu\text{m}$ 改变为大约 $5000\text{ }\mu\text{m}$ 而执行。

[0320] 紫外线强度的影响

[0321] 如图 24(A) 中所示,在实施例中,修改紫外线强度可以用来修改微针以便具有从大约 $2357\pm143\text{ }\mu\text{m}$ 至大约 $4035\pm293\text{ }\mu\text{m}$ 的平均长度。如图 24(B) 中所示,在实施例中,修改紫外线强度可以用来将微针的尖端直径调整为从大约 $41\pm8\text{ }\mu\text{m}$ 至大约 $71\pm13\text{ }\mu\text{m}$ 。在实施例中,大约 3.14W/cm^2 的紫外线强度可以用来提供具有大约 $2357\pm143\text{ }\mu\text{m}$ 的平均长度的微针。在实施例中,大约 15.1W/cm^2 的紫外线强度可以用来提供具有大约 $4035\pm293\text{ }\mu\text{m}$ 的平均长度的微针。在实施例中,大约 3.14W/cm^2 的紫外线强度可以用来提供具有大约 $41\pm8\text{ }\mu\text{m}$ 的尖端直径的微针。在实施例中,大约 15.1W/cm^2 的紫外线强度可以用来提供具有大约 $71\pm13\text{ }\mu\text{m}$ 的尖端直径的微针。

[0322] 垫片厚度的影响

[0323] 如图 24(C) 中所示,在实施例中,修改垫片厚度可以用来修改微针以便具有从大约 $1117\pm73\text{ }\mu\text{m}$ 至大约 $3346\pm155\text{ }\mu\text{m}$ 的长度。如图 24(D) 中所示,在实施例中,修改垫片厚度可以用来将微针的尖端直径调整为从大约 $279\pm8\text{ }\mu\text{m}$ 至大约 $48\pm5\text{ }\mu\text{m}$ 。

[0324] 改变预聚物溶液体积的影响

[0325] 如上面所提到的,在实施例中,在制造背衬层期间,可以将具有与其附接的更尖锐微针的光掩模置于或者浸没到填充有预聚物溶液的 24 容器板的容器或者 16 容器板的容器中并且暴露于紫外光。参照图 25A-C 和图 24G,修改预聚物溶液的量可以用来修改微针的平均长度。在实施例中,预聚物体积可以为大约 300 μL 、大约 400 μL 或者大约 500 μL 。在实施例中,如图 25(A) 中所示,使用 300 μL 的预聚物体积可以导致大约 1224 μm 的微针长度。在实施例中,如图 25(B) 中所示,使用 400 μL 的预聚物体积可以导致大约 813 μm 的微针长度。在实施例中,如图 25(C) 中所示,使用 500 μL 的预聚物体积可以导致大约 583 μm 的微针长度。如图 25G 中所示,在实施例中,增加预聚物溶液体积可以导致微针长度的减小。例如,将预聚物溶液从大约 300 μL 增加到大约 500 μL 可以导致微针长度从大约 1224 μm 减小至大约 583 μm 。

[0326] 微针断裂力测试

[0327] 利用数字测力计 (美国狄龙 GL) 应用的力将三个长度范围的微针按压到铝板上。增大应用的力,直到观察到最大阻力。记录微针开始折断的力 (断裂力),其后使用尼康 AZ100 立体显微镜 (日本尼康公司) 对微针成像以便评估微针几何特性的变化。

[0328] 贴片厚度对于微针强度的影响的评价对于选择用于最大刺穿皮肤的适当贴片类型可能是必不可少的。在使每类贴片经受增大的力之后,如图 25(D-F) 和图 25(I) 中所描绘的,观察到断裂力对于所有三类贴片是一致的 ($p < 0.05$),每类的折断程度相似。

[0329] 此外,注意到由 300 μL 和 400 μL 预聚物溶液形成的贴片中的微针描绘了一定程度的弹性,允许得到的微针在力测试之后看起来是弯曲的。在具有最厚背衬层的轴中没有观察到弯曲结构。然而,在任何这三种类型的微针轴中,微针的尖端直径和长度不受影响。

[0330] 背衬层的形成对于强化整个阵列并且确保光掩模的可重用性是重要的。强调背衬层的重要性,对背衬层厚度对于微针轴强度和刺入程度的影响进行研究。增加背衬层厚度也将增加折断针所需的力的量的初始假设被证明是不正确的,这通过针对所有三种类型的微针轴在按压到铝块上时微针的中性 (indifferent) 断裂力所证明。事实上,在所有三种类型的微针轴中,在应用超过 60N 的力之后,显著份额的微针是完好的。然而,不同轴经受高压紧力的能力可能归因于不同的机制。在 300 μL 和 400 μL 贴片中,在微针中观察到显著的弹性水平,这由力测试后微针的弯曲取向证明。较长的针的这个特征可以解释较低体积的轴经受高水平的力而没有太多折断的能力,因为微针的弯曲姿态允许吸收力。在 550 μL 贴片中,微针太短而不能描绘与其他两种结构类似的显著的柔性水平,但是由于厚背衬层充当减震器的原因,过大的力可以被最小化。

[0331] 微针刺入老鼠皮肤中

[0332] 将三个不同平均长度的微针插入从新加坡国立大学 (NUS) 比较医学中心获得的离体老鼠腹部皮肤中。首先使用脱毛膏 Veet (波兰利洁时公司) 移除毛发。清洁皮肤样本,并且使用解剖刀移除皮下脂肪。在十层 Kimwipe (金佰利, 罗斯威尔, GA) 上完全拉伸皮肤以模仿组织状机械支撑。使用拇指力插入每个微针轴 1 分钟。接着,移除微针,并且利用台盼蓝对插入区域着色 1 分钟。性质上疏水的台盼蓝特别地对疏水性穿孔角质层位点着色。利用台盼蓝着色的完好皮肤用作负控制。过量的着色剂使用 Kimwipe (金佰利, 罗斯威尔, GA) 和乙醇 (70%) 洗掉。利用染料着色的区域使用 Eikon 图像软显微镜 (中国) 通过明场显

微术观看。所有动物实验都由新加坡国立大学 (NUS) 机构动物护理和使用委员会 (IACUC) 批准。

[0333] 将平均长度为 1224、813 和 584 μm 的微针插入离体老鼠皮肤中。台盼蓝着色法用来证明每种类型的微针轴刺入的程度,如图 26(A-C) 中所示。对控制皮肤的可忽略的着色(图 26D) 证明了台盼蓝仅仅对角质层穿孔位点显著地着色。

[0334] 针长度为 1224 和 813 μm 的微针轴的刺入程度被发现是中性的 ($p>0.05$), 分别具有 $73.0 \pm 2.3\%$ 和 $71.6 \pm 2.5\%$ 的刺入百分比。然而,如图 26F 中所示,对于具有最短针长度的微针轴观察到 $94.4 \pm 3.3\%$ 的刺入百分比的显著改进。在具有两个最长针长度的轴中观察到类似于图 25(E-F) 的弹性变形。在测试的任何轴中没有观察到微针的断裂。

[0335] 聚合物微针的弹性也可以解释在微针轴之中观察到的变化的刺入百分比。刺入失败可能归因于通过较长微针的弹性不稳定性的屈曲(弯曲)失败解释的降低的轴向负载。各种不同的研究将屈曲报道为聚合物微针中的常见事情。微针弯曲的能力使得微针尖端处的实际压应力远小于拇指施加的总的压紧力。文献中报道了为了避免通过屈曲造成的微针的突然故障并且为了成功地将微针插入皮肤中,推荐 12:1 或者更小的长度 - 等效直径纵横比。该推荐可能不适合于使用本发明人的方法制造的微针。本发明人观察到,制造的所有三种类型的轴都获得低于 12:1 的纵横比。具有最长微针长度 ($1224 \mu\text{m}$) 的轴获得 11:1 的最高纵横比,而其他两个轴分别获得 8:1 和 7:1 的纵横比。然而,只有最短的轴能够无屈曲地高效地刺入。这表明 7:1 或者以下的纵横比可能是根据本发明人的光刻方法制造的微针轴的适当的几何先决条件。

[0336] 胶原蛋白渗透通过老鼠皮肤

[0337] 将最长长度范围的微针插入离体老鼠腹部皮肤中。如先前所提到的移除毛发和脂肪。在 PDMS 薄层上完全拉伸皮肤以便模仿组织状机械支撑。使用数字测力计 (美国狄龙 GL) 应用 10N 的力 2 分钟。通过利用包含 0.4M NaCl、10mM CaCl₂ 和 0.25M 葡萄糖的适当数量的 0.1M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 稀释库存胶原蛋白溶液 (0.1% w/v) 获得牛皮肤胶原蛋白 1 型 FITC 鞣合物 (MW = 300kDa)。NaCl 和 CaCl₂ 帮助稳定胶原蛋白分子,并且添加葡萄糖以防止胶原纤维的凝胶化。应用每个胶原蛋白浓度以便分离插入区域处的皮肤样本。胶原蛋白溶液与皮肤之间的接触时间在室温下保持 4 小时不变,其后使用 Kimwipe (金佰利, 罗斯韦尔, GA) 移除皮肤表面上的多余胶原蛋白。胶原蛋白通过皮肤的渗透程度通过使用 A-1R 共焦显微镜 (日本尼康公司) 观察胶原蛋白 1 型 FITC 鞣合物分别在 490nm 和 520nm 的激发和发射波长处的荧光强度而量化。包括高电压 (150)、偏移 (-1)、激光 (150mW 的 7.2%)、针孔 (1.2 任意单位)、光学切片 (16.6 μm)、扫描尺寸 (512x512)、扫描速度 (1 帧 / 秒)、像素停留 (2.2 μs)、杠杆平均 (4)、变焦 (5x)、步长 (5 μm) 和强度计算 (低 = 300, 高 = 4095) 的其他参数保持不变。

[0338] 对微针增大牛胶原蛋白 1 型 FITC 鞣合物 (MW = 300kDa) 的皮肤渗透的能力进行评估。发现所述控制 (没有胶原蛋白处理) 具有可见的高达 150 μm 的显著水平的自发荧光 (图 27A)。该现象可能归因于老鼠皮肤上存在诸如脂褐素和核黄素之类的荧光生物分子,这些荧光生物分子能够发射实验中使用的相似波长的光。然而,这没有妨碍胶原蛋白的渗透和针的刺入的程度的分析。如图 27(B-D) 所示,所有三种样本揭示出刺入 250–300 μm 的深度,证实胶原蛋白分子通过皮肤扩散直到真皮层的增加的程度。

