

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104703651 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380031604. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 05. 01

A61M 37/00(2006. 01)

A61M 5/158(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/641, 209 2012. 05. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/039084 2013. 05. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/166162 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 高等教育联邦系统 - 匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚

申请人 卡内基梅隆大学

(72) 发明人 小 L · D · 法罗 G · 厄尔多斯

O · B · 奥兹多甘拉尔

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

权利要求书3页 说明书24页 附图19页

(54) 发明名称

用于经皮插入的尖端负载的微针阵列

(57) 摘要

一种形成微针阵列的方法，可包括形成含一种或多种生物活性成分的微针阵列。所述微针阵列可包括基底部分和多个从基底部分扩展的微针，并且所述一种或多种生物活性成分以与在基底部分中的浓度相比更高的浓度存在于多个微针中。

1. 用于经皮插入患者中的可溶的微针阵列，其包括：

一种或多种生物活性成分，

基底部分，和

多个从基底部分扩展的微针，其中所述一种或多种生物活性成分以与在基底部分中的浓度相比更高的浓度存在于多个微针中。

2. 权利要求 1 的微针阵列，其中基本上所有的一种或多种生物活性成分位于多个微针中，以至于形成的基底部分基本上不包含任何生物活性成分。

3. 权利要求 2 的微针阵列，其中所述一种或多种生物活性成分在多个微针中是局部集中的，以至于所述一种或多种生物活性成分通常只存在于微针阵列中各微针的上半部分。

4. 权利要求 2 的微针阵列，其中所述多个微针被预制成具有一种形状，所述形状包括位于顶部的第一横截面尺寸、位于底部的第二横截面尺寸以及位于中间部分的第三横截面尺寸，其中所述中间部分位于顶部和底部之间，且所述第三横截面尺寸大于所述第一和第二横截面尺寸。

5. 权利要求 4 的微针阵列，其中所述一种或多种生物活性成分基本上集中于中间部分或其以上的区域。

6. 权利要求 5 的微针阵列，其中各微针通常在中间部分以上逐渐变细成一个点，且各微针通常在中间部分以下逐渐变细成更小的横截面尺寸。

7. 权利要求 2 的微针阵列，其中各微针包含多层的可溶的生物相容材料。

8. 权利要求 7 的微针阵列，其中所述可溶的生物相容材料是羧甲基纤维素。

9. 权利要求 2 的微针阵列，其中所述一种或多种生物活性成分包括至少两种不同的生物活性成分。

10. 权利要求 9 的微针阵列，其中所述至少两种不同的生物活性成分选自用于癌症化学免疫疗法应用的化疗剂、佐剂和化学引诱物。

11. 权利要求 9 的微针阵列，其中所述生物活性成分包括用于疫苗应用的抗原和佐剂。

12. 权利要求 2 的微针阵列，其中所述一种或多种生物活性成分包括至少一种病毒载体。

13. 权利要求 12 的微针阵列，其中所述至少一种病毒载体包括腺病毒载体。

14. 一种制造微针阵列的方法，包括：

将含一种或多种生物活性成分的可溶的生物相容材料的第一溶液施用于微针阵列生产模具；

将不含一种或多种活性成分的可溶的生物相容材料的第二溶液施用于微针阵列生产模具；以及

干燥所述第一和第二溶液以形成实心微针阵列，所述实心微针阵列包括基底部分和多个从基底部分扩展的微针，其中所述一种或多种活性成分基本上集中于多个微针中。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述一种或多种生物活性成分基本上集中于微针阵列中各微针的上半部分。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述第一溶液的一种或多种生物活性成分包括至少一种病毒载体。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述至少一种病毒载体包括腺病毒载体。

18. 一种形成微针阵列的方法,包括:

形成具有多个层的材料板,其中多个层中的至少一层包含至少一种生物活性成分;以及

从所述材料板中除去一些部分直至形成具有基底部分和多个从基底部分扩展的微针的微针阵列,其中所述从板阵列中除去一些部分包括形成微针阵列以至于所述一种或多种生物活性成分集中于微针阵列的各微针中,且所述一种或多种生物活性成分基本上不存在于基底部分。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述形成材料板的方法包括横穿材料板在空间上分布所述至少一种生物活性成分。

20. 权利要求 19 的方法,其中在从所述材料板中除去一些部分以形成微针阵列之前,所述空间上分布的生物活性成分被随后的可溶的生物相容材料层所覆盖。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述第一溶液或悬浮液的至少一种生物活性成分包括至少一种病毒载体。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述至少一种病毒载体包括腺病毒载体。

23. 一种形成微针阵列的方法,包括:

形成一种具有多个层的材料板,其中多个层中的至少一层包括至少一种生物活性成分;以及

微铣削所述材料板以形成微针阵列,所述微针阵列包括基底部分和多个从基底部分扩展的微针,其中所述至少一种生物活性成分集中于微针阵列的各微针中,且所述至少一种生物活性成分基本上不存在于基底部分。

24. 权利要求 23 的方法,其中形成具有多个层的材料板的行为包括:

提供一层羧甲基纤维素的水凝胶以创建基底层,所述基底层具有基本上均匀的厚度;干燥基底层直至所述基底层基本上为固体;

在基底层上提供一个或多个活性层,所述一个或多个活性层具有基本上均匀的厚度且包含羧甲基纤维素的水凝胶和生物活性成分;以及

干燥所述一个或多个活性层直至所述一个或多个活性层基本上为固体。

25. 权利要求 23 的方法,其中微铣削所述材料板的行为包括:

微铣削所述材料板以形成多个通常为锥体状的微针。

26. 权利要求 23 的方法,其中微铣削所述材料板的行为包括:

形成微针阵列,以至于各微针包括位于顶部的第一横截面尺寸、位于底部的第二横截面区域和位于中间部分的第三横截面尺寸,其中所述中间部分位于所述顶部和底部之间,且所述第三横截面尺寸大于所述第一和第二横截面尺寸,其中所述至少一种生物活性成分集中于中间部分或其以上。

27. 权利要求 23 的方法,其中所述至少一种生物活性成分包括两种以上不同的生物活性成分。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述两种以上不同的生物活性成分选自用于癌症化学免疫疗法应用的化疗剂、佐剂和化学引诱物。

29. 权利要求 27 的方法,其中所述两种以上不同的生物活性成分包括用于疫苗应用的至少一种抗原和至少一种佐剂。

30. 权利要求 23 的方法,其中所述至少一种生物活性成分包括至少一种病毒载体。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述至少一种病毒载体包括腺病毒载体。

32. 一种用于将微针阵列递送至靶组织的装置,所述装置包括:

施用器头,其大小与微针阵列啮合以施加通常垂直于微针阵列的结构支撑物平面的力;

电源;

与电源偶联的电磁振荡器;和

与电磁振荡器偶联的振荡器能量转换器,

其中,所述振荡器能量转换器被配置为将由电磁振荡器产生的电磁振荡转换成施用器头的机械运动。

33. 权利要求 32 的装置,其中所述施用器头可移动地与所述装置偶联。

34. 权利要求 32 的装置,其中所述施用器头包括可经受高压灭菌器灭菌的材料。

35. 权利要求 33 的装置,其中所述电源可移动地与所述装置偶联。

36. 权利要求 33 的装置,其中所述电磁振荡器可移动地与所述装置偶联,且被完全封装以允许其进行液体灭菌。

37. 权利要求 33 的装置,其中所述施用器头在通常垂直于微针阵列的结构支撑物平面的平面上移动,且所述施用器头在平行于微针阵列的结构支撑物平面的平面上的移动是基本上受限制的。

用于经皮插入的尖端负载的微针阵列

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 5 月 1 日提交的美国临时申请第 61/641,209 号的优先权，其全部内容通过引用的方式纳入本说明书。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及用于经皮给药的系统和方法，具体而言，涉及用于制造和使用可溶的微针阵列的系统和方法。

[0004] 政府支持的致谢

[0005] 本发明是在美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的资助号 EB012776、AI076060 和 CA121973 下由政府支持而作出的。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0006] 皮肤的显著的物理屏障功能对经皮给药提出了重大挑战。为了应对这种挑战，已开发了各种基于微针阵列的给药装置。例如，一种常规的方法采用不含活性成分的实心或中空的微针阵列。在局部 (topical) 施用生物载体或传统贴片之前，所述微针阵列可通过刺穿角质层和表皮上层而对皮肤进行预处理，从而增强经皮的药物穿透。已表明这种方法能显著增加皮肤的渗透性；然而，这种方法仅提供有限的能力来控制所递送的药物或疫苗的剂量和数量。

[0007] 另一种常规方法是使用表面涂覆有药物的实心微针。尽管这种方法提供稍微更好的剂量控制，但其却大大地限制了所递送的药物的数量。该缺点已限制了这种方法的普遍应用，并且在疫苗应用中，阻止了例如同时递送抗原和 / 或佐剂的结合物的最佳量。

[0008] 另一种常规方法涉及使用连接于生物制品储库的中空微针。这些阵列的注射器针型特征可显著增加递送的速度和精确度，以及所递送的货物 (cargo) 的数量。然而，其复杂的制造步骤和专门的施用装置限制了所述基于储库的微针阵列的适用性。

[0009] 还有一种常规方法涉及使用可生物降解且可溶的实心微针阵列。现有的基于可溶性聚合物的微针的制造方法通常使用微铸造方法。然而，所述常规方法受限于可嵌入阵列中的活性成分，并且由于所述方法要求活性成分被均匀地嵌入微针和它们的支撑结构中，因此，所述常规方法也是浪费的。

[0010] 因此，尽管与普遍的口服和基于针的药物递送方法相比，使用基于微针阵列的装置来经皮递送生物制品提供了引人注目的理论优势，然而，在使用常规方法来构造与微针阵列相关的设计和制造中存在着相当大的实际限制。

发明内容

[0011] 本文所公开的系统和方法包括基于可溶的微针阵列的皮肤递送平台，其可将生物活性分子有效、精确且可再现地递送至人类皮肤。所述微针阵列递送平台可用于将宽范围的生物活性成分递送给患者。

[0012] 所公开的实施方案的前述和其他目的、特征和优势将从以下参考附图进行的详细说明中变得更加明显。

附图说明

- [0013] 图 1 说明示例性的微针及其尺寸。
- [0014] 图 2 说明示例性的微针阵列及其尺寸。
- [0015] 图 3A 和 3B 说明示例性的尖端负载活性成分的微针。
- [0016] 图 4A 和 4B 说明示例性的尖端负载活性成分的微针。
- [0017] 图 5A 和 5B 说明示例性的尖端负载活性成分的微针。
- [0018] 图 6A 和 6B 说明示例性的尖端负载活性成分的微针。
- [0019] 图 7 说明用于制造微针母模的微型精密 - 微铣削系统。
- [0020] 图 8 是具有锥体状针的微铣削母模的 SEM 图像。
- [0021] 图 9 是锥体状生产模具的 SEM 图像。
- [0022] 图 10 是生产模具放大部分的 SEM 图像, 图像中央显示锥体状针模塑井。
- [0023] 图 11A 至 11D 说明示例性的 CMC- 实体和嵌入的活性成分。
- [0024] 图 12A 至 12B 说明示例性的 CMC- 实体和嵌入的活性成分。
- [0025] 图 13 是示例性的垂直多层沉积结构及制备所述结构的方法的示意图。
- [0026] 图 14 是使用嵌入的活性成分的分层和空间分布技术制造的示例性微针阵列的示意图。
- [0027] 图 15 是以空间上受控的方式制造的示例性微针阵列的示意图。
- [0028] 图 16A 是多个锥体状模塑的微针的 SEM 图像。
- [0029] 图 16B 是单个锥体状模塑的微针的 SEM 图像。
- [0030] 图 17 是柱状模塑的微针的 SEM 图像。
- [0031] 图 18 是锥体状模塑的微针的显微照片。
- [0032] 图 19 是柱状模塑的微针的显微照片。
- [0033] 图 20 说明可使用微铣削的母模或通过材料块的直接微铣削而形成的各种微针的几何形状。
- [0034] 图 21 说明用于进行破坏和穿刺试验的试验装置。
- [0035] 图 22 说明柱状微针 (左) 和锥体状微针 (右) 的力 - 位移曲线。
- [0036] 图 23 说明用于柱状微针 (左) 和锥体状微针 (右) 的微针偏转的有限要素模型。
- [0037] 图 24 显示锥体状 (A、C、E) 和柱状 (B、D、F) 微针刺入皮肤外植体的各种立体显微照片。
- [0038] 图 25A、25B 和 25C 说明微针阵列刺入皮肤外植体的效力。
- [0039] 图 26A 和 26B 说明微粒体内递送至微针阵列免疫的小鼠的皮肤引流淋巴结。
- [0040] 图 27 是显示微针递送的模型抗原的免疫原性的条形图。
- [0041] 图 28 是显示 CMC- 微针阵列的活性货物在储存中的稳定性的条形图。
- [0042] 图 29A 和 29B 显示在已通过微针阵列递送 **Cytoxan®** (环磷酰胺) 的表皮细胞中细胞凋亡的诱导。
- [0043] 图 30 说明可通过材料块的直接微铣削而形成的微针的几何形状。

- [0044] 图 31 是直接制造的实心 CMC- 微针阵列的立体显微图像。
- [0045] 图 32 是图 31 的微针阵列的一部分的立体显微图像。
- [0046] 图 33 是用于产生直接微铣削用的材料块或材料板的铸塑模具组件的横截面示意图。
- [0047] 图 34 是可用于干燥直接微铣削用的材料块或材料板的干燥装置的横截面示意图。
- [0048] 图 35 是表达 GFP 的靶向 293T 细胞的流式细胞仪分析。
- [0049] 图 36 说明在储存若干天后, 嵌入微针的病毒的稳定性。
- [0050] 图 37 说明经微针阵列递送的腺病毒载体的表达和免疫原性。
- [0051] 图 38 说明用于将微针插入靶组织的施用器。
- [0052] 图 39 说明与图 38 所示的施用器一起使用的施用器头部设计。
- [0053] 图 40 是施用器头部的三维移动的示意图。

具体实施方式

[0054] 下面的描述本质上是示例性的, 并且不意欲以任何方式限制所公开的实施方案的范围、适用性或布局。在不偏离本公开内容的范围的情况下, 可在本文所描述的要素的功能和排列方面作出对所描述的实施方案的各种变化。

[0055] 除非上下文中另有清楚地指示, 在此申请和权利要求中所使用的单数形式“一”、“一个”和“所述 (the)”包括复数形式。此外, 术语“包括 (includes)”意味着“包含 (comprises)”。本文中所用的术语“生物制品 (biologic)”、“活性成分”、“生物活性成分”、“生物活性材料”或“货物 (cargo)”是指药物活性剂, 例如止痛剂、麻醉剂、抗哮喘药、抗生素、抗抑郁剂、抗糖尿病药、抗真菌剂、抗高血压药、抗炎药、抗肿瘤药、抗焦虑药、酶促活性剂、核酸构建体、免疫促进剂、免疫抑制剂、疫苗等。所述生物活性材料可包括可溶性材料、不溶但可分散的材料、天然的或配制的大的、小的和纳米微粒, 和 / 或两种以上的可溶性材料、可分散的不溶材料和天然的和 / 或配制的大的、小的和纳米微粒的混合物。

[0056] 如本文所使用的, 术语“预形成”意味着在使用前将一种结构或要素制成、构成和 / 或形成特定的形状或构型 (configuration)。因此, 预形成的微针阵列的形状或构型是指在将微针阵列中的一个或多个微针插入患者之前的微针阵列的形状或构型。

[0057] 尽管所公开的方法的示例性实施方案的操作可能是以特定的连续顺序描述以方便描述, 但应理解, 所公开的实施方案可包含除所公开的特定的连续顺序之外的操作顺序。例如, 在某些情况下, 连续描述的操作可重新排布或同时进行。另外, 所提供的与一个特定实施方案相关的说明和公开内容不局限于那个实施方案, 可用于所公开的任何一个实施方案。