[0339] 大分子的渗透研究使用牛皮肤胶原蛋白 1 型 FITC 鞣合物作为典型药物进行。来自胶原蛋白的荧光允许实现渗透深度的简单分析和可视化。胶原蛋白分子的扩散通过利用制造的微针处置皮肤而大大增强。胶原蛋白分子能够通过表皮扩散并且到达真皮层。这使得外源性胶原蛋白能够有效地表达其药理功能, 该功能包括激活真皮层中的角质形成细胞以用于表皮细胞再生。更高的胶原蛋白浓度不显著地影响扩散速率这一事实可以通过以下事实解释: 表皮和真皮层对于小分子和大分子二者均提供显著的渗透障碍, 从而在角质层的充分渗透时变成速率限制步骤。这意味着在经皮输送时, 更高剂量的胶原蛋白可能不保证药理作用增大。

[0340] 本公开的特定实施例的方面解决了与用于制造微针设备的现有系统、装置、设备、工艺和 / 或技术关联的至少一个方面、问题、限制和 / 或缺点。尽管本公开中描述了与某些实施例关联的特征、方面和 / 或优点, 但是其他实施例也可以表现出这样的特征、方面和 / 或优点, 并且不是所有的实施例都需要一定表现出这样的特征、方面和 / 或优点以便落入本公开的范围内。本领域普通技术人员应当理解, 上面公开的系统、装置、部件、工艺或者其可替换方案中的若干个可以根据需要组合成其他不同的系统、装置、部件、工艺和 / 或应用。此外, 本领域普通技术人员可以对各个不同的实施例做出各种不同的修改、变动和 / 或改进。

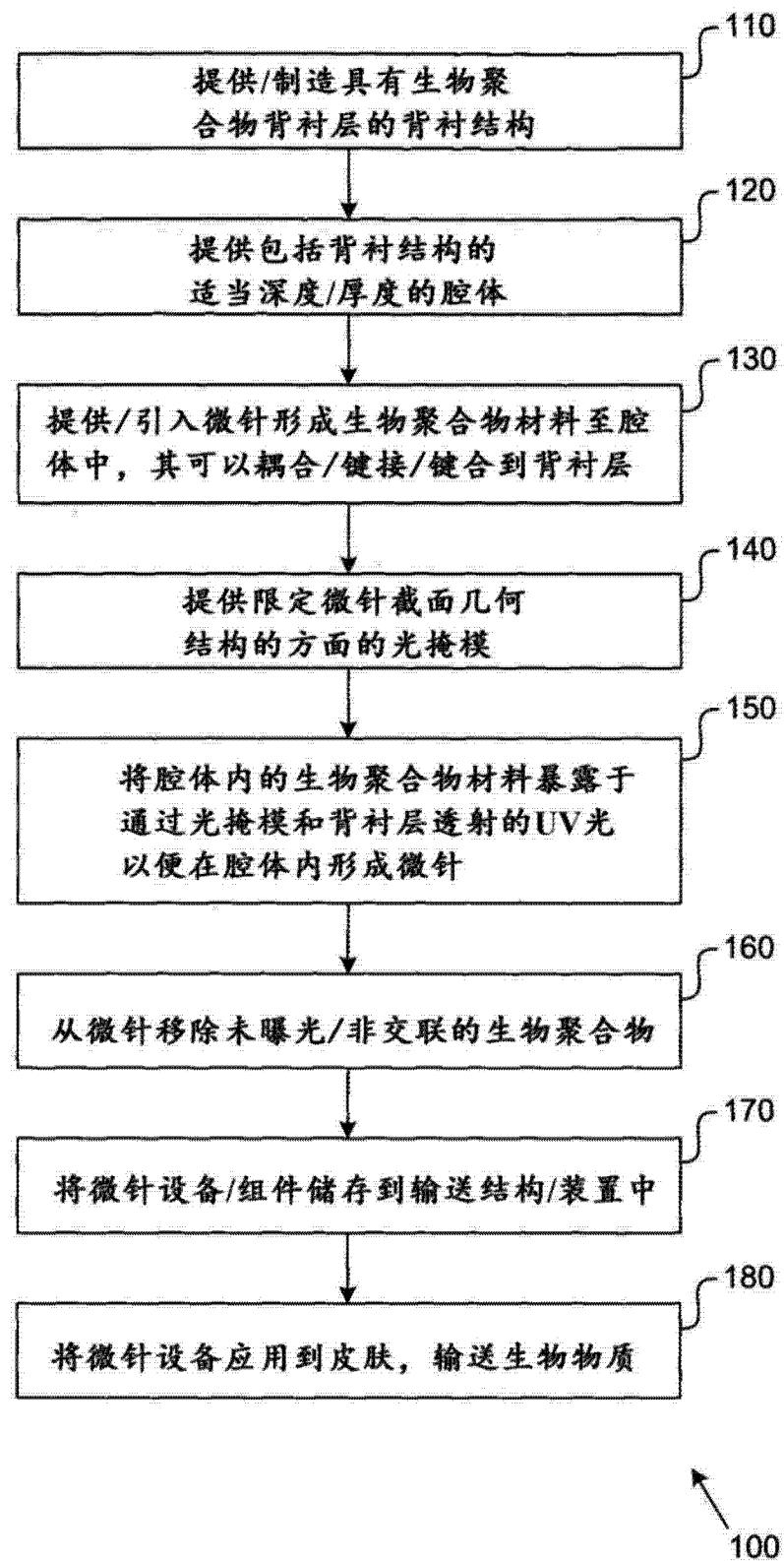


图 1A

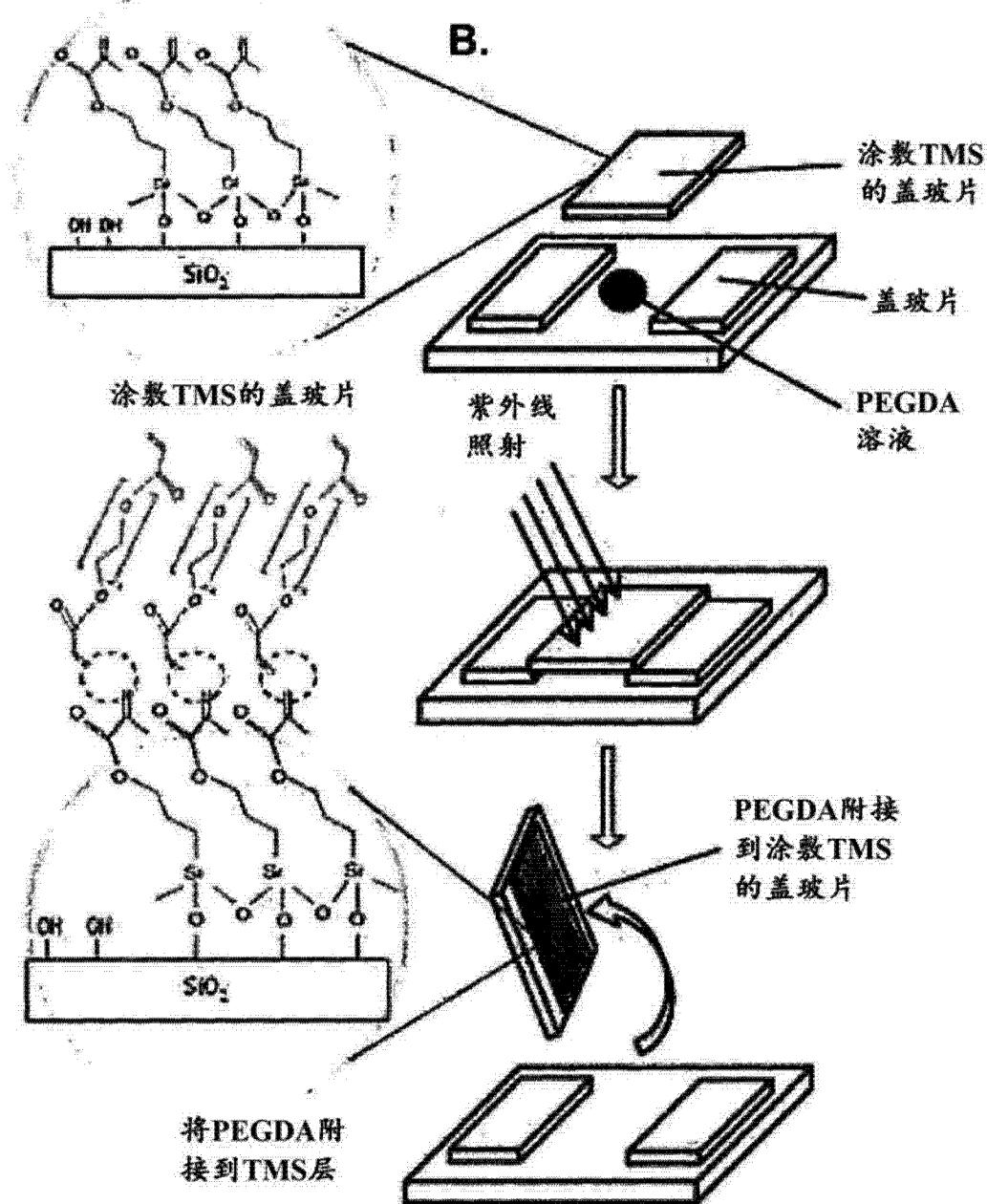


图 1B

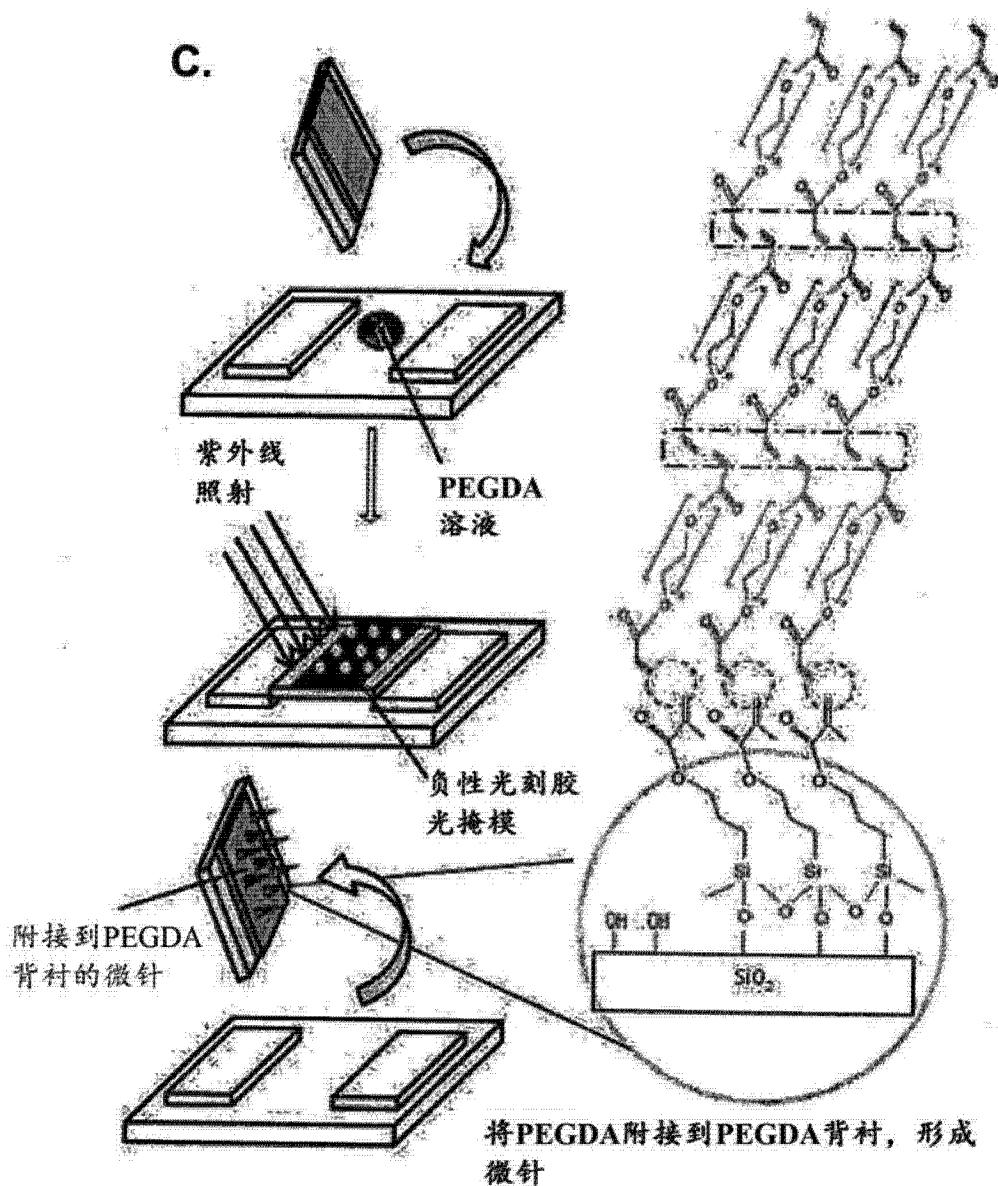


图 1C

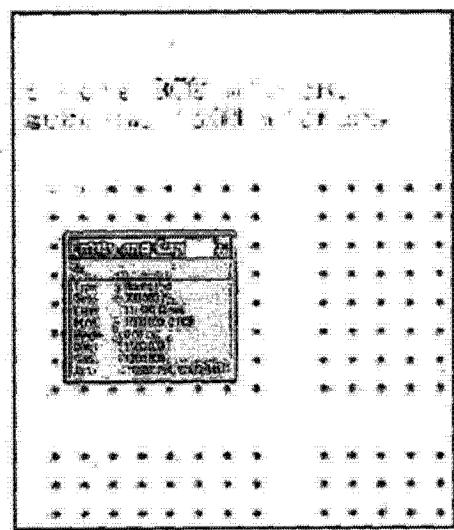


图 2

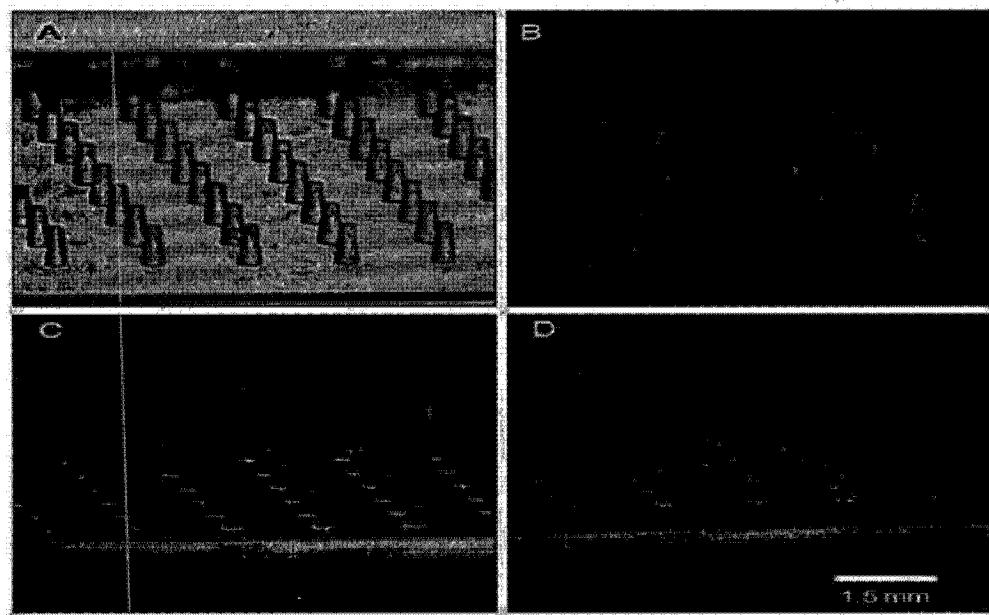


图 3A-D