[0058] 此外, 简单起见, 附图可能不显示各种方式 (基于本公开内容, 对本领域普通技术人员而言是容易识别的), 其中所公开的系统、方法和装置可与其他的系统、方法和装置结合使用。此外, 本说明书有时使用诸如“产生”和“提供”的术语来描述所公开的方法。这些术语是可执行的实际操作的高度概括。与这些术语相应的实际操作可根据具体的执行而变化, 并且基于本公开内容, 所述实际操作对本领域普通技术人员而言是容易识别的。

[0059] 尖端负载的微针阵列

[0060] 可溶的微针阵列使得能够有效且安全地将药物和疫苗递送至皮肤和粘膜表面。然而,常规的微针阵列制造的同质性可导致低效的药物递送。尽管通常将待递送至患者的药物或其他货物纳入整个微针阵列基质中,但实际上,只有微针进入皮肤,因此,只有各针的容积中所包含的货物是可递送的。因此,位于非针组件(例如阵列的支撑结构)中的绝大部分药物或其他货物从未被递送至患者,通常作为废物丢弃。

[0061] 图1和2说明微针和微针阵列的示例性尺寸。基于图1和2所示的例证性大小,包含均匀分布在整个阵列中的活性组分的微针阵列显示大于40%的活性成分浪费。例如,如果阵列的整个面积为 61mm^2 且微针阵列的面积为 36mm^2 ,则活性成分的利用百分数小于60%。尽管图1和2所反映的尺寸说明特定大小的阵列和微针形状,但应理解,不管阵列的大小或所涉及的微针形状如何,在任何其他大小的微针阵列(其中,活性成分均匀分布于整个阵列中)中存在类似的浪费。

[0062] 本文所描述的系统和方法提供新颖的微针阵列制造技术,其利用完全可溶的微针阵列基板和独特的微针几何形状,从而能有效地递送宽范围的活性成分,包括宽范围的蛋白质和/或小分子药物和疫苗。

[0063] 如本文更详细地描述的,在一些实施方案中,这种技术还可独特地使得能够同时共递送多种化学上不同的药剂用于多功能药物递送。这些装置的实用性的实例包括,例如,(1)同时递送多种抗原和佐剂以产生与传染性疾病的预防和癌症治疗有关的多价免疫应答,(2)共递送化疗剂、免疫刺激物、佐剂和抗原以使得能够同时辅助肿瘤治疗,和(3)无需全身暴露而局部皮肤递送多种治疗剂以治疗各种皮肤疾病。

[0064] 在一些实施方案中,本文所公开的系统和方法涉及一种新颖的制造技术,其使得能够将各种活性成分纳入针尖端。因此,通过这种方式使活性成分局部化,可使用非活性且通常被认为安全的较廉价的基质材料来制备微针阵列容积的剩余部分。最终结果是基于以下原因而大大地改善了药物递送的效率:(1)降低了纳入微针阵列的非针部分的不可递送的活性成分的浪费,以及(2)在穿透皮肤的针尖端中有更高的药物浓度。这种技术进步导致显著地改善了与药物货物成本成比例的经济可行性,并增加了这些新颖微针阵列中每针的有效货物递送能力。

[0065] 图3A、3B、4A和4B说明微针阵列的各种实施方案,其中活性成分集中于各阵列的微针尖端。因此,与常规微针阵列相比,由于很少或没有活性成分存在于支撑基础结构中,因此,活性成分不以相同的浓度存在于整个微针阵列中。此外,在一些实施方案中(例如,如图3A、3B、4A和4B所示),不仅很少或没有活性成分存在于支撑结构中,而且活性成分的位置集中于阵列中各微针的上半部分。

[0066] 图5A和5B说明微针阵列中微针的示例性图像,所述微针阵列包含集中于各微针上半部分的活性成分。所述活性成分以集中于微针尖端的荧光颗粒形式示出,其中尖端被定义为以变窄和/或逐渐变细的方式自基底部分扩展的微针区域。反过来,基底部分自阵列的支撑结构扩展。

[0067] 图6A和6B说明微针阵列中微针的另外的示例性图像,所述微针阵列包含集中于各微针上半部分的活性成分。在图6A中,集中于微针尖端的活性成分是BSA-FITC。在图6B中,同样集中于微针尖端的活性成分是OVA-FITC。

[0068] 如上所述,在一些实施方案中,各微针可仅在微针的上半部分包含活性成分。在其

他实施方案中,各微针可仅在尖端或邻近微针尖端的变窄部分中包含活性成分。在其他实施方案中,各微针可在自支撑结构扩展的整个微针部分包含活性成分。

[0069] 下面的实施方案描述了制造微针阵列的各种示例性方法,其中在各微针阵列中,一种或多种活性成分集中于微针的上半部分和 / 或尖端。

[0070] 通过连续的微模塑和旋转干燥方法制造的微针阵列

[0071] 下列步骤描述了使用连续的微模塑和旋转干燥而制造微针阵列的示例性方法。可在相容的溶剂中以期望的有用浓度配制活性成分 / 货物。如本文所描述的,活性成分的溶剂可以是货物特异性的,并且可包含宽范围的液体,包括例如水、有机极性和 / 或非极性液体。活性成分的实例将在下面更详细地讨论,并且关于这些活性成分的各种信息,包括各种微针阵列的测试的和最大的负载能力也将在下面更详细地讨论。

[0072] 如果需要,可进行多个负载周期以实现具体应用所必需的更高的活性货物负载。此外,多种活性货物可作为复合溶液在单个负载周期中加载,或根据各种货物的特殊货物相容性需求而作为单一溶液在多个周期(例如重复下面所述的负载周期)中加载。同样,可将微粒货物(包括具有纳米和微米大小的几何形状的那些)以需要的颗粒数目 / 体积密度制成悬浮液。

[0073] 实施例 1

[0074] a) 如下面在微铣削实施方案中更详细描述的,可将活性货物的工作储备溶液 / 悬浮液以例如每 cm^2 表面积约 $40 \mu\text{l}$ 的量施用于微针阵列生产模具的表面。

[0075] b) 可将含有活性货物的微针阵列生产模具在 4500rpm 下离心 10 分钟以采用工作货物储备液填充微针阵列生产模具针。

[0076] c) 可除去过量的货物溶液 / 悬浮液,并将微针阵列生产模具的表面用 $100 \mu\text{l}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) / cm^2 模具表面积洗涤,或用制备活性货物工作储备液所用的溶剂进行洗涤。

[0077] d) 将针腔中含有活性货物储备溶液 / 悬浮液的微针阵列生产模具在 3500rpm 和所需温度下旋转干燥 30 分钟,其中使清洗气流以 $0\text{--}501/\text{min}$ 的速率持续穿过离心机以有助于干燥的活性货物集中于针尖端。所述清洗气体可通过管状入口引入离心室。可使用调节至所需温度的干燥器降低含水量并使之再循环至离心室。所述清洗气体可以是空气、氮气、二氧化碳或特定货物所需的另一种惰性或活性气体。通过流量计测量流速,并通过循环泵装置控制流速。

[0078] e) 可按每 cm^2 微针阵列生产模具面积 $100 \mu\text{l}$ 的 20% 的 CMC90 水凝胶水溶液加至微针阵列生产模具表面以加载微针阵列装置的结构组件。

[0079] f) 可将所述微针阵列生产模具在 4500rpm 和所需温度下离心 10 分钟,在离心室中无需清洗气体交换,以使微针阵列生产模具的针腔充满 CMC90 水凝胶。之后可保温 30 分钟,以使之前沉积于微针阵列尖端的活性货物能再水化。

[0080] g) 将微针阵列生产模具在 3500rpm 和所需温度下离心 3 小时或更长时间,使 0 至 $501/\text{min}$ 的恒定清洗气流穿过离心室,以将 MNA 装置旋转干燥至含水量小于 5%。

[0081] h) 之后,可将干燥的微针阵列装置从微针阵列生产模具中分离并在所需的条件下储存。在一些实施方案中,可将基于 CMC90 的装置在约 50°C 至 -86°C 之间储存。

[0082] 所制造的携带尖端负载的活性货物的微针阵列的实例可在图 3A 至 6B 中示出。

[0083] 微铣削的母模和旋转模塑的微针阵列

[0084] 在下面的实施方案中,可进行微铣削步骤以制造各种规格的微针阵列。然而,应理解,下面的实施方案描述了微针阵列制造的某些细节,所述细节可应用于不包括微铣削步骤的微针阵列制造的方法,包括在之前实施例中如上所描述的方法。

[0085] 在下面的实施方案中,描述了用于制造可溶的微针阵列的装置和方法,其使用通过微铣削技术形成的母模。例如,可基于母模(正)至生产模具(负)至阵列(正)的方法而制造微针阵列。事实上,微铣削技术可用于在任何类型的材料(包括金属、聚合物和陶瓷部分)上产生各种微观几何形状。各种形状和结构的微铣削的母模可有效地用于产生多个相同的凹形生产模具。之后,所述凹形生产模具可用于微铸塑各种微针阵列。

[0086] 图7说明可用于制造微针母模的精密-微铣削系统的实例。机械微铣削使用位于计算机精密控制的微型机床平台内的微观(例如,像 $10\text{ }\mu\text{m}$ 那样小)铣削工具。所述系统可包括显微镜以观察正在被微型工具切割的工件的表面。微型工具可以超高速度($200,000\text{ rpm}$)旋转来切割工件以产生所需的形状。如上所述,可将微铣削方法用于在多种材料上产生复杂的几何特征。在微铣削过程中,可使用各种类型的工具,包括例如碳化物微型工具。然而,在一个优选实施方案中,可使用金刚石工具以在母模上制造微针阵列。与其他类型的工具相比,金刚石工具可为优选的,因为它比常规材料(如碳化物)更硬,并且可在工件表面上提供更干净的切口。

[0087] 可从各种材料中微铣削出母模,所述材料包括例如在示例性实施方案中描述的母模材料**Cirlex®**(DuPont, **Kapton®**聚酰亚胺)。母模可用于从合适的材料——如下面的示例性实施方案中所描述的生产材料**SYLGARD® 184**(Dow Corning)——中制造柔性生产模具。所述母模理想地由一种能够再使用的材料形成,从而使得单一母模可重复使用以制造大量的生产模具。类似地,每种生产模具理想地能够制造多种微针阵列。

[0088] 使用微铣削技术可相对快地生产母模。例如,包含具有100个微针的 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 阵列的母模可只花费小于两个小时的时间进行微铣削,在一些实施方案中,小于约30分钟。因此,短的等候时间使得能够快速制造不同的几何形状,这允许微针阵列快速发展,并还有助于各种微针参数的实验和研究。

[0089] 优选母模材料能够从生产模具材料中干净地分离,并优选能够经受任何高的固化温度,而所述高的固化温度对于固化生产模具材料可能是必需的。例如,在一个说明性实施方案中,基于硅酮的化合物**SYLGARD® 184**(Dow Corning)是生产模具材料,该材料通常需要约80至90摄氏度的固化温度。

[0090] 可将母模创建成各种大小。例如,在一个示例性实施方案中,母模是在 1.8mm 厚的**Cirlex®**(DuPont, **Kapton®**聚酰亚胺)和 5.0mm 厚的丙烯酸板(sheets)上制造的。可首先通过微铣削工具将各板压平,并使待创建微针的位置可从表面的其余部分中凸起。可将微型工具与数字控制的微铣削机器(图1)结合使用以产生微针特征(例如,由母模所定义的)。以这种方式,微铣削方法可完全控制微针的尺寸、锐度和空间分布。

[0091] 图8是来自扫描电镜(SEM)的图像,其显示具有多个锥体状针的微铣削母模的结构。如图8所示,可在母模的微针阵列周围形成圆形凹槽,以在生产模具中产生环形(例如圆形)的壁部分。生产模具中的所述圆形壁部分可有助于下面讨论的旋转铸塑过程。尽管图9所示的壁部分和图8所示的各个母模结构都是圆形的,但应理解可提供其他几何形状

的壁部分或安全壳 (containment means)。例如,取决于微针阵列装置所需的形状,可以各种形状——包括例如正方形、矩形、梯形、多边形或各种不规则形状——形成安全壳。

[0092] 如上所讨论的,可由 **SYLGARD®** 184(Dow Corning) 制备生产模具,所述 **SYLGARD®** 184 为双组分的完全可固化的硅酮弹性体,可以 **SYLGARD®** 与固化剂 10 : 1 的比例混合。将该混合物脱气约 10 分钟并倾倒在母模上以形成约 8mm 的层,之后再次脱气约 30 分钟并在 85℃ 固化 45 分钟。冷却至室温后,可将母模从固化的硅酮中分离,并且该硅酮生产模具对围绕阵列的圆形壁部分的边缘进行了修整(图 9)。从单个母模中可制造大量的生产模具(例如 100 个或更多),具有 **Cirlex®** 或丙烯酸母模的非常小的——如果有的话——可见的劣化。

[0093] 图 9 是如上描述的所创建的锥体状生产模具的 SEM 图像。图 10 在图像中央显示为具有锥体状针模塑井的生产模具的放大部分。该模塑井被构造为接收基础材料(和添加至基础材料中的任何成分)以形成具有由模塑井所限定的外部形状的微针。

[0094] 为了构造微针阵列,可使用基础材料以形成各微针的含有生物活性成分的部分以及不含生物活性成分的部分。如上面所讨论的,各微针可仅在微针中包含生物活性成分,或在一些实施方案中,仅在微针的上半部分中包含生物活性成分,或在其他的实施方案中,仅在逐渐变细接近尖端的微针部分中包含生物活性成分。因此,为了控制生物活性成分的递送并控制微针阵列的成本,各微针优选具有含生物活性成分的部分和不含生物活性成分的部分。在本文所描述的实施方案中,不含生物活性成分的部分包括微针阵列的支撑结构,以及在一些实施方案中,阵列中各微针的基底部分(例如下半部分)。

[0095] 可将各种材料用作微针阵列的基础材料。可生物降解的实心微针的结构基板最常见地包括基于聚(乳酸-乙醇酸)(PLGA)或羧甲基纤维素(CMC)的配方;然而,可使用其他的基础材料。

[0096] CMC 通常较 PLGA 更优选作为本文所描述的微针阵列的基础材料。由于制造所需的相对高的温度(例如 135 摄氏度或更高)和真空度,基于 PLGA 的装置可限制药物递送和疫苗施用。与之相比,基于 CMC 的基质可在简单的旋转铸塑和干燥过程中于室温下形成,使得 CMC- 微针阵列更理想地纳入敏感的生物制品、肽、蛋白质、核酸和其他各种生物活性成分。

[0097] 可在无菌 dH₂O 中,从含或不含活性成分(如下面所描述的)的 CMC 低粘度钠盐制备 CMC- 水凝胶。在示例性实施方案中,可将 CMC 与无菌蒸馏水(dH₂O)和活性成分混合以达到约 25 重量% 的 CMC 浓度。可将所得混合物搅拌均匀并在约 4 摄氏度下平衡 24 小时。在这期间,CMC 和任何其他成分可被水合并形成水凝胶。可将所述水凝胶真空脱气约 1 小时并在约 20,000g 下离心 1 小时以除去残留的微米级气泡,所述气泡可干扰 CMC- 微针阵列的旋转铸塑 / 干燥过程。可通过将部分(10g)所述水凝胶在 85 摄氏度干燥约 72 小时来测试其干物质含量。即用的 CMC- 水凝胶理想地在使用前储存在约 4 摄氏度下。

[0098] 可在旋转铸塑过程之前,将活性成分以相对高(20-30%)的 CMC- 干生物制品重量比纳入 CMC 水凝胶。可将阵列在室温下旋转铸塑,使得所述过程与结构上宽泛范围的生物活性成分的功能稳定性相容。由于母模和生产模具可重复用于大量制造周期,因此可大大降低制造成本。所得的脱水 CMC- 微针阵列在室温或稍低的温度(例如约 4 摄氏度)下通常是稳定的,并且可保持所纳入的生物制品的活性,有利于简单、低成本的储存和分配。