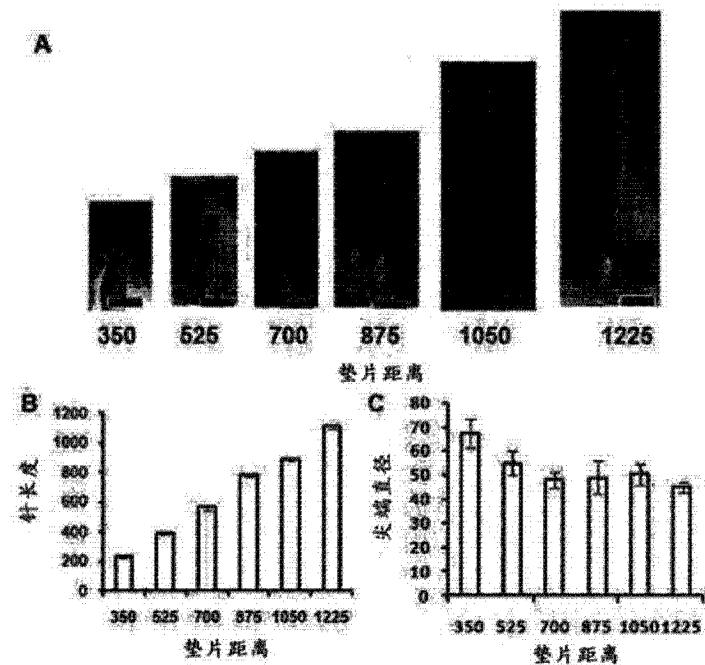


图 4A-4C

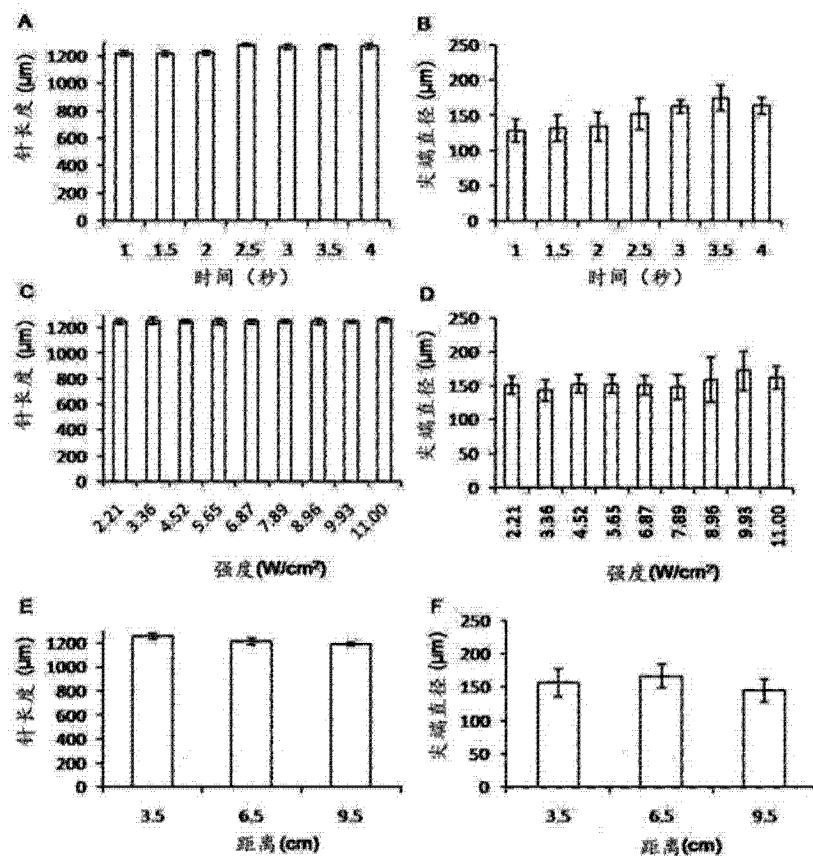


图 5A-F

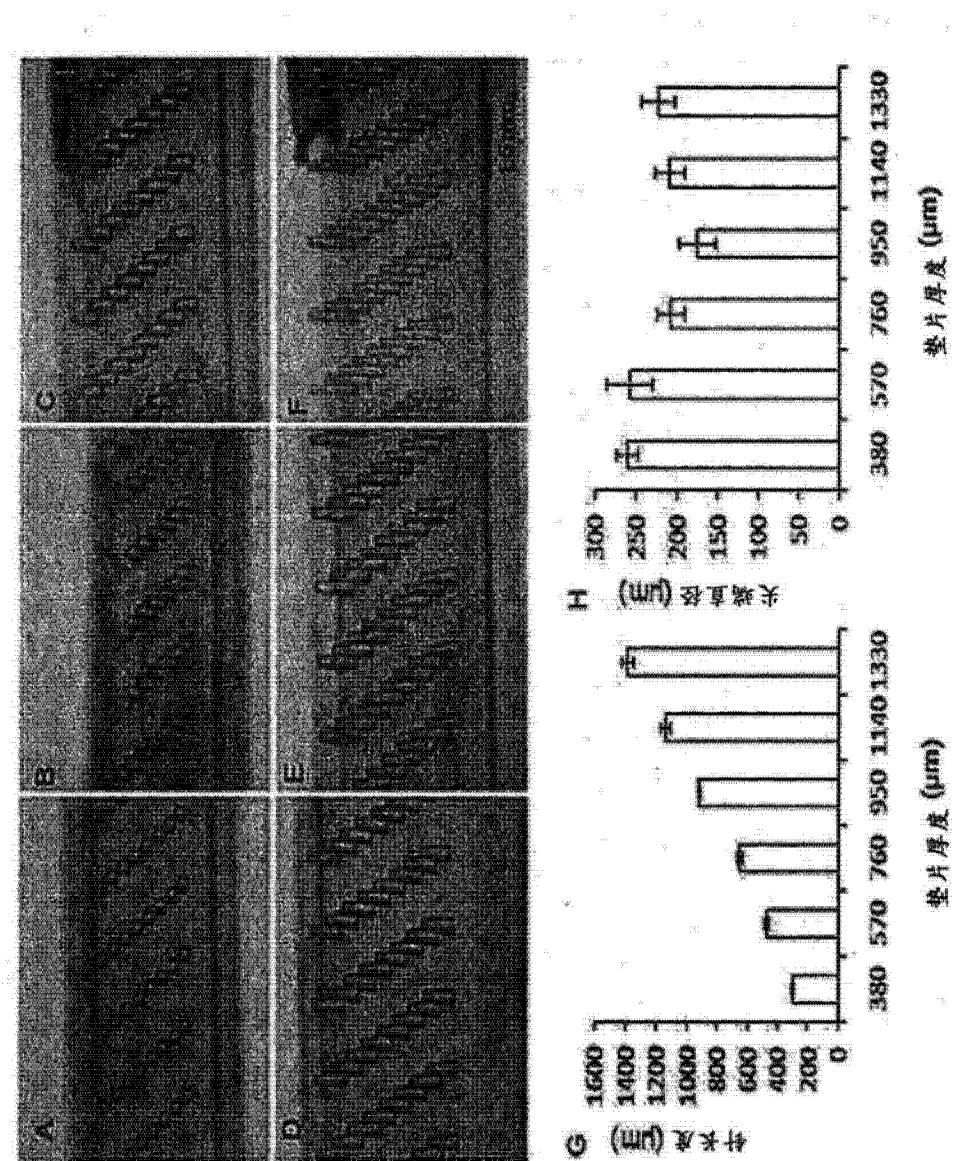


图 6A-H

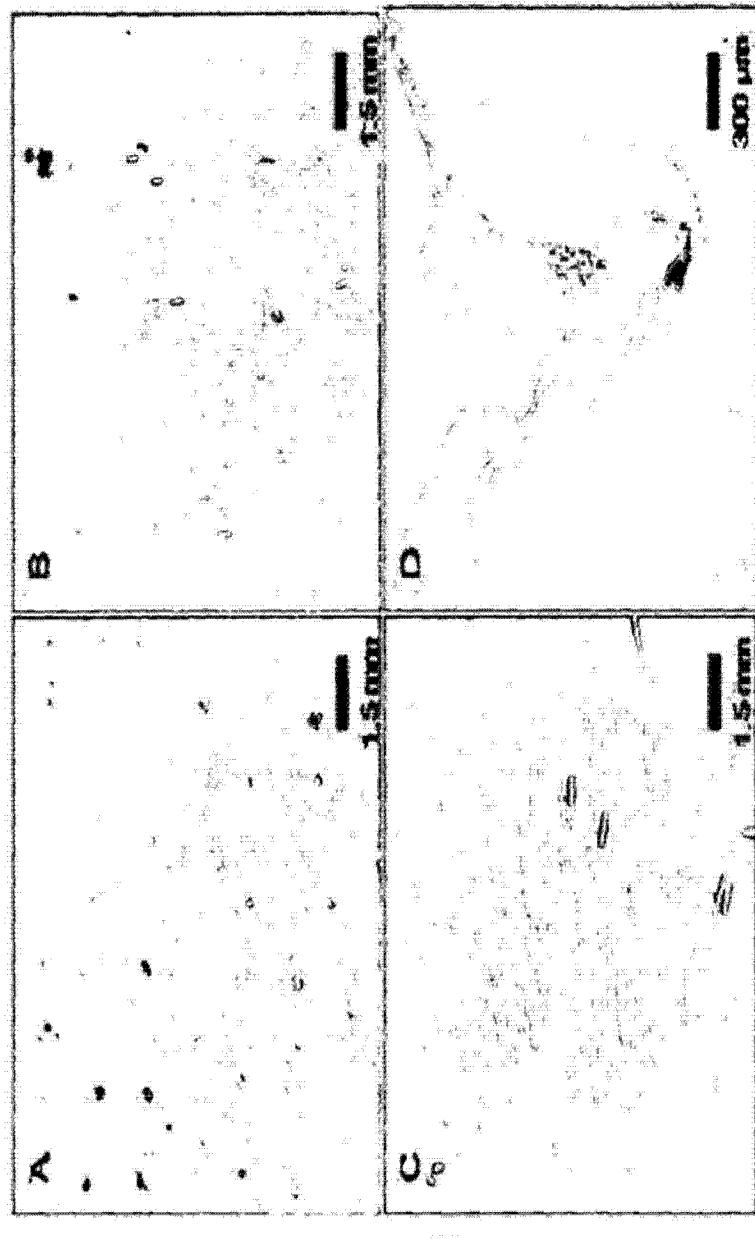


图 7A-D

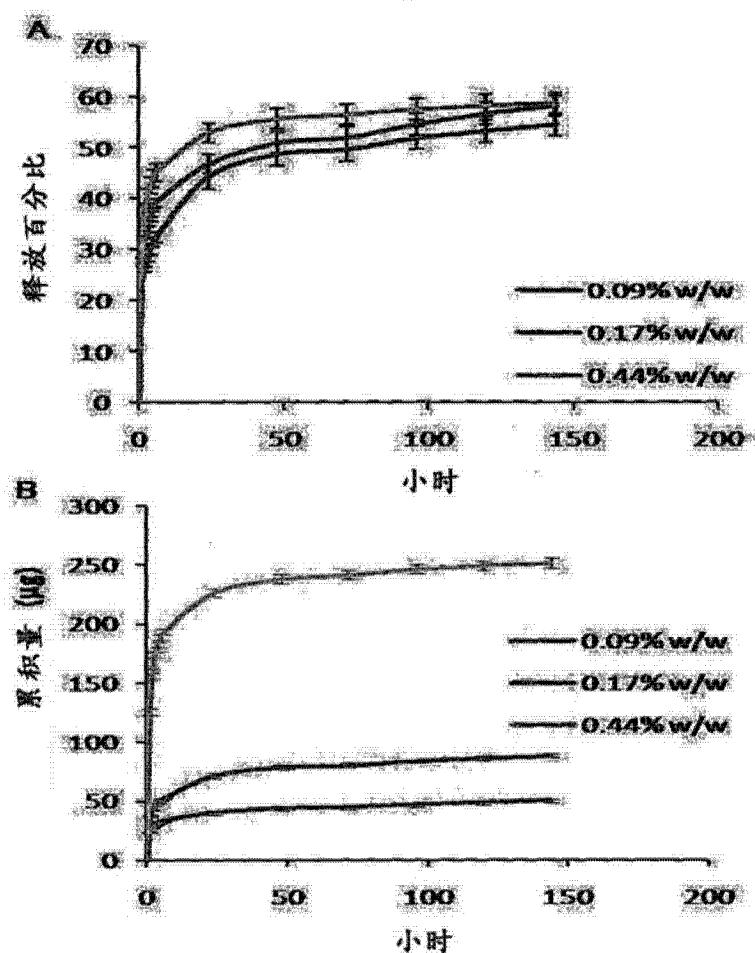


图 8A-B

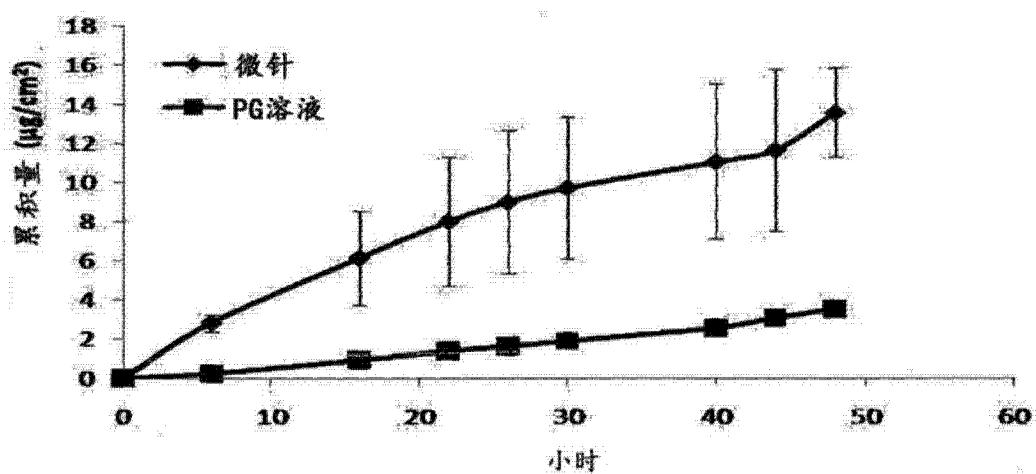


图 9

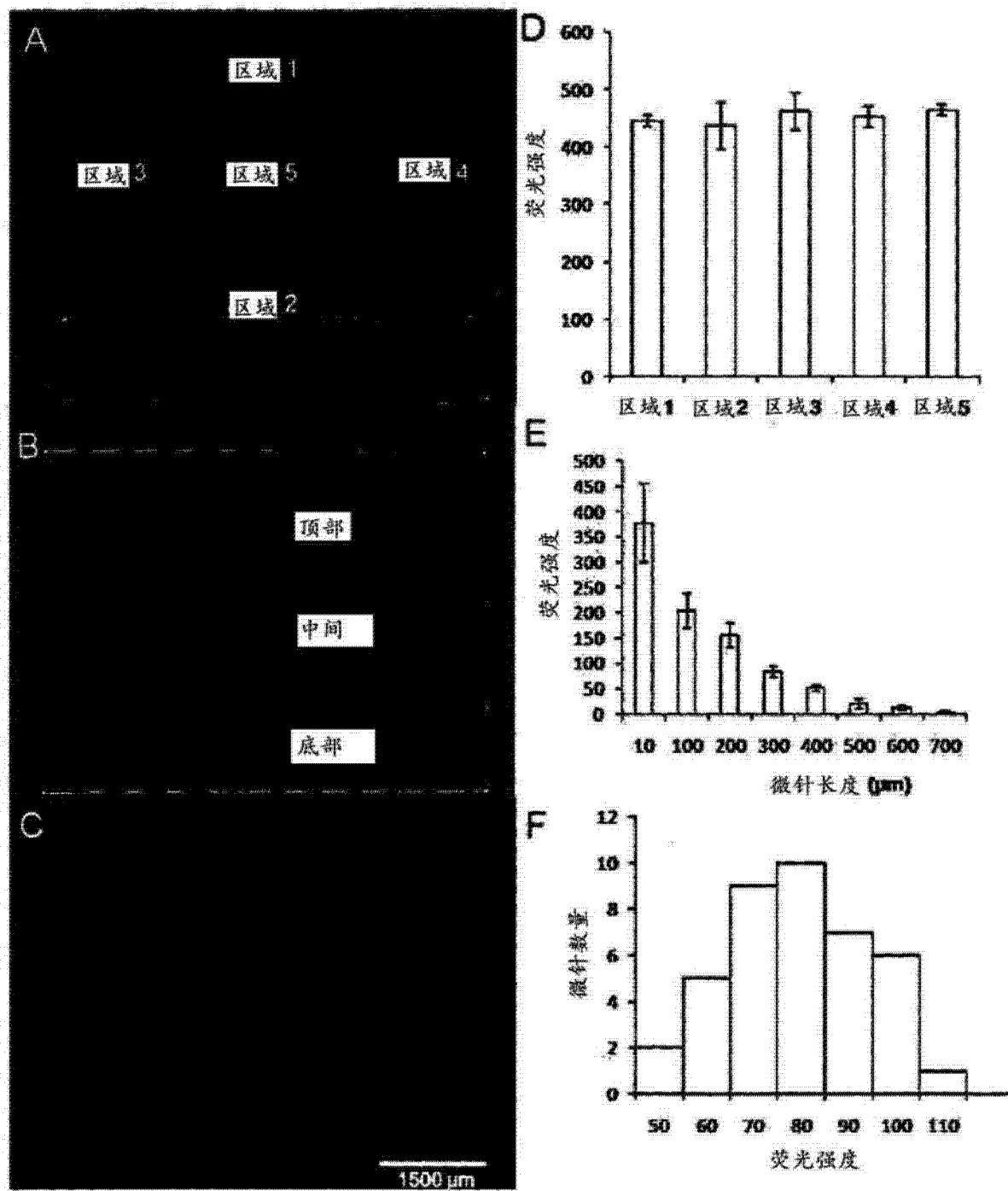


图 10A-F

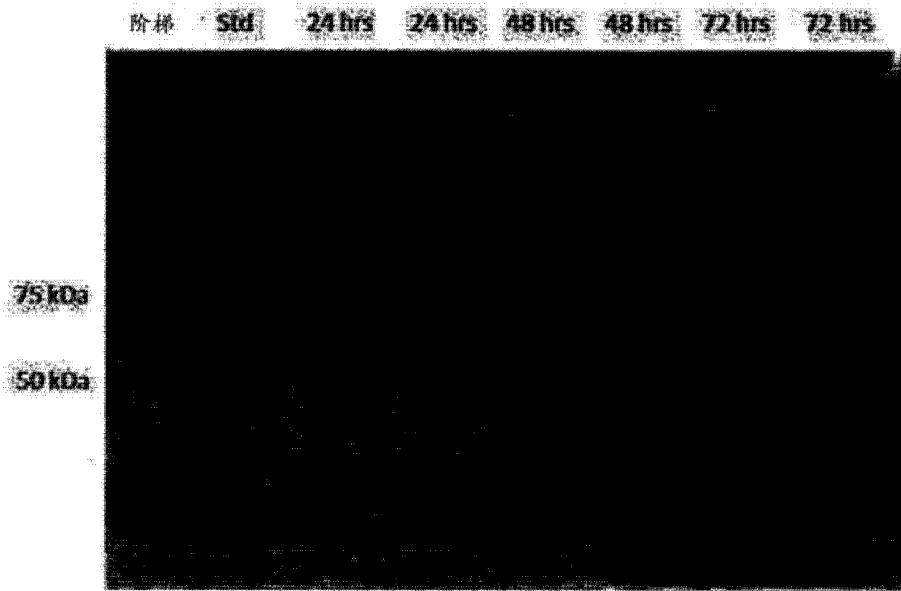


图 11

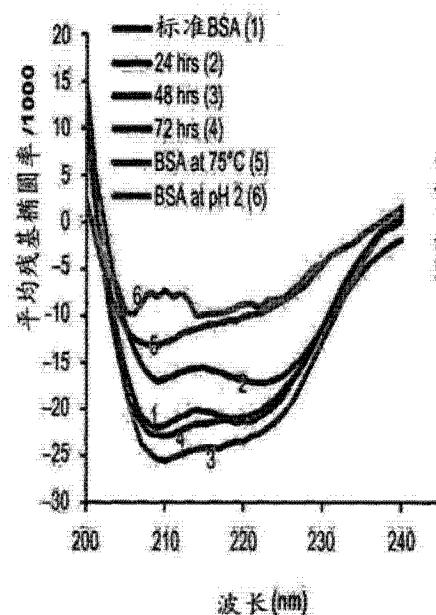


图 12A

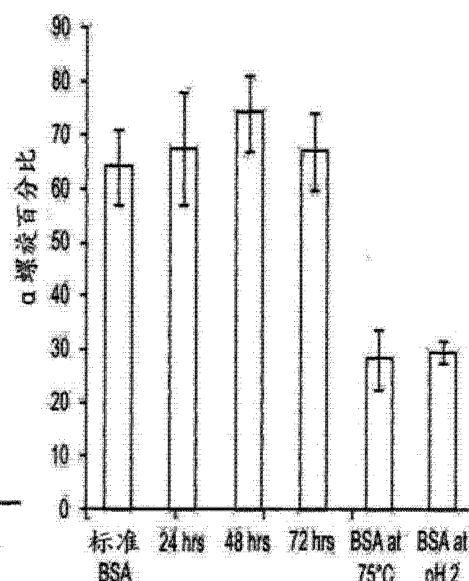


图 12B

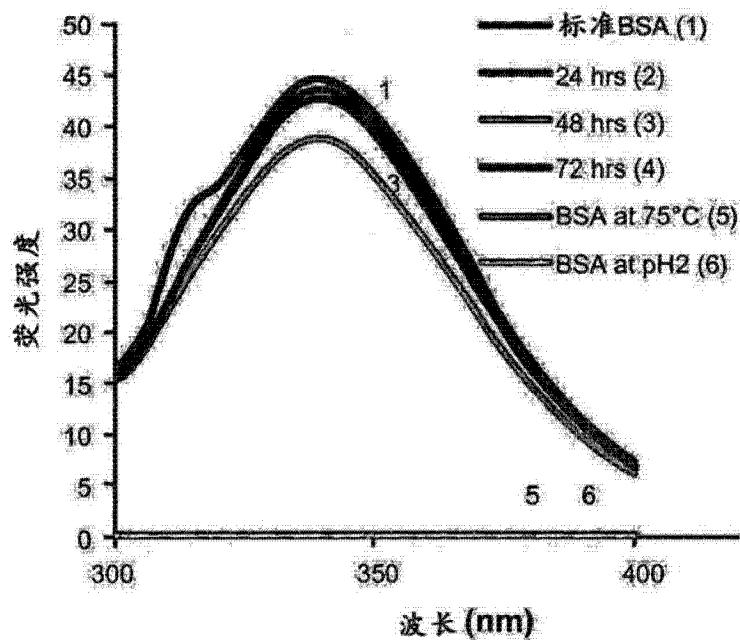