[0099] 在一个示例性实施方案中,可将生产模具的表面用约 50 μ l(对直径为 11mm 的模具而言)的 CMC- 水凝胶覆盖,并通过在 2,500g 下离心约 5 分钟而旋转铸塑。在最初的 CMC- 水凝胶层之后,可在模具上层积另外 50 μ l 的 CMC- 水凝胶,并在 2,500g 下离心约 4 小时。在干燥过程结束时,可从模具中分离 CMC- 微针阵列,修整边缘上多余的材料,收集并储存在约 4 摄氏度下。可将所述生产模具清洁并重复用于微针阵列的其他铸塑中。

[0100] 在一些实施方案中,可用不含活性成分的层和含活性成分的层形成 CMC- 固体。图 11A-D 说明不同形状的 CMC- 固体(图 11A 和 11B),并在上层嵌入活性货物,所述上层在微铣削后变成含活性成分的微针部分。图 11C 说明在含非活性成分层的表面上层积的微米大小的荧光颗粒,图 11D 说明在含非活性成分层的表面上层积的甲苯胺蓝实例。

[0101] 图 12A 和 12B 也说明不同形状的 CMC- 固体,其中图 12B 显示正方形,图 12B 显示矩形。两种 CMC 固体均可被铣削成用于本文所描述的进一步加工的尺寸。应理解,本文所显示的几何形状和活性货物不意欲受限于示例性的实施方案。

[0102] 实施例 2

[0103] 可用所定义的几何形状和在已制备的结构的一层或多层中的活性货物内容物制备 CMC- 固体。本文中将更详细地描述整合于 CMC- 固体中的活性货物的实例。在构建在 CMC- 固体的至少一层中包含嵌入的活性货物的 CMC- 固体时,可将所述 CMC- 固体铣削成工程特定的尺寸,并微铣削以制造本文所描述的微针装置。

[0104] 实施例 3

[0105] 在另一实施方案中,可将一层或多层活性货物嵌入 CMC- 固体中以直接微铣削微针阵列。图 13 说明用于 MNA 装置的直接微铣削的 CMC- 固体上的垂直多层沉积和活性货物 CMC 嵌入的样品代表。

[0106] 在一个示例性方法中,可通过制备具有所定义的几何形状而其中不含任何活性货物的 CMC- 固体来制造微针阵列。之后,可将空白 CMC- 固体铣削成所需的尺寸。

[0107] 如图 13 所示,为了包含活性货物,特别是在微铣削的 MNA 装置的尖端中包含活性货物,可将活性货物按工程特定的几何图案沉积于 CMC- 固体上。

[0108] 将活性货物沉积于空白 CMC- 固体上的方法可包括,例如:

[0109] 1) 采用微嘴辅助的液滴沉积进行直接印制。

[0110] 2) 从预印制的基质中转移。

[0111] 3) 采用计算机控制的机器人系统进行液滴沉积。

[0112] 图 14 说明 CMC- 固体块中所嵌入的活性货物的分层和空间分布。在第一层沉积(A)后,其可用 CMC 层覆盖(B),所述 CMC 层(B)为随后的活性货物(C)沉积提供表面。可重复此过程直至所有期望的层都已沉积并包封在适用于微铣削过程(D-F)的固体 CMC- 块中。

[0113] 图 15 说明以空间上受控的方式包封活性货物沉积物的 CMC- 块(A)的横截面示意图。所述方法在 MNA- 装置微铣削(B)之后,允许活性成分的三维控制和布局。在图 15 的面板(B)中,活性货物的布局显示在活性货物的主干中;然而,通过控制铣削过程,可从微针的尖端至基底的垂直方向上控制所述布局。各颜色代表不同的活性成分或相同材料的不同量 / 浓度。

[0114] 因此,通过在 CMC- 固体表面上连续地沉积彼此接触或被 CMC 层分隔的一种或多种活性货物,而提供活性货物在微针中垂直层压沉积的方法。在一些实施方案中,活性货物的

水平方式沉积可导致货物的空间分隔。通过将活性货物沉积的垂直和水平方式相结合, 可实现每种所限定的活性成分的三维递送和分布, 进而降低在制造微针阵列期间活性成分的浪费。

[0115] 微针整合的腺病毒载体

[0116] 下面的实施方案涉及可溶的微针阵列, 例如本文所描述的将传染性病毒载体纳入微针阵列的可溶基质中的那些。使用这种技术, 首次可将活病毒载体纳入微针阵列中。如本文所描述的, 将病毒载体纳入所公开的微针阵列中可稳定病毒载体, 使其在纳入之后以及在延长的储存时间后保持它们的传染力。将纳入微针阵列的腺病毒载体 (MIAs) 施用于皮肤导致皮肤细胞的转染。在疫苗背景中, 我们已证明编码 HIV 抗原的 MIAs 的皮肤施用导致有效的 HIV 特异性免疫应答。这些结果将在下面的实例中更详细地描述。

[0117] 实施例 4

[0118] 本文所描述的整合入微针的腺病毒载体的制备方法保持腺病毒颗粒在制备和干燥储存期间的生存力。基于 CMC 微针阵列的物理和化学性质, 特别设计了这些步骤。CMC 微针阵列中的病毒生存力是通过下列步骤实现的:

[0119] - 包含终浓度为 2.5% 的低粘度羧甲基纤维素 (CMC90) (步骤 2), 以及

[0120] - 通过定时和控制温度的旋转干燥而浓缩微针阵列装置尖端中的腺病毒颗粒 (步骤 6)。

[0121] - 对针尖端负载的腺病毒颗粒进行受控的部分再水化 (步骤 8)。

[0122] 整合入尖端负载的微针的腺病毒载体 (MIAs) 的制备:

[0123] 1) 将腺病毒颗粒以 2×10^9 颗粒 /ml 的密度再悬浮于海藻糖储存缓冲液 (5% 海藻糖 Sigma-Aldrich USA, pH 为 7.8 的 20mM 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、75mM NaCl、2mM MgCl₂、0.025% 的吐温 80) 中

[0124] 2) 将再悬浮的病毒储备液与等体积的于海藻糖储存缓冲液中配制的 5% CMC90 混合, 得到密度为 1×10^9 颗粒 /ml 的腺病毒工作储备液。

[0125] 3) 以 $40 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 表面积的量将腺病毒工作储备悬浮液添加至微针阵列生产模具的表面 (如本文其他实施方案中详细描述的)。

[0126] 4) 将模具在 4500rpm 和 22°C 下离心 10 分钟以向针尖中填充腺病毒工作储备液。

[0127] 5) 除去过量的病毒储备液, 并用每 cm^2 模具表面积 $100 \mu\text{l}$ 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液洗涤模具表面。

[0128] 6) 将仅在针腔中含有腺病毒储备液的微针阵列模具在 3500rpm 和 22°C 下局部旋转干燥 10 分钟。

[0129] 7) 以每 cm^2 的模具面积, 将 $100 \mu\text{l}$ 于水中的 20% 结构上不含货物的 CMC90 水凝胶添加至微针阵列模具表面以形成 MIA 装置的结构。

[0130] 8) 在 4500rpm 和 22°C 下离心 10 分钟以使针腔中填满 20% 的 CMC90, 并保温 30 分钟以使得尖端中干燥的腺病毒颗粒再水化 (上述步骤 3 至 6)。

[0131] 9) 通过离心将 MIA 装置旋转干燥至含水量小于 5%, 所述条件为在 3500rpm 和 22°C 下 3 小时并使 101/min 的恒定气流穿过离心室。

[0132] 10) 使干燥的 MIA 装置脱模并在 4°C 或 -80°C 下储存。

[0133] 实施例 5

[0134] 我们已评价了纳入 MNA 的重组腺病毒颗粒的效能和稳定性。将 Ad5. EGFP 纳入 CMC 水凝胶 MNAs 中以制备含 1010 病毒颗粒 /MNA 的终产品。同样地制备不含病毒的对照空白 MNA。将各批次的 Ad5. EGFP 和对照 MNA 在室温、4℃ 和 -86℃ 下储存，并在传染性试验中评价病毒稳定性。使用 293T 细胞体外评价了纳入 MNA 的 Ad5. EGFP 病毒的特异转导活性。将细胞以 2×10^6 / 孔置于六孔板中，并平行两份地用稀释的病毒悬浮液、悬浮液 + 在室温、4℃ 和 -86℃ 下储存了指定时间段的空白 MNA (对照) 或 Ad5. EGFP MNA 进行转导。作为阴性对照，包括未转导的孔。24 小时后，通过流式细胞仪分析原始细胞群体的 GFP 表达 (代表性直方图在图 35 中示出)。

[0135] 如图 35 所示，将 Ad5. EGFP 纳入 MNA 中不降低转导效率。与未转染的对照细胞相比，靶 293T 细胞在采用于悬浮液或纳入 CMC- 贴片 (patches) 中的相同效价的 Ad5. EGFP 转导 24 小时后 GFP 表达的流式细胞仪分析。图 36 显示嵌入 MNA 的 Ad5. EGFP 病毒的稳定性。GFP 基因表达通过流式细胞仪进行分析，如图 37，并归一化至 -86℃ 保存的 Ad5. EGFP 悬浮液的感染效率。

[0136] 已发现，使用 MNA Ad5. EGFP 病毒的感染效率是 $87.92 \pm 4.5\%$ ，其与在传统的 -86℃ 保存的 Ad5. EGFP 悬浮液所观察到的类似 (图 35 和 36)，表明制备方法未对 Ad-EGFP 病毒颗粒的转导效率产生不利影响。为评价传染力随时间的变化，比较了新鲜制备的 -86℃ 保存的 Ad5. EGFP 悬浮液与在室温、4℃ 或 -86℃ 下长时间储存的纳入 MNA 的 Ad5. EGFP 的转染效率。报告了储存期最长达 365 天的传染力 (归一化至 Ad5. EGFP 悬浮液 + 空白 CMC- 贴片) (图 36)。这些结果表明在 4℃ 或 -86℃ 下储存的 MNAAd5. EGFP 的传染性是非常稳定的，在室温下储存最长达 30 天是稍微稳定的。

[0137] 这些结果证明微针阵列递送的 Ad 转基因是在皮肤中表达的，并引起有效的细胞免疫应答。为具体评价体内的基因表达，我们在传统的皮内注射 (I. D.) 或微针阵列介导的皮内递送之后，确定了皮肤中的 GFP 表达。我们通过 ID 注射递送或经由单个微针阵列施用局部递送 108Ad5. GFP 病毒颗粒 (图 37)。48 小时后收集皮肤，将其冷冻切片并使用蓝色荧光 DAPI 进行对比染色以鉴定细胞核，之后通过荧光显微镜成像。在 I. D. 和微针阵列递送之后，均观察到显著的细胞 GFP 表达。为评价免疫原性，我们在单个 I. D. 或微针阵列免疫之后，在没有增强的情况下，评价了体内抗原特异性裂解活性。为此，我们采用删除了 E1/E3 的基于 Ad5 的载体对多组小鼠进行了免疫，所述载体编码密码子优化的 SIVmac239gag 全长或 SIVmac239gag p17 抗原 (Ad5. SIV gag, Ad5. SIV gag p17)。将空白载体用作对照 (Ad5)。我们在采用 Ad5. SIV gag 或 Ad5. SIV gag p17 的 I. D. 或微针阵列免疫之后，观察到有效的且相似水平的对显性 SIVgagp17 衍生的肽 KSLYNTVCV (SIVmac239gag 76-84) 特异的体内裂解活性 (图 37, CTL)。

[0138] 本文所公开的微针阵列技术也可有助于临床基因疗法。它解决例如常规方法的至少两种主要的局限性。首先，它能够实现重组病毒载体长时间的稳定和储存。通过使已被证实与冷冻的液体制剂血清等价的活病毒载体耐受高温和低温，微针阵列的稳定性将减轻与“冷链”相关的压力。此外，整合于微针阵列中使得通过常规方法不可实现的病毒载体的精确的、一致的和可再现的计量给予成为可能。最后，将所述病毒载体重新包装于唯一的必要的递送装置 (即，将递送精确地指向皮肤的浅表层的生物相容的且完全抛弃式的微针阵列) 中。

[0139] 这种基因递送平台在提供患者友好的临床基因疗法中是有用的。由于这些微针阵列已被设计为不穿透至血管或神经结构的深度，因此基因递送至人类皮肤将是无痛的且不出血的。此外，所述制造过程是灵活的，实现简单且快速的低成本制造，并具有有效的规模放大潜能。同样，作为终产品，MIA 装置在室温下是稳定的，并且廉价地运输和储存。结合来看，这些结构和制造的优势可实现宽泛且快速的临床部署，使得这种基因递送技术容易地适用于预防和 / 或治疗广泛的人类疾病。此外，这种方法可扩展至目前受限于同样的局限性的基于其它载体的疫苗平台（例如牛痘病毒、AAV 等）。至少由于这些原因，所公开的微针阵列及其使用方法显著地推动重组基因疗法领域的发展。

[0140] 微针阵列 - 示例性活性成分

[0141] 下面将详细描述各种活性成分。为方便起见，下面的实施例基于 6.3x6.3mm 的微针阵列。这种大小及由此的货物递送可通过增加或降低 2 至 100 倍而变化。

[0142] 对于最大的活性货物数量的通常的考虑包括，例如，阵列中总的针容积和（各）活性成分在溶剂中的溶解度（通常期望为 < 50%）。

[0143]

尖端负载至 MNA		
尖端负载的成分:	装置中的量 μg/装置 (除非另有不同 说明)	最大预计的 负载能力
Ad5.GFP (腺病毒 GFP 表达载体)	5x10 ⁸ 颗粒/MNA	2-5x10 ⁹ 颗粒/MNA
Ad-SIVgag (腺病毒 gag 表达载体)	5x10 ⁸ 颗粒/MNA	2-5x10 ⁹ 颗粒/MNA
Ad-SIVp17 (腺病毒 gag-p17 表达载体)	5x10 ⁸ 颗粒/MNA	2-5x10 ⁹ 颗粒/MNA
Ψ5 (非重组的 Ad 载体)	5x10 ⁸ 颗粒/MNA	2-5x10 ⁹ 颗粒/MNA
Lenti-GFP ⁽²⁾ (Lenti 病毒 GFP 表达载体)	5x10 ⁶ 颗粒/MNA	2-5x10 ⁷ 颗粒/MNA

牛痘病毒 (免疫法)

重组的牛痘病毒 (基因疗法, 基因工程)

季节性流感

MMR (麻疹、流行性腮腺炎、风疹)

	蛋白质/肽	
BSA (FITC 标记的)	240	400
OVA (FITC 标记的)	100	400
OVA (无标记)	240	400
Flu (裂解疫苗)	0.22	(2-5)

	表位肽 ⁽³⁾	
TRP-2	50	200

EphA2 (a)	50	400
EphA2 (b)	50	400
DLK-1	50	200
在一个 MNA 中的多个表位	200	400-600
P 物质 (NK-1R 配体)	15	

核酸

CpG 1668	120	250
CpG 2006	120	250
聚 (I:C)	250	250
质粒载体 (高摩尔质量 DNA)	100	200

肽/核酸结合物

OVA/CpG	250/120
OVA/CpG/聚 (I:C)	250/120/250
表位肽/聚 (I:C)	200/250

有机物

多柔比星	100
R848 (TLR7/8 配体)	6
L733 (NK-1 拮抗剂)	2
DNCB (刺激剂)	100

微粒

微颗粒 (1 μ 直径的微球)	1×10^6 颗粒/MNA	$2-5 \times 10^7$ 颗粒/MNA
-----------------------	------------------------	--------------------------

基于 PLG/PLA 的纳米级颗粒**其他生物制品**

肿瘤裂解物/CpG	250/120
肿瘤裂解物/CpG/聚 (I:C)	250/120/250

[0145] 肿瘤溶解产物/聚 (I:C) 200/250

[0146] 活腺病毒的尖端负载通常包括下列修改：

[0147] a) 在尖端负载水凝胶悬浮液中存在 5% 的海藻糖和 2.5% 的 CMC90。

[0148] b) 过程温度保持在 22°C。

[0149] 此外，慢病毒 (Lenti viral) 载体通常需要 4°C 的处理和基于蒸汽阱 (vapor trap) 的湿度控制。同样，短的表位肽通常溶解于 DMSO，尖端负载期间的溶剂蒸发时间为 4 小时。

[0150] 微针的结构和形状

[0151] 对下面的每个实施方案而言，应理解，如上面所描述的微针阵列的微针中可提供一层或多层活性成分。因此，例如，在一些实施方案中，可仅在微针区域内——而在阵列的结构支撑物中——提供活性成分，如图 15 所示。此外，在其他实施方案中，活性成分集中于微针的上半部分，例如在图 3A 至 4B 中所示的微针的尖端。

[0152] 图 16A 和 16B 是由多个锥体状突出物（例如微针）形成的 CMC- 微针阵列的 SEM 图像。图 16A 所示的锥体状针的平均尖端直径为约 5 至 10 μm 。如图 16B 所示，锥体状针的侧面可形成弯曲的和 / 或弓形的面，其可有助于插入皮肤。

[0153] 图 17 是微针阵列中单个针的另一 SEM 图像。图 17 所示的微针是基底扩展的柱状模塑的 CMC- 微针。基底扩展的柱状微针包括横截面通常为多边形（例如矩形）的基底部分和自基底部分扩展的突出部分。所述突出部分具有一个基本上为矩形的较低部分和通常逐渐变细至一个点的尖端部分。所述尖端部分通常为锥体状的，并且锥体状的暴露面可以是平坦的或弓形的。所述突出部分可以是针全长的一半或更多。

[0154] 图 18 和 19 说明锥体状（图 18）和柱状（图 19）模塑的 CMC- 微针的显微照片。由于锥体状针具有自针尖点至针基底持续增加的横截面（尺寸），因此当针进入皮肤时，继续将锥体状针推进皮肤中所需的力也增加。与之相比，柱状针一旦到达突出部分中通常为矩形的部分，其具有通常连续的横截面轮廓（尺寸）。因此，柱状针可优先于锥体状针，因为它们可允许以较小的力将针导入皮肤中。

[0155] 图 20 说明微针的形状和结构的示意图，所述微针的形状和结构通常适用于通过将材料旋转铸塑成经由微铣削形成的母模的制造。由于图 20 所示的形状和结构不包含任何底切，因此它们通常不会干扰模塑 / 脱模过程。图 20 中的结构包括 (a) 通常为锥体状的微针，(b) “尖锐的”柱状微针（无图 8 中的基底部件），(c) “宽的”柱状微针，(d) “短的”柱状微针（具有短的柱状部分和较长的点状部分），和 (e) “圆角的”柱状微针。

[0156] 虽然锥体状微针的容积可大于柱状微针的容积，但它们增加的横截面轮廓（尺寸）需要增加的插入力。因此，锥体状微针的几何形状可导致降低的插入深度和降低的有效递送容积。另一方面，柱状微针较小的横截面积和较大的长宽比可使得破坏力极限较低。顶角 α 越小，微针的尖端越“尖锐”。然而，若顶角过小（例如，低于约 30 度），所得的微针容积和机械强度则可被降低至不希望的水平。

[0157] 微针的穿透力与微针的锐度成反比，所述锐度不仅通过微针的夹角（顶角）来表征，还通过微针尖端的半径来表征。当顶角由母模的几何形状限定时，尖端锐度还取决于模具的可靠性。本文所描述的母模的微铣削使得模具的几何形状具有增加的精确性，这反过来导致所得的生产模具和由生产模具形成的微针阵列具有增加的精确性和可靠性。

[0158] 微铣削增加的精确性允许在模具设计中包括更精确和详细的元件。例如，如以下在下一部分中所讨论的，在柱状微针基底处形成圆角可显著增加微针的结构完整性，这降

低微针冲击皮肤时失败或断裂的可能性。虽然这些圆角可显著增加微针的强度,但它们不干扰微针的功能性要求(例如,穿透深度和生物制品容积)。所述圆角是非常小的特征,以致可能难以在通过常规方法形成的母模中创建。然而,上面所描述的微铣削技术允许包含如此小的特征,而几乎没有或没有困难。

[0159] 机械完整性和穿透能力

[0160] 优选构造微针阵列使之穿透角质层以将它们的货物(例如生物制品或生物活性成分)递送至表皮和/或真皮,同时通过防止其穿透至可包含神经末梢和血管的更深层而将疼痛和出血最小化。为了评估所制造的微针阵列的机械可行性,在作为阵列几何形状的代表性变型的锥体状和柱状微针阵列上进行测试(例如,在图7B和8中示出)。第一组试验说明微针的破坏极限,包括以恒定的接触速度在固体的丙烯酸表面上按压微针阵列,同时测量力和位移直至出现破坏。第二组试验说明微针在人类皮肤外植体上的刺穿能力。

[0161] 图21说明为功能测试设计的试验装置。将样品(即,微针阵列)安装到夹具上,使用计算机控制的移动平台(ES14283-52Aerotech, Inc.)使所述夹具以约10mm/s的恒定速度向固定的丙烯酸人工制品移动。容纳丙烯酸人工制品的三维测力计(9256C1,Kistler, Inc.)能够实现力的高灵敏度测量。

[0162] 图22说明在破坏试验期间所测量的数据的力-位移曲线。左边的曲线代表从测试的柱状微针样品获得的数据,右边的曲线代表从测试的锥体状微针获得的数据。如从图22中看出的,这些两种类型的微针的破坏显著不同;锥体状阵列可塑地变形(弯曲),柱状阵列在其基底显示柱的破损。这种不同的破坏行为使之具有显著不同的位移-力数据。所述破坏(破损)事件可从图中表明的位移-力数据中容易地鉴定。基于所获得的数据,看出柱状微针的破坏点平均为100mN。由于穿透角质层仅需要约40mN的力,因此所述微针足够强以穿透人类皮肤而不被破坏。此外,由于不能完全地建立微针尖端和丙烯酸人工制品之间的平行性,因此实际的破坏极限有可能显著高于100mN(即,以连续的方式破坏微针,而不是同时破损大多数/所有的微针)。

[0163] 锥体状微针显示出持续增加的力特征,而没有明显的破坏点的迹象。为了鉴定锥体状微针的破坏极限,进行了间断的试验,其中将一定数量的微针推向人工制品,后退,并通过光学显微照片进行检查。持续这种过程直至观察到破坏。为此,所述破坏被定义为锥体状微针弯曲超过15度。

[0164] 为进一步分析微针的破坏,开发了如图23所示的微针阵列的有限要素模型(FEM)。为获得CMC材料的机械性能(弹性模量和强度极限),进行了一系列纳米压痕试验(使用Hysitron纳米压痕仪)。CMC材料(如所制备的)的平均弹性模量和屈服强度分别为10.8GPa和173MPa。这表明所制备的CMC材料比PMMA(弹性模量:3.1GPa,屈服强度:103MPa)和聚碳酸酯(弹性模量:2.2GPa,屈服强度:75MPa)二者具有更高的弹性模量和屈服强度,表明与其他聚合物相比,CMC材料具有优越的强度和硬度。

[0165] 使用该数据,进行了一系列的FEM模拟。从FEM模型中预测,对于不对称负载(5度的负载错取向)而言,高度为600μm、顶角为30度且圆角半径为20μm的锥体状和尖锐柱状(宽度=134μm)微针的破坏极限为400mN(锥体状)和290mN(尖锐柱状)。考虑到最小穿透力需求为约40mN,锥体状和尖锐柱状微针将分别具有约10和7.25的安全系数。

[0166] 当圆角半径翻倍达到40μm时,柱状的破坏负载增加至350mN,当圆角半径降低至

5 μm 时, 破坏负载降低至 160mN, 这接近于实验上所测定的破坏负载。柱的高度和宽度对破坏负载具有显著的影响。例如, 对宽度为 100 μm 的柱而言, 高度从 500 μm 增加至 1000 μm 使破坏负载从 230mN 降低至 150mN。当宽度降低至 75 μm 时, 对 750 μm 高的柱而言, 破坏负载显示为 87mN。

[0167] 为了评价穿透能力, 测试了锥体状和尖锐柱状微针阵列刺穿基于水的模型弹性基板和全厚度的人类皮肤的能力。图 24 说明锥体状微针阵列(面板 A、C 和 E) 和柱状微针阵列(B、D 和 F) 在暴露于模型弹性体 4 分钟后的立体显微照片。特别地, 在施用锥体状或柱状微针阵列之后, 使甲苯蓝示踪剂染料沉积于模型弹性体基板(面板 C 和 D) 或新鲜离体的全厚度的人类皮肤外植体(面板 E 和 F) 上。

[0168] 所述模型弹性体基板包括在约 4 摄氏度凝胶化约 24 小时或更长时间的于 PBS 中的约 10% 的 CMC 和约 10% 的猪皮明胶。用约 100 μm 厚的封口膜(parafilm) 覆盖于弹性体表面, 以防止针尖和贴片材料与基于水的模型弹性体的直接接触。为了能够立体显微成像, 将台盼蓝示踪剂染料(Sigma Chem., cat#T6146) 以 0.1% 的浓度纳入 CMC- 水凝胶中。使用弹簧负载的施用器(spring-loaded applicator) 施用贴片并在暴露约 4 分钟之后进行分析。基于对靶基板中的染料的物理观测, 两种不同几何形状的微针的溶解显著不同。

[0169] 施用于模型弹性体基板的尖锐柱状针比锥体状设计所观察到的释放大体上更多的示踪剂染料至凝胶基质中(图 24, C vs. D)。回收的贴片的图像(图 24, A vs. B) 与该观察一致, 因为尖锐柱状针的降解比锥体状针的降解更靠前。为将这种分析外推至临幊上更相关的模型, 使用与来自弹簧负载的施用器相同的力将锥体状和柱状微针阵列施用于新鲜离体的全厚度的人类皮肤外植体。与弹性体模型的结果一致, 锥体状微针阵列比尖锐柱状微针阵列明显地沉积较少的示踪剂染料(图 24, E vs. F)。

[0170] 为进一步评价对人类皮肤的穿透性和递送有效性, 采用 BioMag(Polysciences, Inc., cat#. 84100) 珠或荧光微粒示踪剂(Fluoresbrite YG1 μm, Polysciences Inc., cat#. 15702) 制造了 CMC- 微针阵列。如先前所描述的, 将含有荧光或固体微粒的锥体状 CMC- 微针阵列施用于活的人类皮肤外植体。在施用后 5 分钟, 除去表面残留物, 将皮肤样本冷冻切片, 之后用甲苯蓝对比染色并通过光学显微镜(图 25A 和 25B) 或荧光显微镜(图 25C) 成像。

[0171] 锥体状 CMC- 微针有效地穿透活的人类皮肤外植体的角质层、表皮和真皮, 如沿相应于各针插入点的穿透腔排列的 Biomag 珠的沉积所证明的(典型的切片在图 25A 和 25B 中示出)。特别地, 有序的腔(图 25A, 编号 1 至 4 的腔, 甲苯蓝对比染色, 10x) 和沿穿透腔排列的 Biomag 颗粒(棕色)的沉积是明显的(图 25B, 40x), 表明微针穿透了人类皮肤。此外, 为鉴定细胞核而对采用 DAPI 染色的活的人类外植体切片进行的分析以及为鉴定 MHC II⁺类抗原呈递细胞而进行的抗-HLA-DR 分析, 显示高密度的荧光微粒沉积于浅表的表皮和真皮, 包括与 II⁺类抗原呈递细胞共定位的几种颗粒(图 25C, DAPI(蓝), HLA-DR⁺(红) 和荧光颗粒(绿), 40x)。

[0172] 这些结果还证明本文所描述的 CMC 微针阵列可有效地穿透人类皮肤并递送完整的药物(生物活性成分), 包括不溶的微粒。它们与将颗粒抗原有效递送至人类皮肤中的抗原呈递细胞是一致的, 是目前合理疫苗设计的主要目标。

[0173] 为进一步说明微针阵列的体内递送, 通过类似地将含有荧光颗粒的阵列施用于麻

醉小鼠的耳背面而模拟了体内颗粒抗原的皮肤递送。5分钟 后,除去贴片,小鼠恢复了正常活动。3小时或3天时,分析耳皮肤和引流淋巴结中荧光颗粒的存在。与对人类皮肤的观察一致,在来自阵列施用位点处的离体皮肤中有明显的微粒(数据未显示)。此外,在3天的时间点,在引流淋巴结中有明显的大量颗粒。图26A和26B说明在引流淋巴结中有明显的大量颗粒(图26A,10x),包括与II⁺类细胞密切关联的微粒簇(图26B,60x),表明淋巴结内存在含内化微粒的抗原呈递细胞。

[0174] 为了定量评价使用微针阵列时针的几何形状对货物递送的影响,构建了³H-示踪剂标记的CMC-微针阵列。采用5重量%的卵清蛋白作为模型活性成分配制了最终干重含量为25重量%(5g/95g OVA/CMC)的CMC-水凝胶,并采用0.1重量%的台盼蓝和0.5×10⁶dpm/mg的干重³H-示踪剂(以³H-胸腺嘧啶的形式)(ICN Inc.,cat#2406005)进行了示踪标记。从单一批次的标记的CMC-水凝胶制剂制造了四批次的³H-CMC-微针阵列,包括几个单独批次的锥体状和尖锐柱状针几何形状。将所述贴片施用于如上所描述的人类皮肤外植体,曝露30分钟后除去贴片。将贴片处理过的区域用胶带剥光以除去表面碎片并使用10mm的活检穿孔器切割。通过闪烁计数测定离体人类皮肤外植体中的³H含量。测定了³H-CMC-微针贴片-材料的比活度并计算为72,372cpm/mg干重。将该比活度用于间接测定所递送的并保留在皮肤中的卵清蛋白的量。所得数据总结在下表1中。

[0175] 所测试的贴片类型在不同的微针阵列之间(平均标准偏差为24至35%)以及不同批次之间(平均标准偏差为7至19%)是一致的。两种针的几何形状的批内变异性小于批间数值,表明插入过程和靶的特征在成功的经皮材料递送和保留中可能起主要作用。贴片材料的保留数据清楚地证明微针的几何形状在经皮货物递送中是最重要的。柱状针的几何形状提供了比锥体状针整体大3.89倍的³H标记的针材料的沉积。在所沉积的放射性材料的基础上,估计锥体状针插入约200μm深,而柱状针插入约400μm或更多。

[0176] 表4.2.5. 通过锥体状和柱状针进行的³H-标记的CMC-微针材料至人类皮肤外植体的转移

[0177]

阵列 批次	锥体状 针 (cpm/ 贴片)	标准偏 差 (%)	锥体 状针 转移 的	柱状针 (cpm/ 贴片)	标准偏 差 (%)	柱状 针转 移的 OVA	柱状 与锥 体状 之比
OVA							
批次 A	2459.00	17.56	1.70	11700.50	31.52	8.08	4.76
批次 B	3273.50	57.39	2.26	12816.50	21.45	8.85	3.92
批次 C	2757.75	46.13	1.90	12240.00	26.77	8.46	4.44
批次 D	3782.00	36.27	2.61	10921.50	9.32	7.55	2.89
批内	3068.06	19.00	2.12	11919.63	6.77	8.24	3.89
AVG							

[0178] 理想地,本文所描述的微针阵列可用于皮肤免疫。开发用于有效递送抗原和佐剂的策略是疫苗设计的主要目标,并且以皮肤树突细胞为靶的免疫策略比传统的疫苗具有多种优势。

[0179] 本文所描述的微针阵列在化学疗法和免疫化学疗法应用中也是有效的。将化疗剂有效且特异地递送至肿瘤(包括皮肤肿瘤)是现代肿瘤治疗的主要目标。然而,化疗剂的全身性递送受限于多种已完全确定的毒性。在皮肤肿瘤——包括源于皮肤的肿瘤(如基底细胞、扁平细胞、梅克尔细胞和黑素瘤)和转移至皮肤的肿瘤(如乳腺癌、黑素瘤)——的情况下,局部递送可能是有效的。局部递送的现有方法通常需要施用乳膏或重复的局部注射。这些方法的有效性目前受限于活性剂对皮肤的有限的穿透性、非特异性和不需要的副作用。