图 13

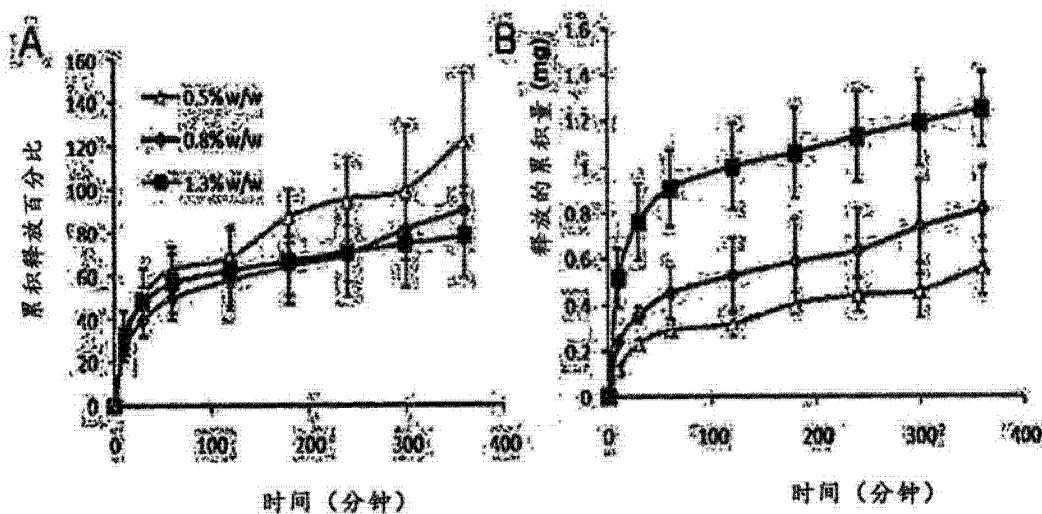


图 14A-B

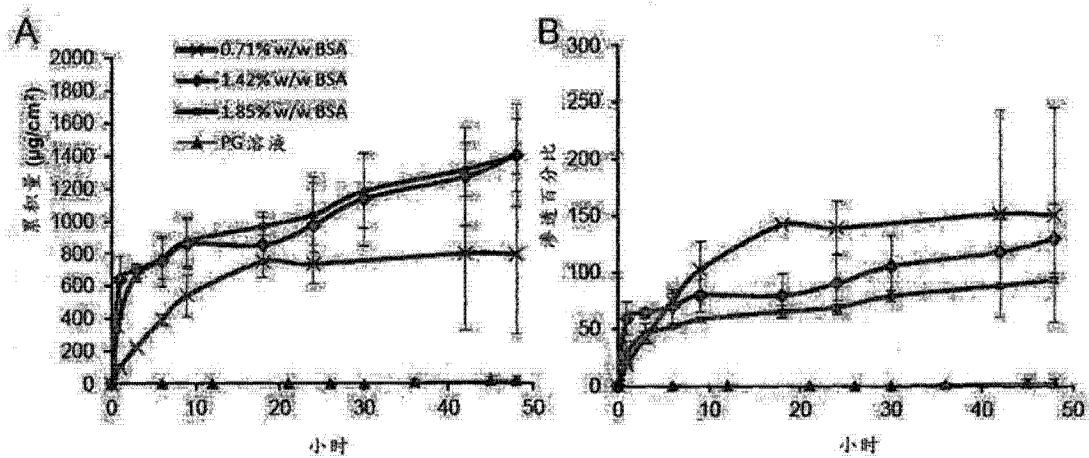


图 15A-B

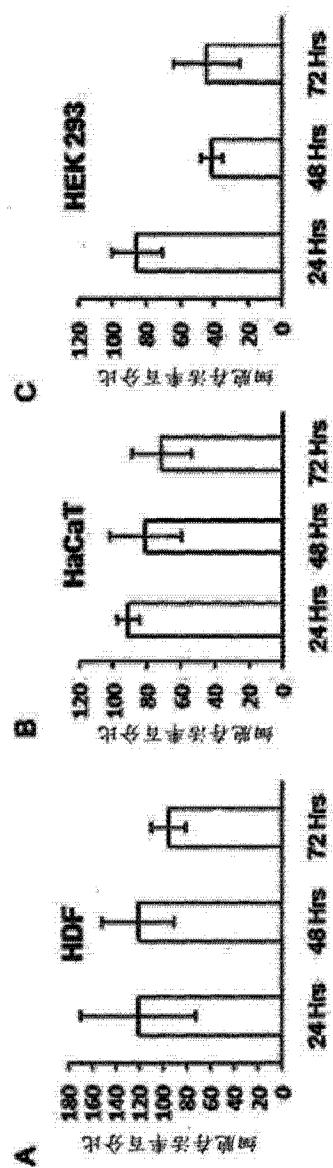


图 16A-C

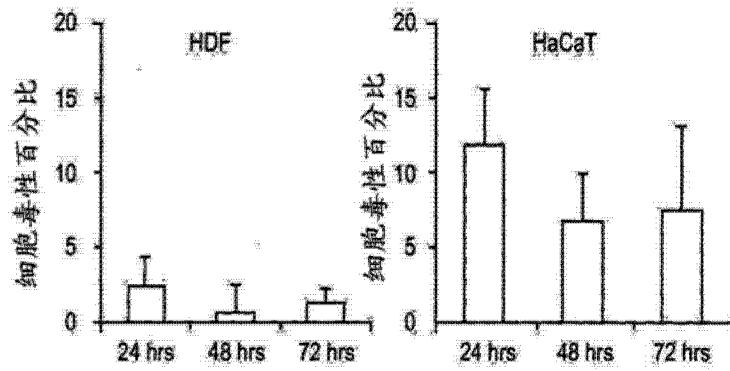


图 16D

图 16E

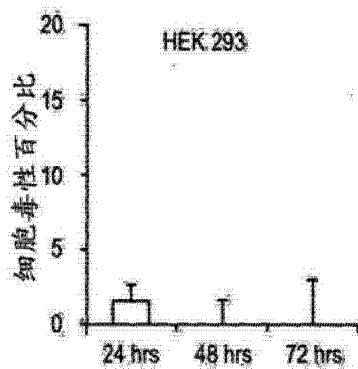