[0180] 本公开内容的微针阵列可用作传统的局部化学疗法的替代或补充。本公开内容的微针阵列可穿透皮肤的外层并有效地将活性生物制品递送至真皮和表皮的活细胞。化疗剂的递送导致皮肤细胞的凋亡和死亡。

[0181] 此外,多种生物活性剂可在单个微针阵列(贴片)中递送。这使得基于细胞毒素剂和免疫刺激剂(佐剂)共递送的免疫化学疗法成为可能。在由佐剂创造的免疫原性环境中,从垂死的肿瘤细胞中释放的肿瘤抗原将被呈递至免疫系统,从而诱导能够在治疗位点和整个身体中抑制肿瘤细胞的局部的和全身的抗肿瘤免疫应答。

[0182] 在一个示例性实施方案中,研究了生物活性小分子的递送。特别地,研究了采用CMC微针阵列递送至皮肤的化疗剂**Cytoxan®**的活性。使用**Cytoxan®**使得可以采用一类药剂的代表而直接测量生物学活性(**Cytoxan®**诱导皮肤中的细胞死亡),所述药剂对于一系列皮肤恶性肿瘤的局部治疗而言具有潜在的临床效用。

[0183] 为了直接评价纳入CMC微针阵列的抗原的免疫原性,使用了良好表征的模型抗原卵清蛋白。制造了纳入了可溶性卵清蛋白(sOVA)和微粒性卵清蛋白(pOVA)之一的锥体状阵列,或含有pOVA和CpGs两者的阵列。CpGs的佐剂效应已在动物模型中良好表征,它们在人类中的佐剂活性目前正在临床试验中进行评价。

[0184] 通过使用如上所述的弹簧负载的施用器将含抗原的CMC-微针阵列施用于麻醉小鼠的耳部,并在施用后5分钟除去所述阵列,从而实现免疫。这些锥体状微针阵列含有约5重量%的在CMC中的OVA和约0.075重量%(20 μM)的CpG。作为阳性对照,使用了基于基因枪的基因免疫策略,其利用了编码OVA的质粒DNA。对于在小鼠模型中诱导CTL介导的免疫应答而言,基因枪免疫是最有效且可再现的方法之一,表明其用作比较这些试验的“黄金标准”的用途。

[0185] 对小鼠进行免疫,一周后增强,之后分析体内OVA特异性CTL活性。显著地,用含有少量OVA和CpG的阵列进行的免疫诱导高水平的CTL活性,与通过基因枪免疫观察到的那些相似(图27)。即使在无佐剂的情况下,用微粒和可溶性阵列递送的OVA抗原均诱导显著的OVA特异性CTL活性。业已证明,当通过传统的针注射递送时,相似的应答实质上需要更高剂量的抗原。

[0186] 为了评价所制造的阵列的稳定性,制造并储存了不同批次的阵列,然后经过长时间后再使用。如图28所示,在长达80天(所评价的最长时间点)的储存期内没有观察到

免疫原性的显著劣化。因此, CMC 微针阵列和这种递送技术可实现抗原和佐剂的有效皮肤递送以诱导抗原特异性免疫。

[0187] 为了评价生物学活性小分子的递送,采用小分子量的化疗剂 **Cytoxan®** (环磷酰胺) 制造了锥体状 CMC- 微针阵列,或用 FluoresBrite 绿色荧光颗粒作为对照。以 5mg/g CMC 的浓度整合了 **Cytoxan®**,使得每一阵列能够递送大约 140 μg。基于所靶向的皮肤的面积,这是一个治疗上相关的浓度,仍然完全低于与全身性毒性相关的水平。使用活的人类皮肤器官培养物来评价 **Cytoxan®** 的细胞毒性。通过将阵列施用于我们之前所描述的皮肤外植体而递送 **Cytoxan®**。施用后 5 分钟,移除阵列和残留的材料,并在暴露 72 小时后,将培养物活的皮肤外植体冷冻切片并固定。使用绿色荧光 TUNEL 试验 (原位细胞死亡检测试剂盒, TMR 绿, 罗氏, cat# :11-684-795-910) 来评价细胞凋亡。人类皮肤切片的荧光显微图像分析显示在 **Cytoxan®** 处理的皮肤中有大量的表皮细胞凋亡,如图 29A 所示。如图 29B 所示,在荧光颗粒处理的皮肤中未观察到可见的细胞凋亡,尽管这些颗粒是明显的,这验证了所观察的区域是被微针阵列精确地靶向的。

[0188] 直接制造的微针阵列

[0189] 上面所描述的母模的微铣削允许生产具有各种几何形状的微针阵列。在另一实施方案中,提供了通过直接微铣削各种材料 (如干燥的 CMC 板) 而制造微针阵列的系统和方法。可将与如上所述的关于母模微铣削的相同的一般性工具作业用于直接微铣削微针阵列。

[0190] 微针阵列的直接微铣削消除对模塑步骤的需求,并使得与大规模临床应用相容的、简化的、可扩大的且可精确再现的生产策略成为可能。此外,经由微铣削直接制造微针阵列实现对微针几何形状的更好控制。例如,微铣削允许包含保留微针的特征如底切和 / 或斜面,而这些特征使用模塑方法是不能实现的。

[0191] 微针阵列的直接铣削的再现性是特别有利的。也就是说,在直接的微铣削中,作为铣削制造过程的结果,所有的微针都是相同的。在模塑操作中,作为从模具中物理性分离的方法的结果,在给定的贴片中丢失或破损一些针是常见的。为用于某些医学应用,由于不同贴片中的针参差不齐可能会导致所递送的药物 / 疫苗的剂量的变化性,因此阵列中生物活性成分的量的再现性对于提供过程中的适当水平的“质量控制”而言是非常重要的。当然,再现性对需要 FDA 批准的任何应用而言也是重要的益处。旋转铸塑 / 模塑的贴片需要特别的方法以确保对一致的药物递送而言可接受的均匀性。这种质量控制也可能导致一定百分比的贴片“未能通过”该释放试验,在生产过程中产生浪费。直接微铣削消除或至少显著地降低这些潜在的问题。

[0192] 模塑过程由于需要能够填充井或凹面并从所述井或凹面中除去固化的模塑部件而还具有固有的局限性。这是由于模具的几何形状,当模塑部件或所述部件不能从模具中除去时,通常必须避免底切。换言之,模塑部件 (如模塑微针阵列) 的几何学限制在于位于更接近顶点处的任何特征必须比位于朝向基底处的任何特征更狭窄。

[0193] 因此,鉴于这些局限性,图 20 说明通常适用于模塑制造的微针形状和结构的示意图。换言之,图 20 所示的形状和结构不包含可防止部件 (例如微针) 从生产模具中除去的

任何底切。与之相比,图 30 说明不能以本文所描述的方式模塑的、有斜面的、底切的微针形状。

[0194] 这种几何形状仅可通过使用所建议的微铣削技术的直接制造而创建。负(斜面)角有助于微针在组织中更好的保留。此外,由于图 30 的微针在较低部分(具有更小的横截面尺寸)之上具有更宽的中间部分(具有更大的横截面尺寸),通过配置微针在较宽的部分容纳或储存生物活性材料可递送更大量的生物活性材料,其中所述较宽的部分被配置为保留在皮肤中。因此,具有较大横截面尺寸的中间部分可“携带”大量的生物活性成分。由于较低部分逐渐变细至更窄的横截面尺寸,因此较宽的中间部分将获得对将活性成分递送至皮肤层而言良好的穿透性。中间部分之上的部分理想地变窄至一点以有助于微针进入皮肤层。

[0195] 模塑部件的另一种局限是可能难以精确地填充模具的非常小的截面。由于用于微针阵列的生产模具包含大量的非常小的截面,因此可能难以精确地填充每个井。当模具必须用不同的材料——例如含有生物活性成分的材料和不含有生物活性成分的材料——填充时,这可能尤其是有问题的。因此,如果生产模具将用多个层进行填充,则可能难以精确地填充与各微针相关的细小的井。由于微针意欲递送一种或多种生物活性成分,这种再现性是特别重要的。因此,即使用于填充生产模具的生物活性成分的量的微小变化也可能是非常不期望的。

[0196] 同样,通过使用层压结构以形成可微铣削的板或块,可将各种活性成分通过垂直层压整合于单个微针中。例如,在一个示例性实施方案中,将 CMC-水凝胶和 CMC-sOVA-水凝胶(80%的 CMC/20 重量%的 OVA)层压成板或块的形式。可使用本文所描述的直接微铣削技术对这种复合板进行微加工。

[0197] 图 31 是整个微针阵列的立体显微图像分析。所述微针包括 10x10 阵列的微针。图 32 是图 31 的微针阵列的放大部分。两种成分的层压如图 32 所示,其说明微针的较暗区域为尖端部分,微针的较亮区域为基底部分。位于尖端的较暗的层代表含有生物活性成分的层,在该情况下为包含于 CMC 层中的可溶的卵清蛋白。

[0198] 尽管形成含活性材料(例如抗原)的层以及所述层(和任何其他邻近的层)的后续微铣削可需要使用相对大量的活性材料,但可将所述材料除去(例如以碎片的形式)、回收和再循环。直接的加工技术不受源于模塑/脱模方法的几何学约束的限制,因此,能够创建更多创新的针设计(例如,图 30),所述针设计可显著改善皮肤中保留的针容积和针保留时间。

[0199] 通过形成多个层而生产板或块可提供可进行微加工的固体材料,所述固体材料可包含一层或多层含活性成分的层。例如,可通过层压方法制造的可溶的、固体的、基于羧甲基纤维素聚合物的块或板,且所述块或板具有明确定义的且可控的尺寸。所得的板或块是完全可切削加工的,与塑料或金属的板或块的切削加工相似。如本文所描述的,该制造方法可适用于将生物活性成分纳入基质中,而不显著降低它们的活性水平。

[0200] 如下面所描述的,可将所制造的材料板(例如基于 CMC 的材料)直接进行微加工/微铣削以生产一种或多种适合递送活性成分穿过皮肤的微针阵列。所述可溶的生物相容的 CMC 块-材料可用于以用于体表施用的延时释放方式(time release manner)递送可溶或不溶的微粒剂。

[0201] 当支架材料的溶解是需要的且有用的时,生物相容的材料可适合用于在更深的软组织或硬组织中的移植体。

[0202] 可使用下面的方法来制备浓度为 12.5% 的羧甲基纤维素 (CMC) 聚合物低粘度水凝胶。可在水或其他生物相容的缓冲液——例如 (但不限于) PBS 或 HBS——中制备 12.5% 的羧甲基纤维素 (CMC) 低粘度水凝胶。在制备聚合物溶液时,可添加可溶性药剂 (例如核酸、肽、蛋白质、脂质或其他有机和无机的生物活性成分) 和微粒 (例如卵清蛋白,可溶性药剂)。可使用 20w/w% CMC 的携带活性成分的亚铁微粒。

[0203] 可如下实现 1000g 不含活性成分的无菌 12.5% CMC 水凝胶的制备 :

[0204] 1) 称量 125g CMC, 添加 875g 水或其他基于水的溶剂。

[0205] 2) 在高架混合机中搅拌至均匀。

[0206] 3) 将匀浆在 121 摄氏度下高压灭菌 1 小时至无菌 (所述高压灭菌步骤可降低粘度用于改善的分层)。

[0207] 4) 冷却至 22 摄氏度。

[0208] 5) 将所得材料在 10 托和 22 摄氏度下真空处理 1 小时以除去所捕获的微气泡。

[0209] 6) 将产品在真空腔式离心机中在 25,000g 下离心 1 小时 (为使残留的微气泡漂浮并进一步除去)。

[0210] 7) 将 CMC- 水凝胶产品在 4 摄氏度下储存。

[0211] 可如下实现 1000g 无菌的、干含量为 12.5 重量 / 重量% 的 20/80% 卵清蛋白 / CMC 水凝胶的制备 :

[0212] 1) 称量 100g CMC, 添加 650g 水或其他基于水的溶剂。

[0213] 2) 在高架混合机中搅拌至均匀。

[0214] 3) 将匀浆在 121 摄氏度下高压灭菌 1 小时至无菌 (该高压灭菌步骤可降低粘度用于改善的分层)。

[0215] 4) 冷却至 22 摄氏度。

[0216] 5a) 将 25g 卵清蛋白溶解于 225g 水中。

[0217] 5b) 将卵清蛋白溶液在 0.22 μm 孔径的过滤器上无菌过滤。

[0218] 6) 将 750g CMC 水凝胶与 250g 无菌的卵清蛋白溶液在无菌条件下混合至均匀。

[0219] 7) 将所得材料在 10 托和 22 摄氏度下真空处理 1 小时以除去所捕获的微气泡。

[0220] 8) 将产品在真空腔式离心机中在 25,000g 下离心 1 小时 (为使残留的微气泡漂浮并进一步除去)。

[0221] 9) 将 CMC- 水凝胶产品在 4 摄氏度下储存。

[0222] 可如下实现 100g 无菌的、干含量为 12.5 重量 / 重量% 的 20/80% 的微粒 - 卵清蛋白 / CMC 水凝胶的制备 :

[0223] 1) 称量 10g CMC, 添加 87.5g 水或其他基于水的溶剂。

[0224] 2) 在高架混合机中搅拌至均匀。

[0225] 3) 将匀浆在 121 摄氏度下高压灭菌 1 小时至无菌 (该高压灭菌步骤可降低粘度用于改善的分层)。

[0226] 4) 冷却至 22 摄氏度。

[0227] 5) 在无菌条件下, 将 2.5g 的微粒 - 卵清蛋白分散于 97.5g、22 摄氏度的 CMC- 水凝

胶中并混合至均匀。

[0228] 6) 将所得材料在 10 托和 22 摄氏度下真空处理 2 小时以去除所捕获的微气泡。

[0229] 7) 将产品在真空腔式离心机中在 3,000g 下离心 1 小时（为使残留的微气泡漂浮并进一步除去）。

[0230] 9) 将 CMC- 水凝胶产品在 4 摄氏度下储存。

[0231] 注意，在该实施例中，微粒 - 卵清蛋白是由活化的铁珠反应成卵清蛋白而制备的。然而，应注意，上面的描述仅是示例性的实施方案，可使用其他的化合物和活性成分。

[0232] 可以下面的方式使用上面所描述的低粘度 CMC- 水凝胶制造固体的羧甲基纤维素 (CMC) 块 / 板。

[0233] 制造方法可包括将聚合物以所定义的厚度层状铺展，并在聚合物层的表面上使用无菌干燥的空气流以将分层的聚合物干燥至水含量低于约 5%。可重复上面两个行为 (act) 直至达到期望的块厚度。

[0234] 参考图 33，描述了在铸塑模具组件上以所定义的厚度对层状 CMC- 水凝胶进行分层的方法。图 33 说明铸塑模具组件的横截面图，其包括：(a) 铸塑床；(b) 可调节的铸塑床壁；(c) 铸塑床深度调节组件；和 (d) 丙烯酸涂布器。应注意，图 33 不是按比例绘制的或元件也未以它们的适当比例显示。

[0235] 铸塑模具组件可由丙烯酸 (Plexiglas) 构成，并可包含铸塑床基本单元、可垂直调节的疏水性铸塑床壁和铸塑床调节机构。铸塑床基本单元 (a1) 可包括具有附着的纤维素层 (a3) 的可移动 / 可替换的铸塑床顶板 (a2)。纤维素层的厚度可为约 0.5mm。可垂直调节的疏水性铸塑床壁 (b) 可使用由导螺杆 (c1) 和水平调节旋钮 (c2) 组成的铸塑床深度调节机构进行调节。在所述说明性实施方案中，将该旋钮旋转四分之一可导致床壁抬起 0.5mm。

[0236] 首先，可将可调节的铸塑床壁设定为这样的高度，即当涂布器就位时，丙烯酸涂布器和床的纤维素层之间的距离为约 1mm。可添加预定体积（例如，约 0.1ml/cm²）的 12.5% CMC- 水凝胶并分层。可通过在可调节的铸塑壁的顶部表面上滑动丙烯酸涂布器 (d) 而使该层平坦或水平，以产生约 1mm 的 CMC- 水凝胶平坦层。可将该分层的 CMC- 水凝胶在如图 34 所示并将在下面更详细描述的干燥装置中干燥至固相。