图 16F

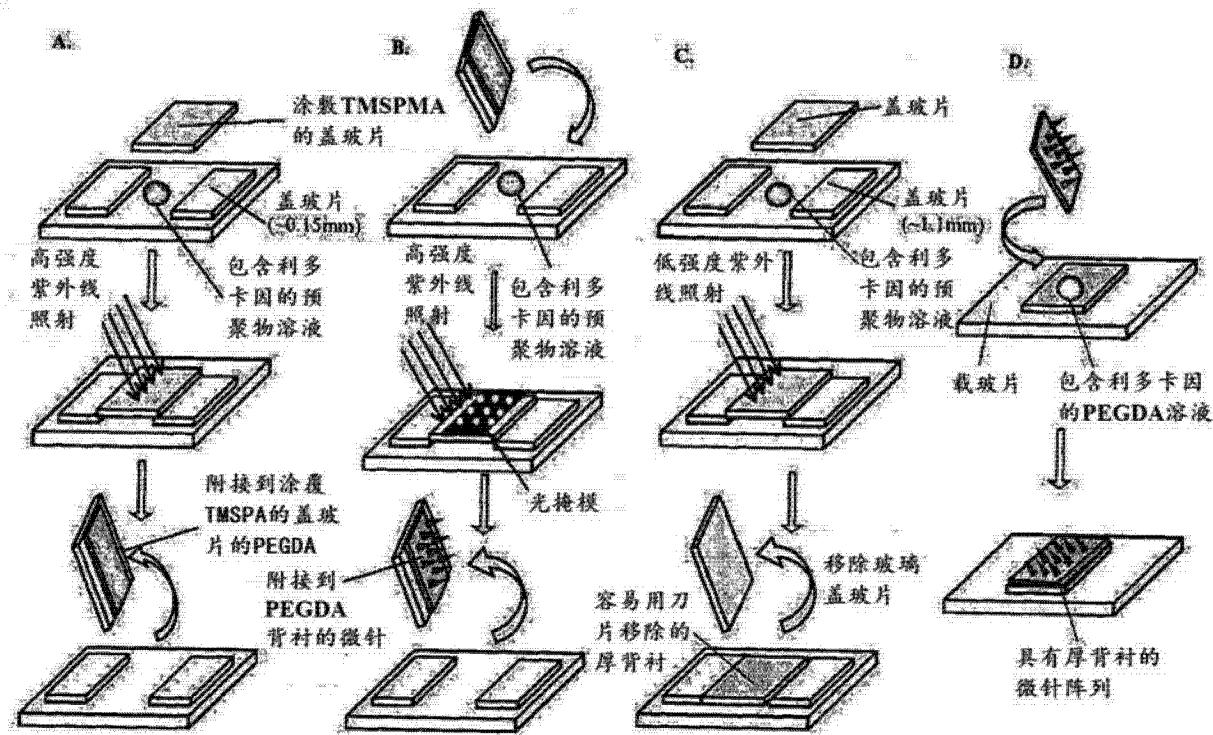


图 17A-D

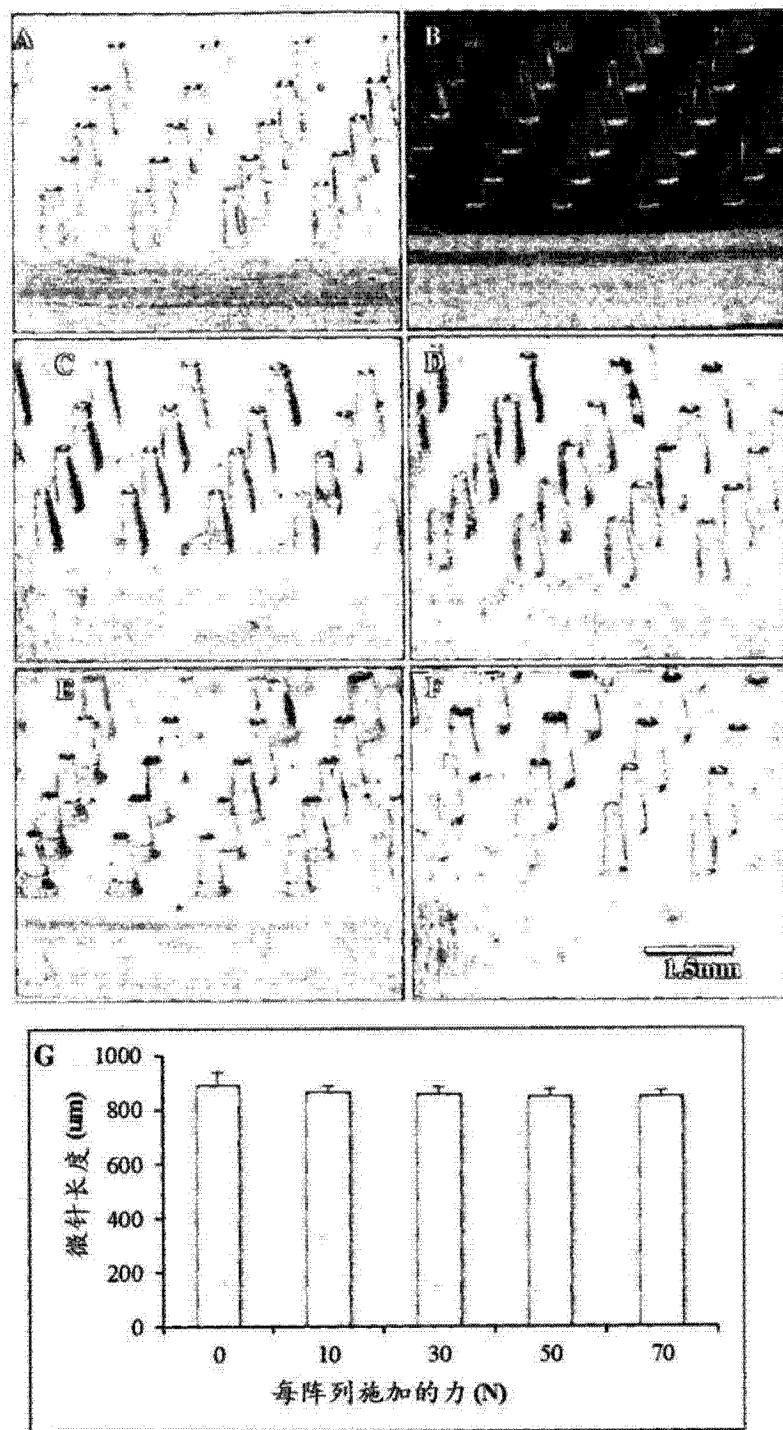


图 18A-G

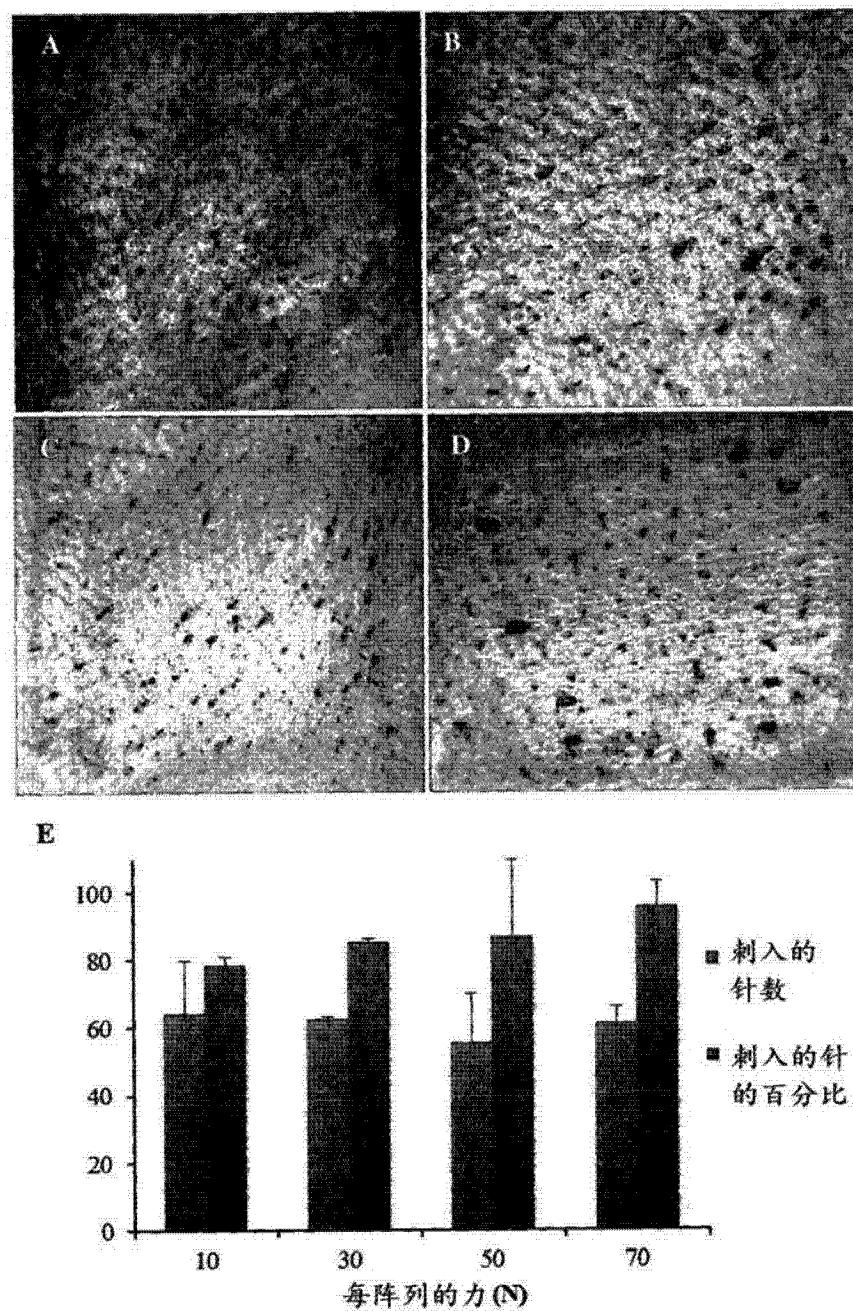


图 19A-E

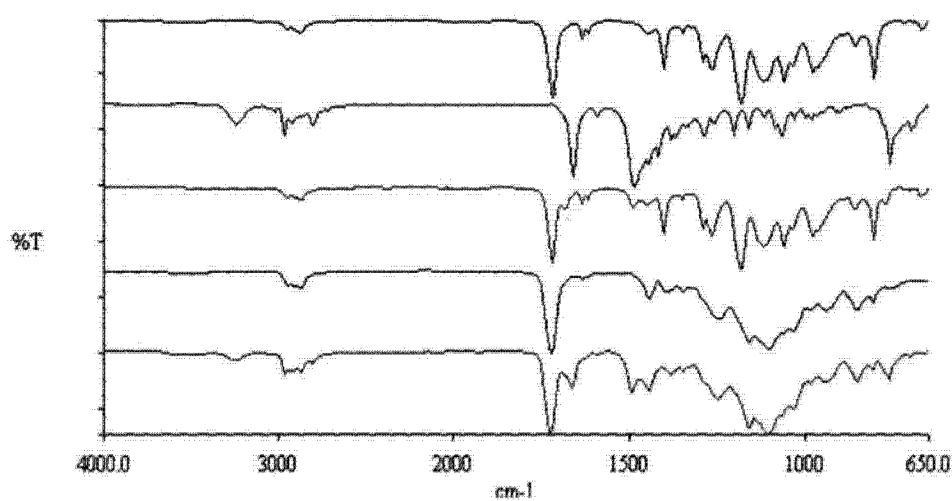
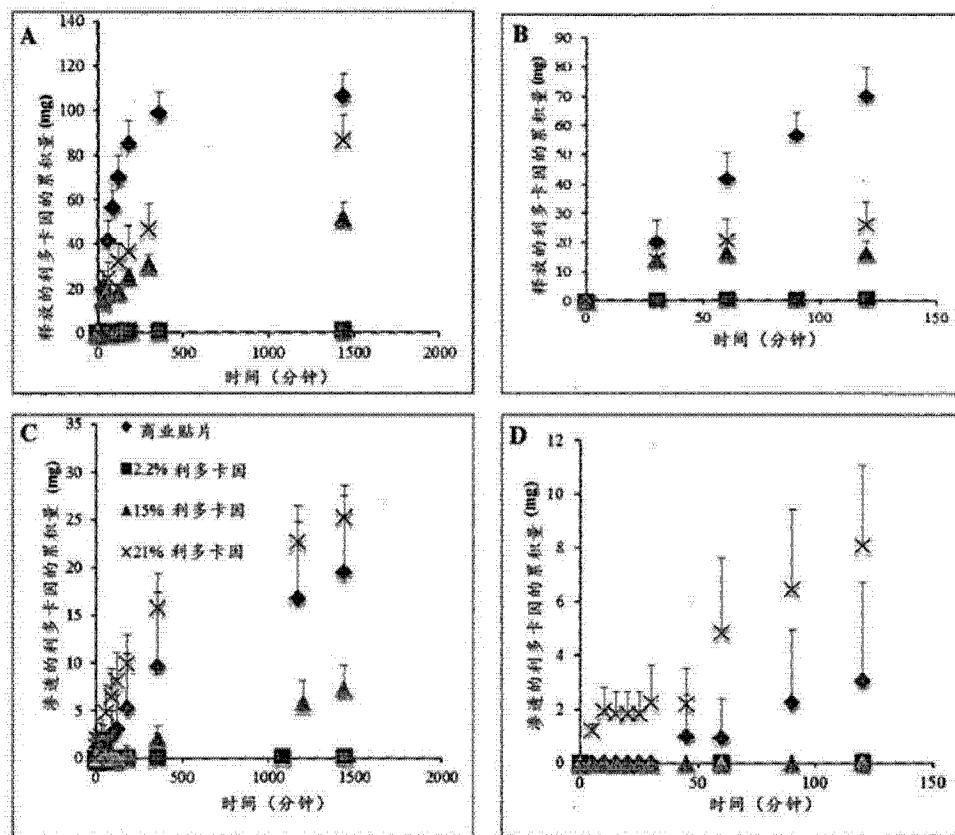