[0237] 可重复分层和干燥的步骤直至达到期望的层压结构（板）。在添加每层期间，可将铸塑床壁升高适当的量。例如，在添加每层之后，可将床壁升高或提升约 0.5mm。因此，以上所描述的循环可沉积约 0.5mm 的固体 CMC 层。可重复所述过程（例如材料的分层，床壁的提升等）直至达到期望的块厚度。

[0238] 分层的 CMC- 水凝胶聚合物可以多种方式干燥。例如，图 34 说明一种可用来干燥板材料的各种沉积层的干燥装置。应注意，图 34 不是按比例绘制的或元件也未以它们的适当比例显示。风扇可在铸塑模具组件中层压的 CMC- 水凝胶上提供连续的气流（例如，空气或其他惰性气体，例如氮气）。所述气流将导致 CMC- 水凝胶层轻微的脱水。干燥速度可调节以防止或降低固体 CMC 产品中的气体封入物（例如气泡）。可将该层之上的湿空气经由干燥剂（例如空气干燥器或除湿器）干燥、调节温度后再次通过控制速度的风扇而返回水凝胶上。可将湿度计置于腔室的潮湿侧以对干燥过程的状态提供指示。按照湿度计的指示，在达到预定的干燥度之后，可结束干燥过程。

[0239] 可调整气流以影响干燥速度。在示例性实施方案中,将气流控制在约 0.1 至 2.0m/秒之间;温度在室温至约 50 摄氏度之间。使用这些设置,取决于气流和设定的温度,单层 CMC- 水凝胶的干燥时间可为约 0.5 至 4 小时。

[0240] 基于纯的 CMC 的产品可以是透明的、亮白色或琥珀色的。它的比重可为约 1.55 至 1.58g/ml。所述产品理想地不含微气泡,原本适合于制造微米级的物品。最终的块 / 板状产品的物理特征(硬度、拉伸强度等)可变化,但通常应能够抵抗与微铣削有关的物理应力。

[0241] 如上面所描述的,本文所公开的微针阵列能够为各种生物活性成分提供可靠的和精确的递送方法。上面所描述的微针阵列的结构、制造和分布优势的特征可尤其适用于递送疫苗。这些微针阵列的优势包括(1) 安全,避免使用针或活载体用于疫苗递送,(2) 经济,由于廉价的生产、产品稳定性和易于分配,和(3) 多样性,经由与不同的抗原和佐剂制剂相容的递送平台。

[0242] 此外,经由微针阵列的皮肤免疫在免疫原性中具有重要优势。皮肤中富有容易获取的树突细胞(DCs),并被长期认为是疫苗递送的高度免疫原性靶点。这些树突细胞群体构成迄今鉴定的最强有力的抗原呈递细胞(APCs)。例如,皮肤的基因免疫导致了小鼠和人类皮肤中树突细胞的转染和激活,并且这些转染的树突细胞合成转基因的抗原,迁移至皮肤引流淋巴结中,并将它们经由 MHC I 类受限制的途径有效地呈递以刺激 CD8+T 细胞。与通过其他免疫方法诱导的免疫应答相比,通过源于皮肤的 DCs 诱导的免疫应答显著地有效且持久。近来的临床研究表明当皮内递送而不是通过标准的肌肉针注射时,即使常规的疫苗也显著地更有效。因此,微针阵列可有效且同时地递送抗原和佐剂二者,使得能够使用相同的递送平台来实现 DCs 的靶向和佐剂操纵引起的免疫应答。

[0243] 高频电磁振荡施用器

[0244] 可通过各种方法——包括自身施用或人压力(例如用手指或拇指进行按压)辅助施用或采用弹簧负载的装置——将微针阵列装置施用于人类皮肤。为了促进微针阵列装置(包括尖端负载的微针阵列)的方便且再现的递送,本文描述了一种施用器装置。所述施用器装置被配置为将高频的电磁振荡转换成活动头的单向机械共振。这反过来实现多次可再现的低振幅且高频的压力冲程(pressure strokes),从而有助于微针阵列的微针插入组织(包括人类皮肤)中。

[0245] 如图 38 所示,所述施用器可包括施用器头、振荡器能量转换器、电磁振荡器和电源。如需要,可从施用器装置中拆卸这四种元件中的一种或所有。

[0246] 施用器头是可更换的,以适应并作用在不同大小和形状的组织表面区域。如图 39 所示,各种施用器头的几何形状可与本文所描述的施用器结合使用。施用器头是可更换的,由不锈钢或其他化学和物理抗性材料制成。如需要,可将施用器头高压灭菌,和 / 或通过醇类或其它化学品灭菌。可选地,或另外,也可使用气体灭菌(环氧乙烷)。

[0247] 可快速设计并制造施用特异性的几何形状。例如,在该实例中,取决于活动头的几何形状,单次施用的面积可在 5mm²至 250mm²范围内。通过头的几何形状的简单结构变化,可实现更宽的范围。

[0248] 可将所述振荡器能量转换器单元配置成将电磁振荡转化为施用器头的机械运动。可将施用器头在 Z 方向上的振幅控制在 0.5 至 2.5mm 之间(图 40 ;A)。在一些实施方案中,可将在 X-Y 方向上的头运动配置为可忽略的,< 0.2mm(图 40 ;B)。可将由能量转换产生的

机械运动在 Z 方向上的频率控制在 500 至 25000rpm 之间。如需要，所述振荡器能量转换器单元可为可拆卸的，并可根据需要处置或灭菌。

[0249] 电磁 (EM) 振荡器可由三个子单元组成。这些子单元可包括 (1) 产生用于控制器和高频 EM 振荡器的电压和功率的稳定电源；(2) 产生用于 EM 振荡器的高频信号和所需电流的控制器 - 调节器；和 (3) EM 振荡器。输出频率可由用户控制（例如，在例如 100 至 500Hz 范围内）。在一些实施方案中，EM 振荡器可完全封装并通过醇溶液或其他化学试剂灭菌。

[0250] 电源单元也可为可拆卸的，以适应不同的可连接的电源，例如：

[0251] a. 合格的一次性碱性电池或任何其他类型的电池。

[0252] b. 在感应充电器中建造的可充电的镍镉 (NiCad) 或锂氧化物电池。

[0253] c. 100 至 240V 的电源适配器。

[0254] 所述施用器可提供几种与微针阵列施用有关的好处。例如，该施用器可使将微针阵列插入组织所需的机械力最小化。与现有的弹簧负载的施用器相比，该施用器还可降低疼痛效应。此外，该施用器可以是便携的，施用器的组件可以是可拆卸的和可更换的。最后，可将该施用器配置为能够被灭菌用于无菌使用。

[0255] 鉴于所公开的实施方案的原则可应用于许多可能的实施方案，应承认，所阐明的实施方案仅是优选的实施例，不应看作是对保护范围的限制。而是，保护范围是由下面的权利要求定义的。因此，我们要求保护落入这些权利要求的范围和精神的所有技术方案。

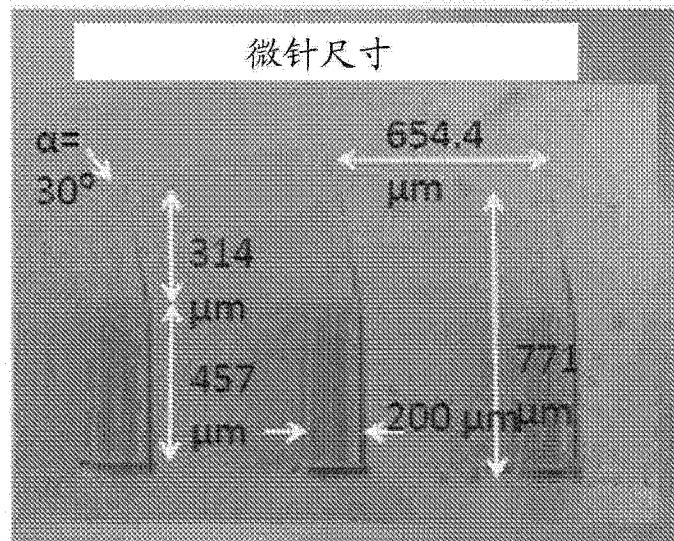


图 1

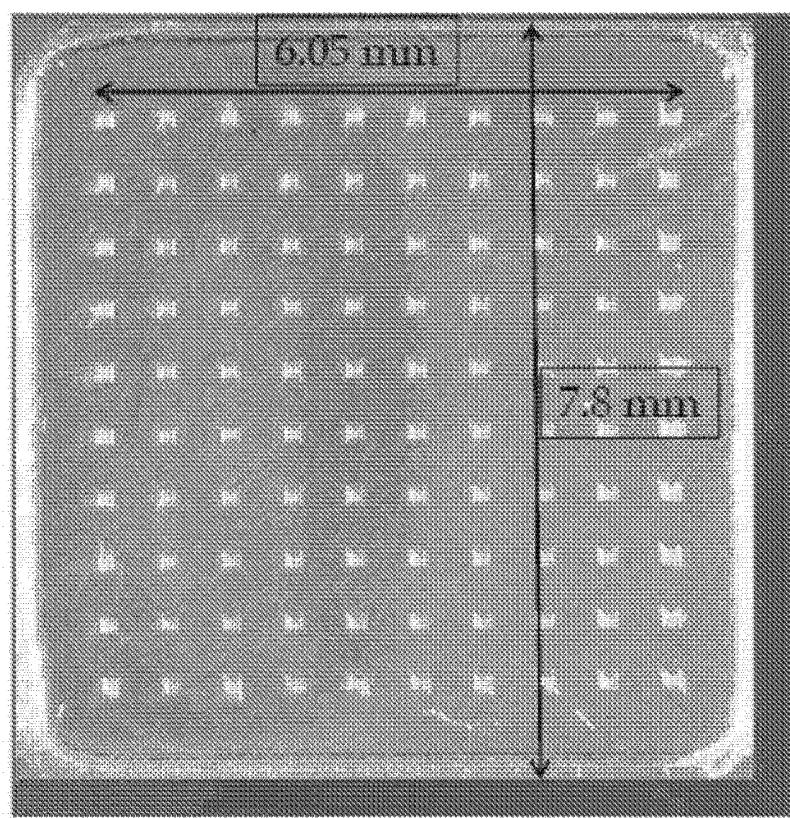


图 2

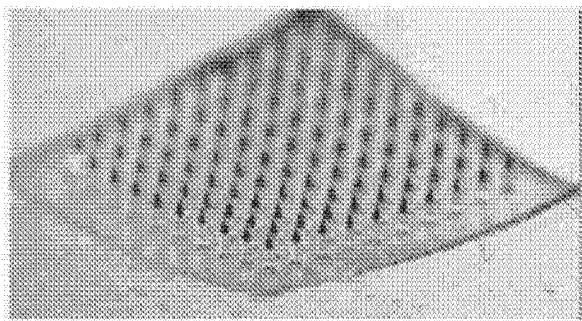


图 3A

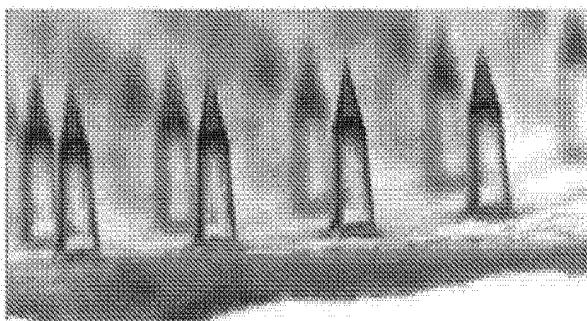


图 3B

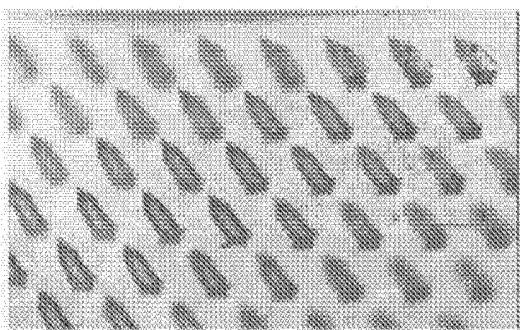


图 4A



图 4B

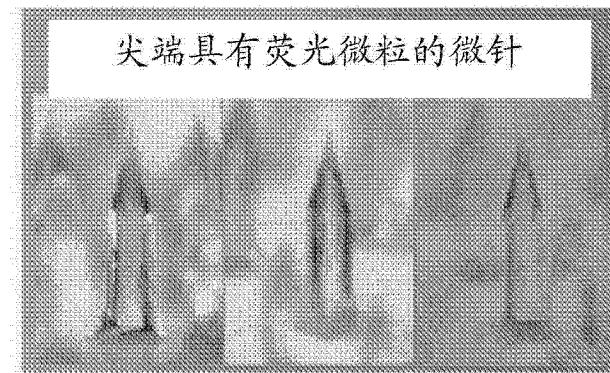
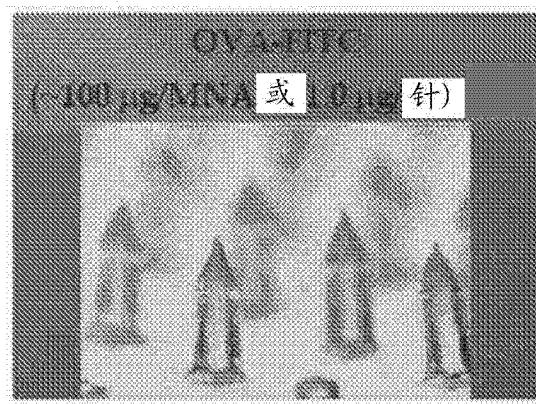
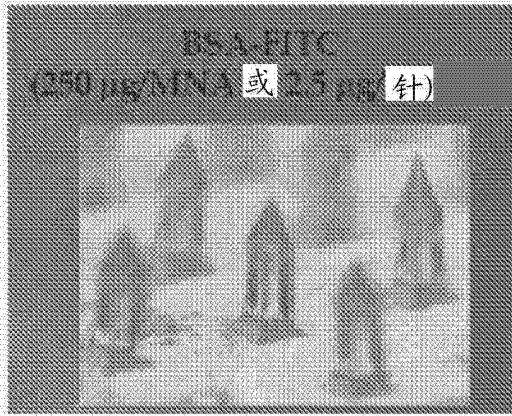