图 21

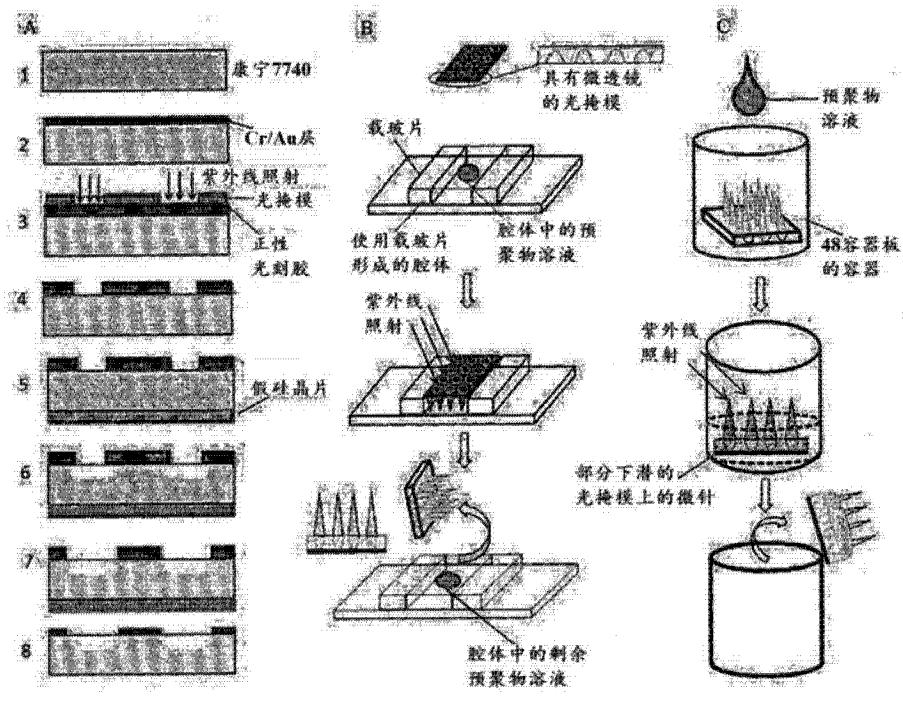


图 22A-C

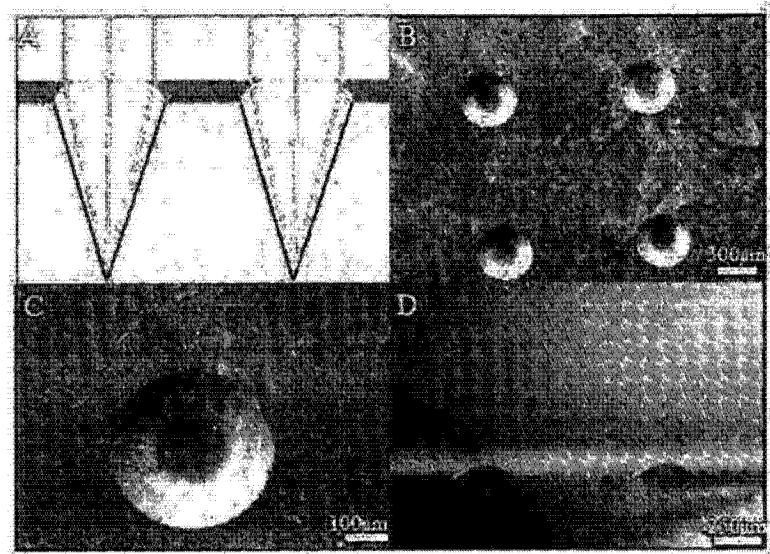


图 23A-D

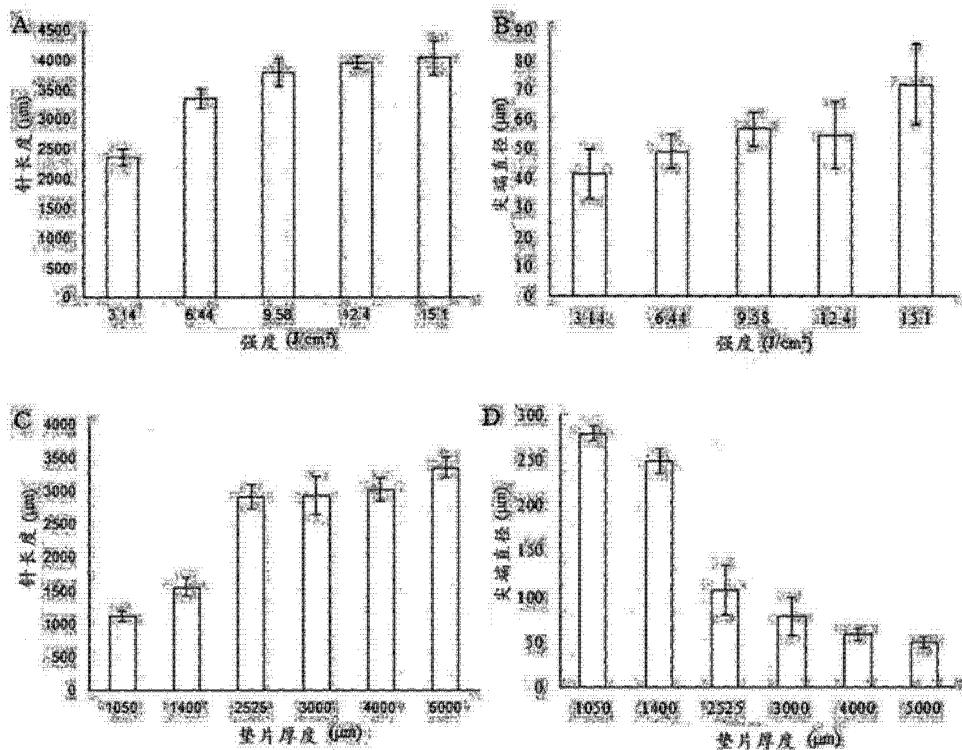


图 24A-D

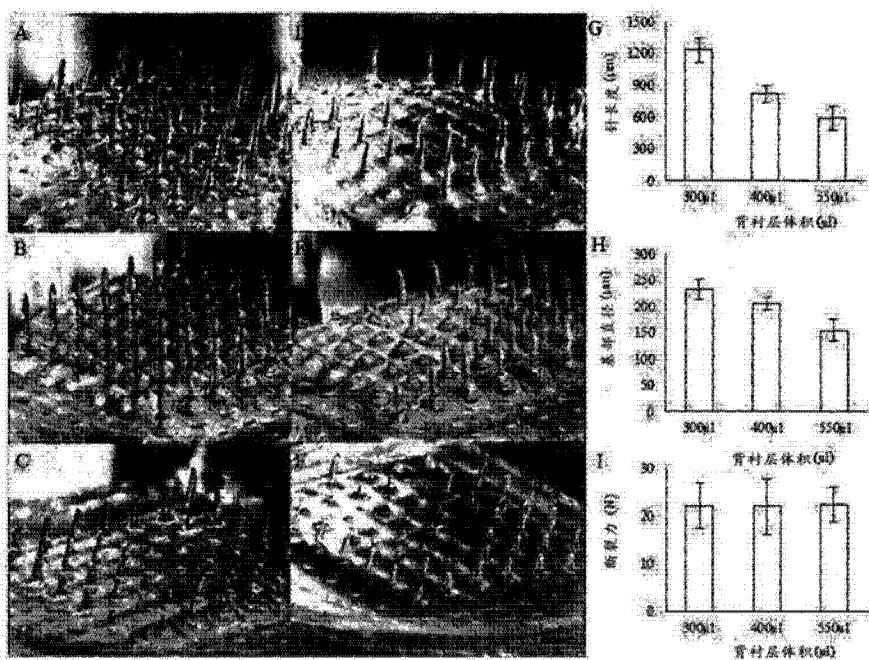


图 25A-I

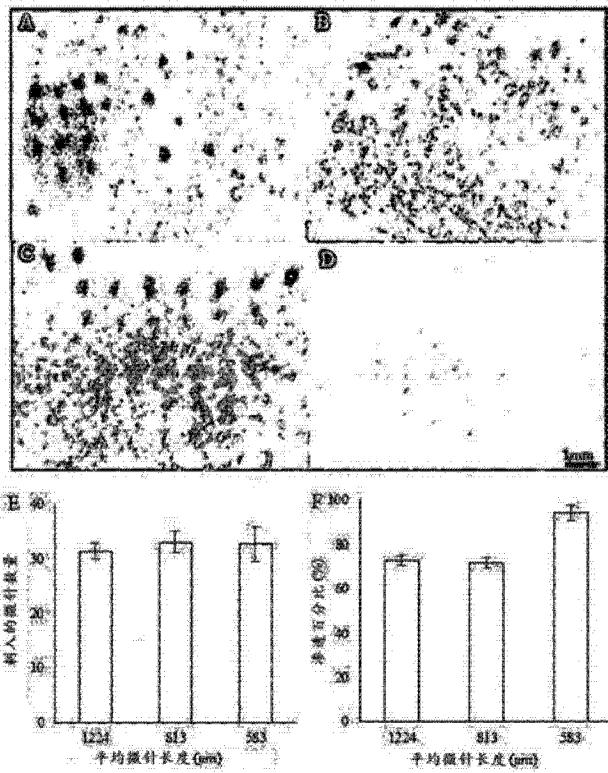


图 26A-F

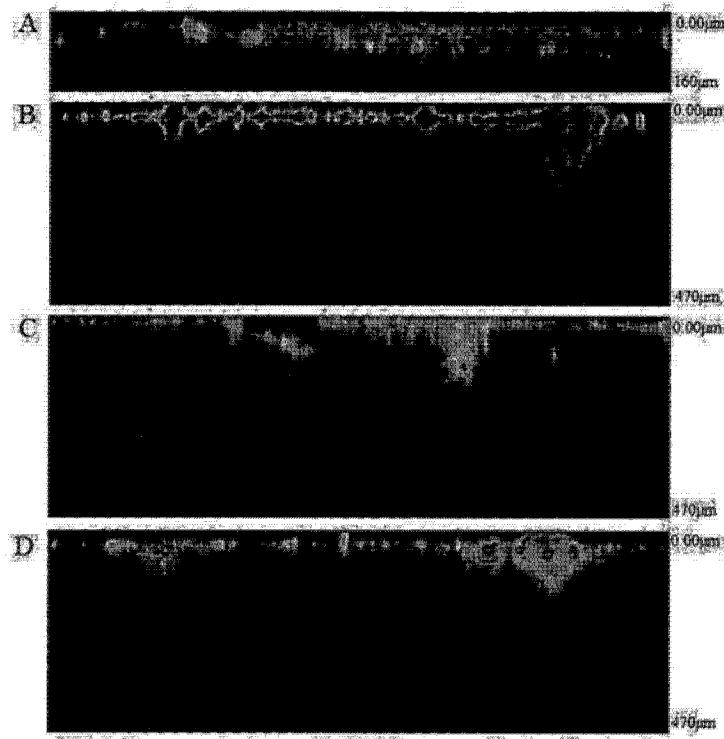


图 27A-D