图 5A



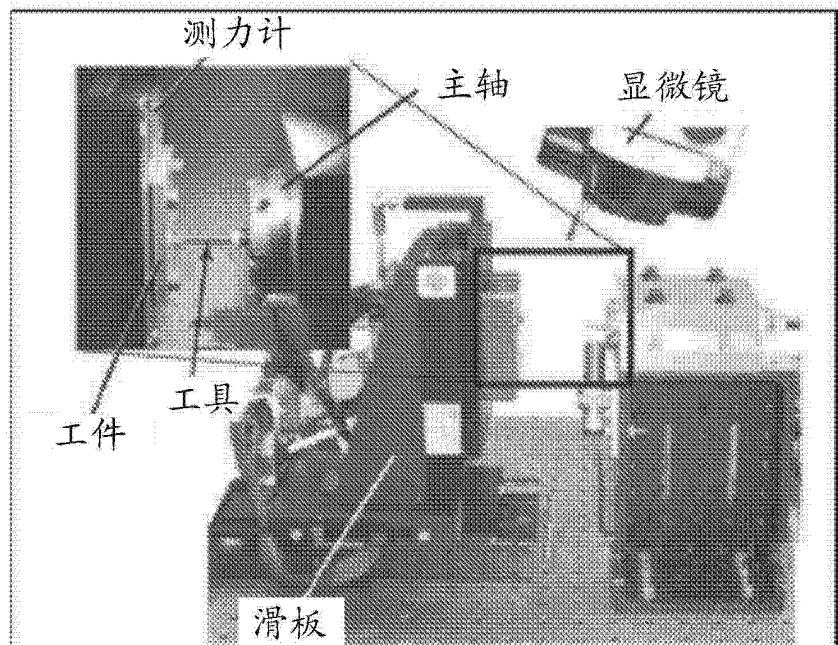


图 7

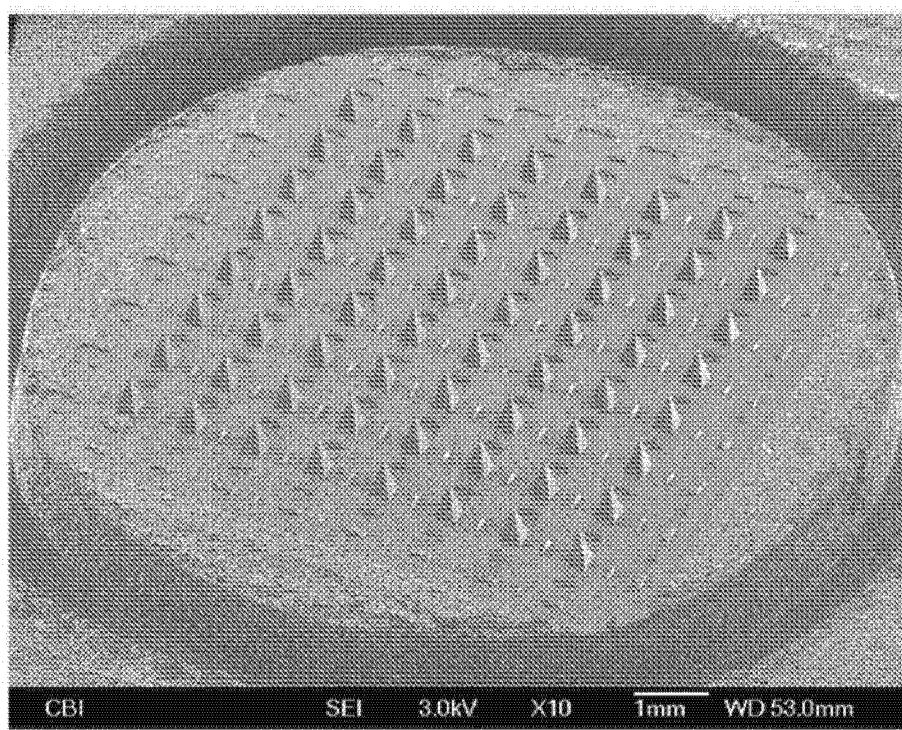


图 8

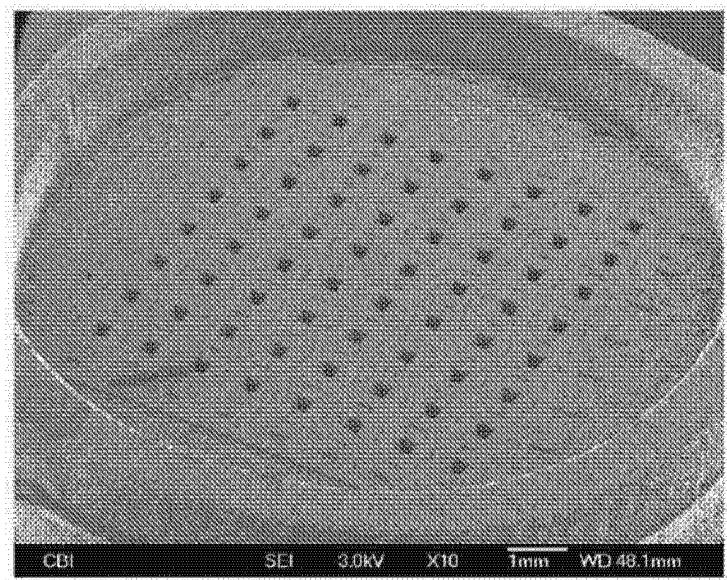


图 9

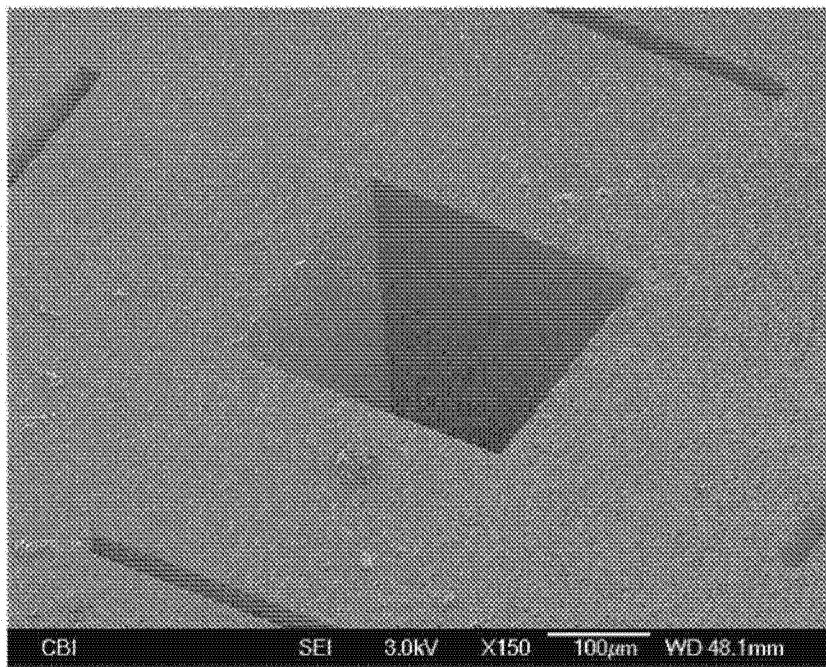


图 10

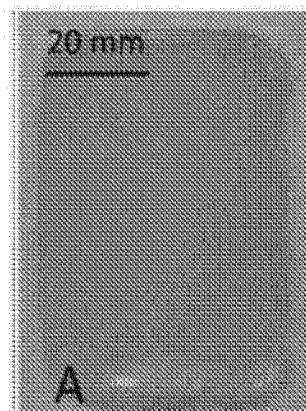


图 11A

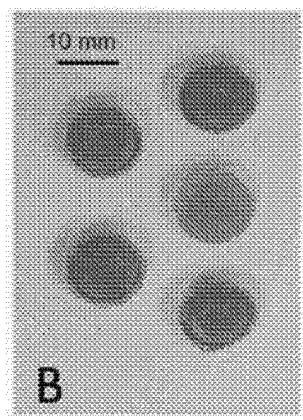


图 11B

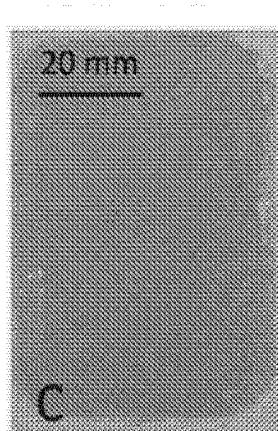


图 11C

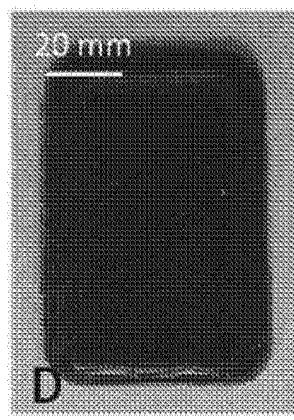


图 11D

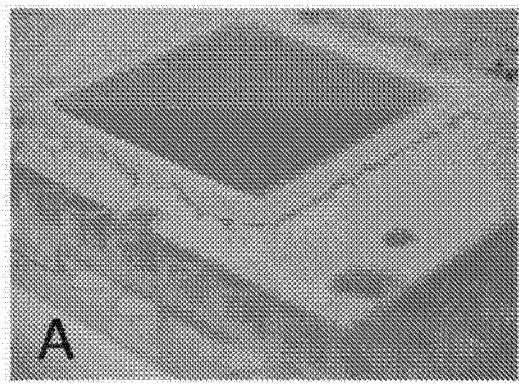


图 12A

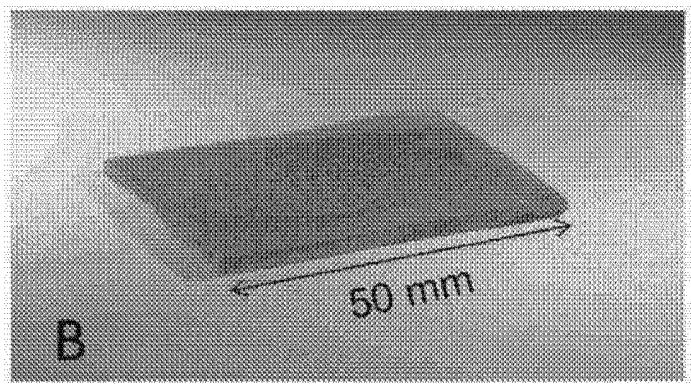


图 12B

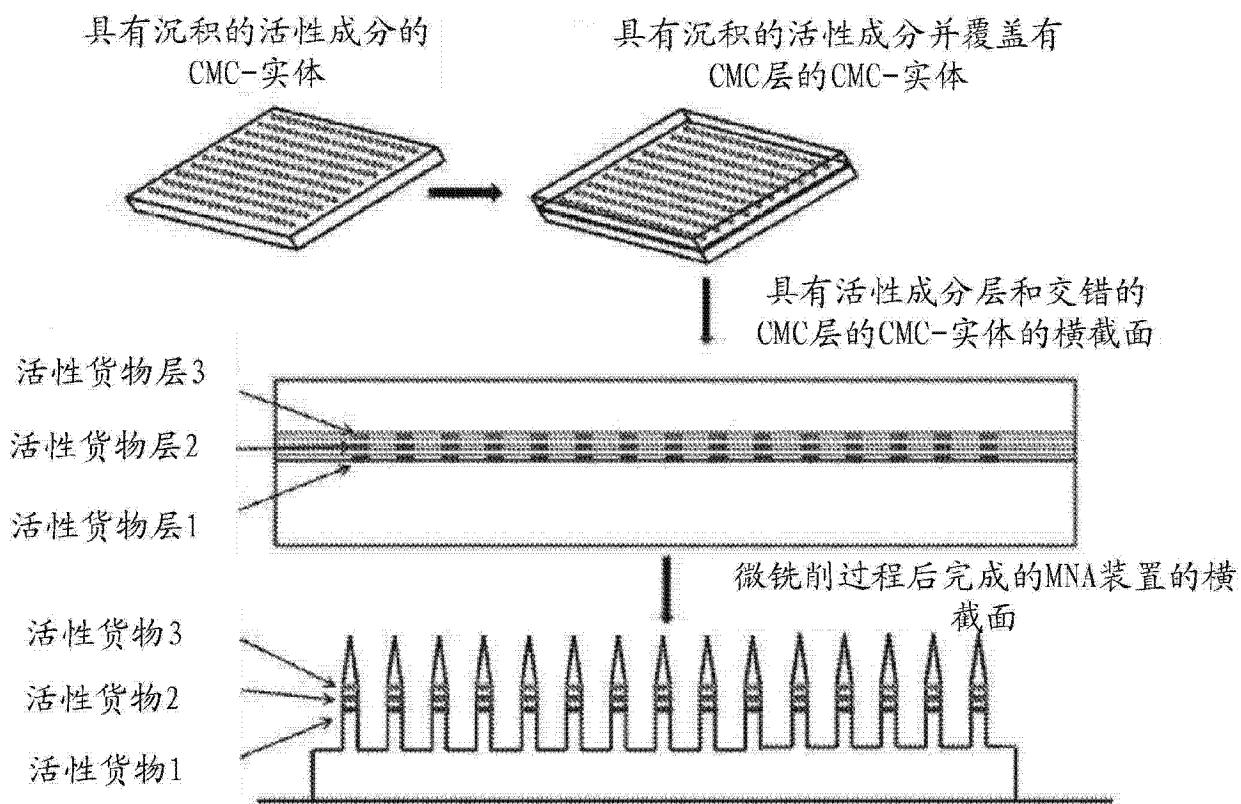


图 13

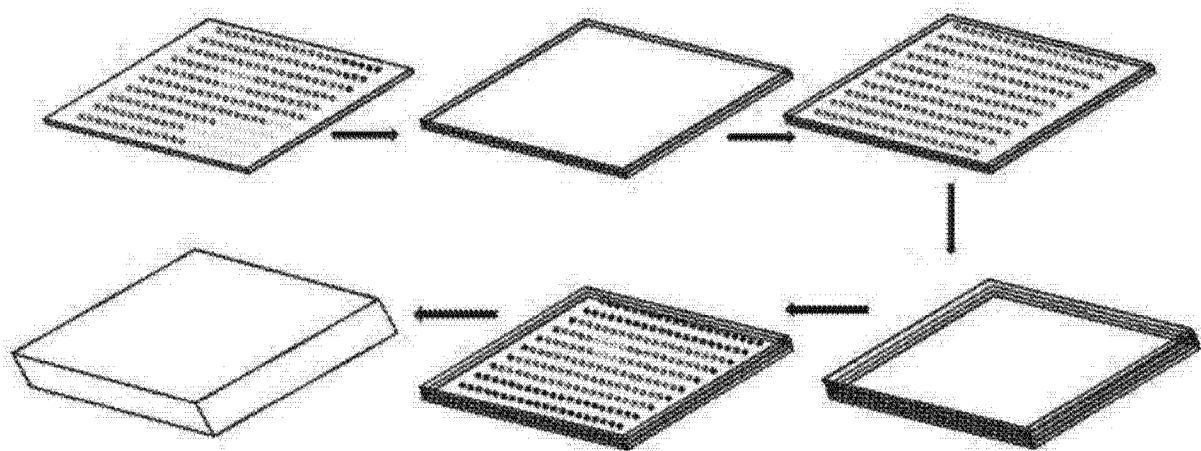


图 14

具有活性成分层和交错的CMC
层的CMC-实体的横截面

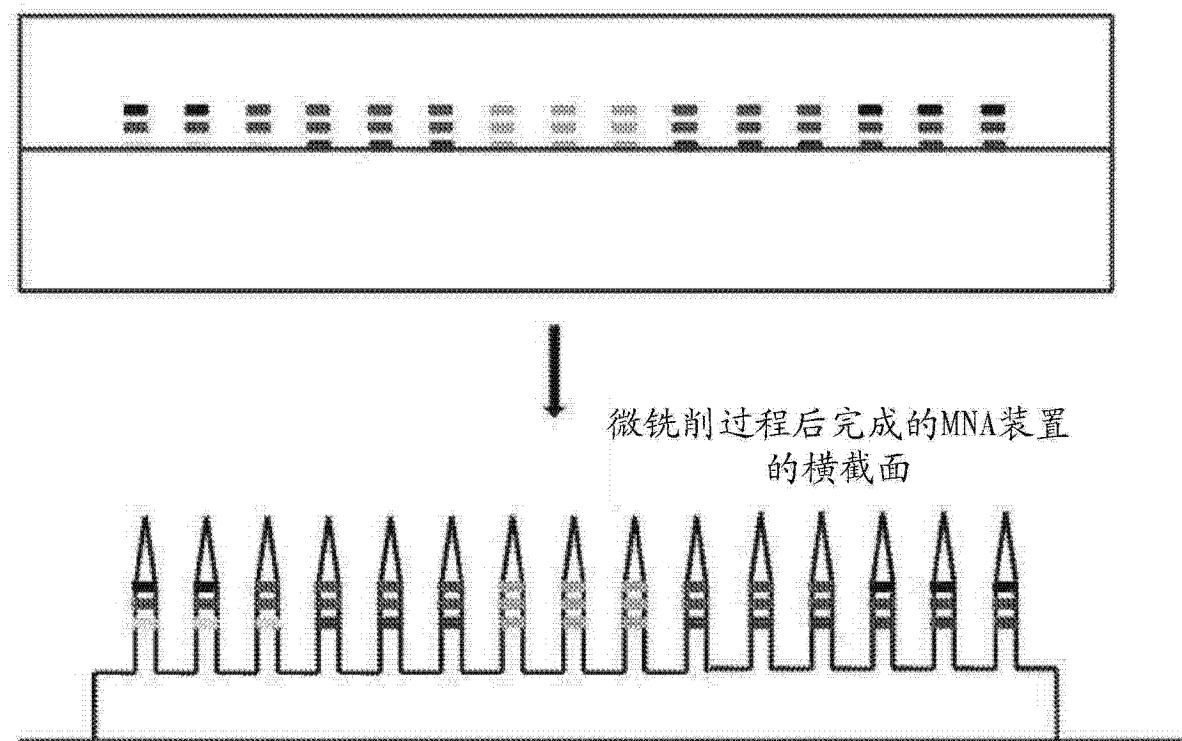


图 15

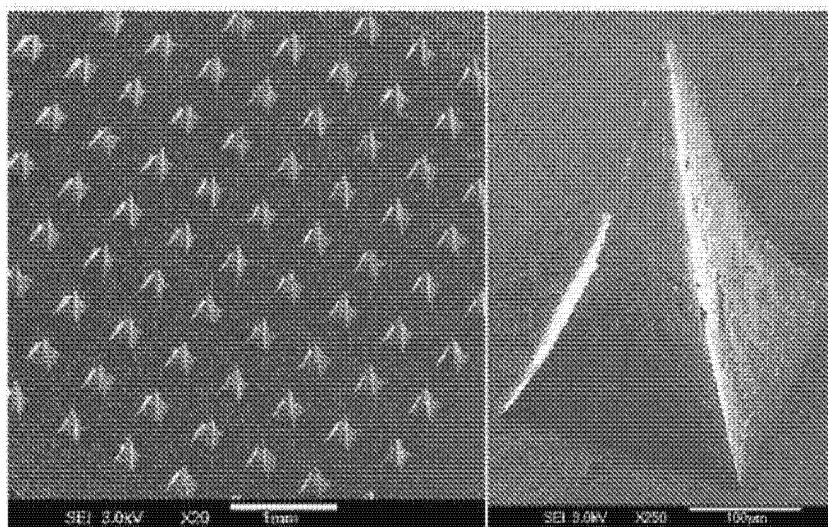


图 16A

图 16B

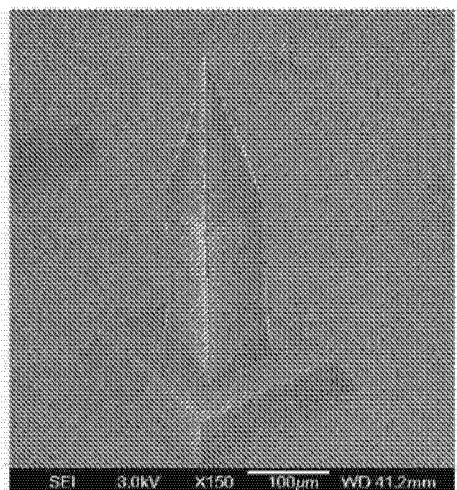


图 17

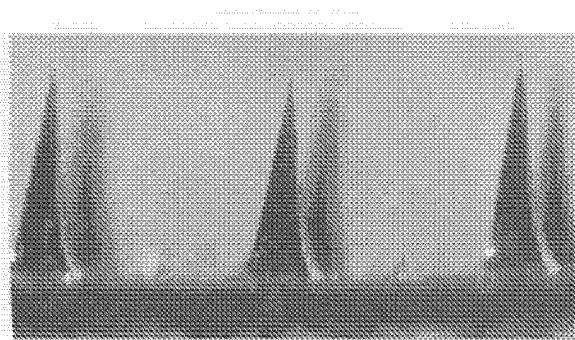


图 18

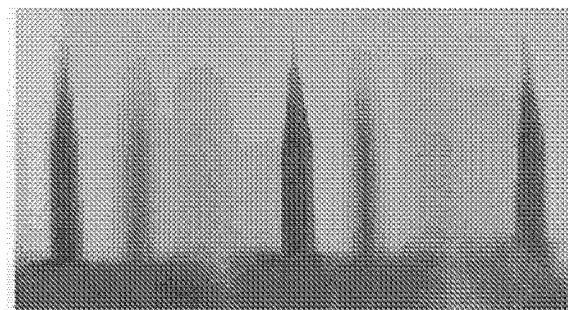


图 19

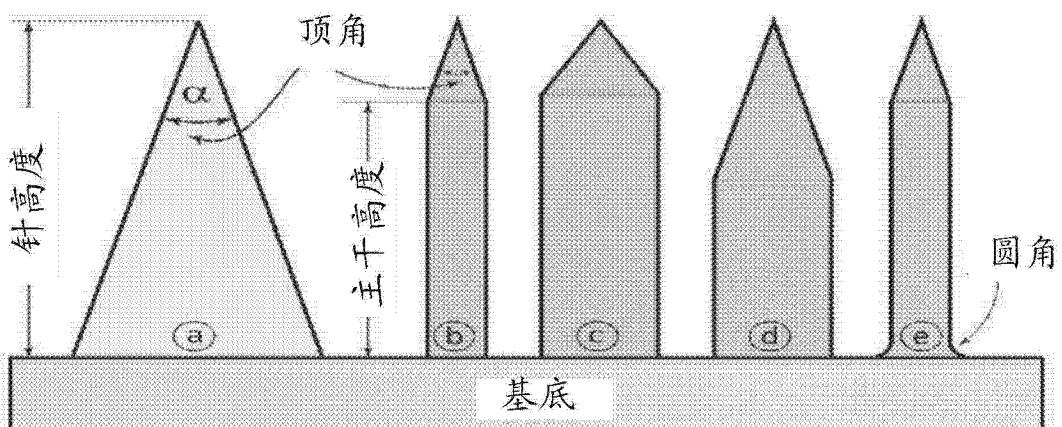


图 20

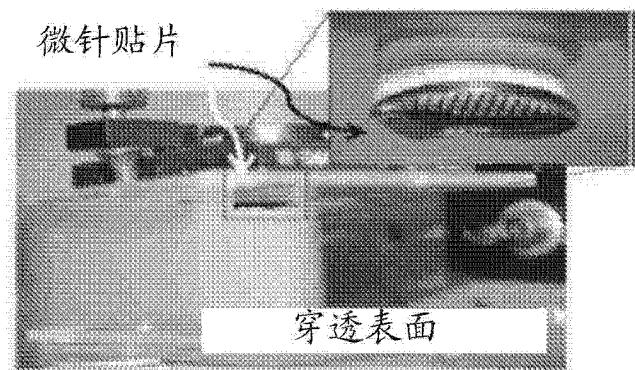


图 21

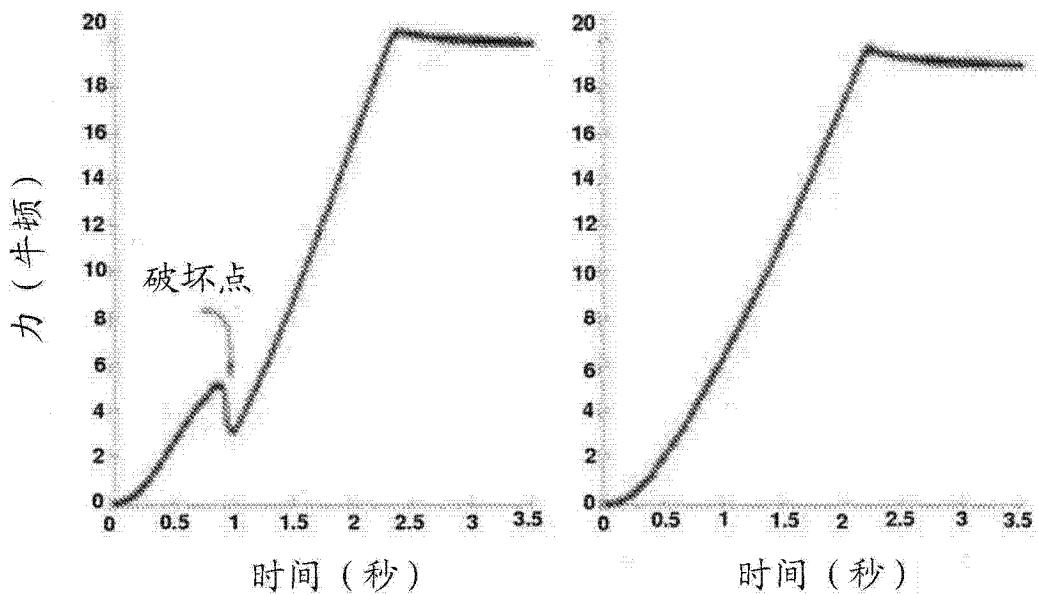


图 22

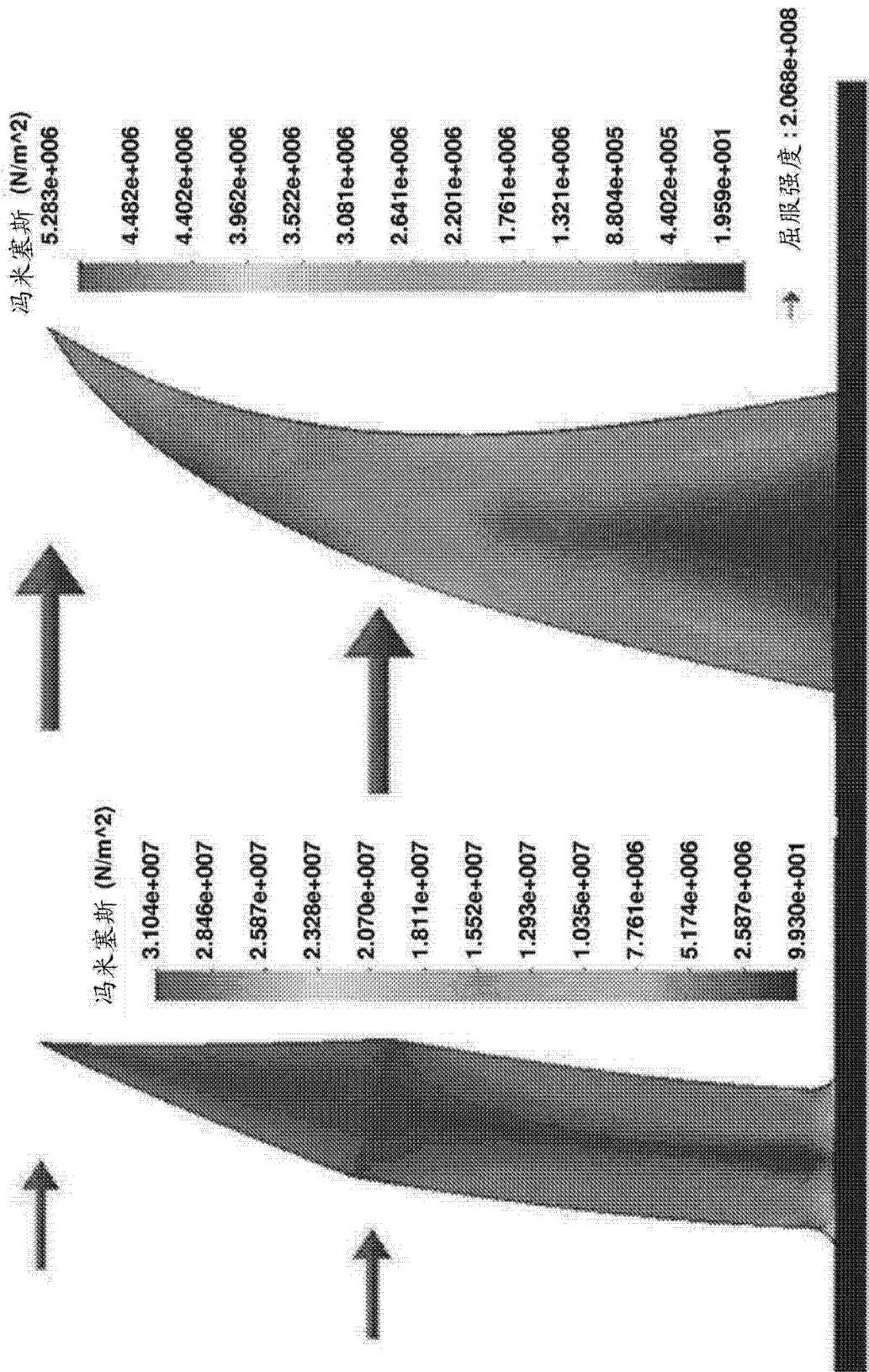


图 23

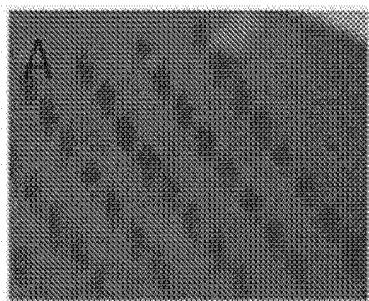


图 24A

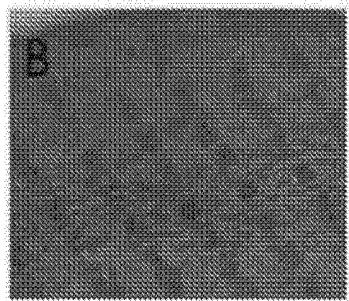


图 24B

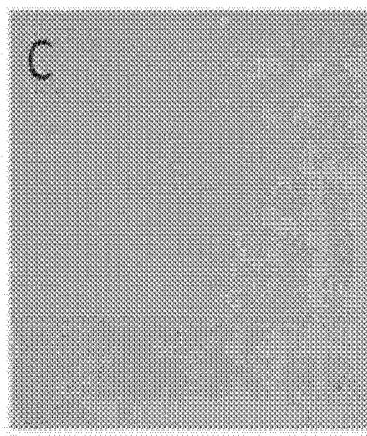


图 24C

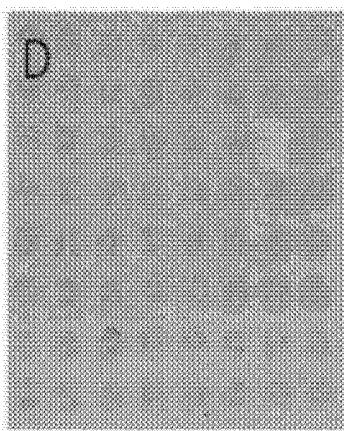


图 24D

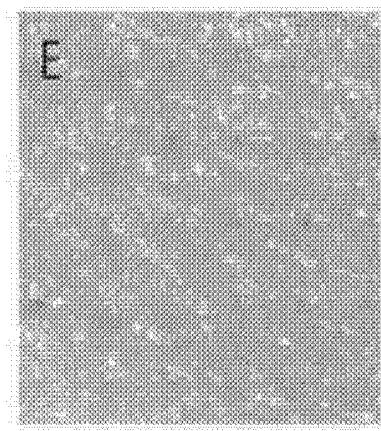


图 24E

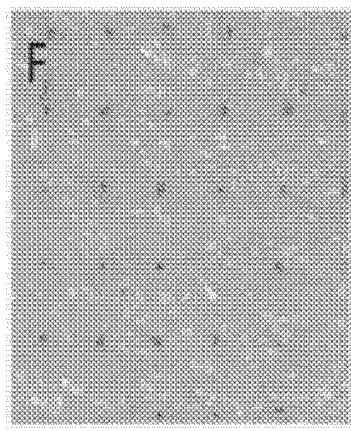


图 24F

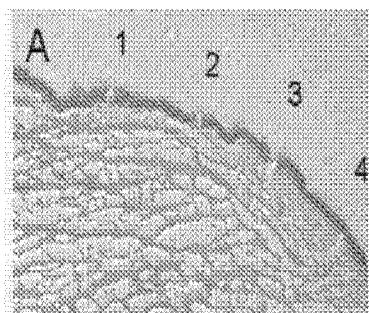


图 25A

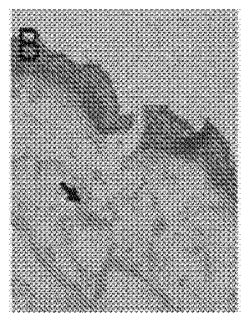


图 25B

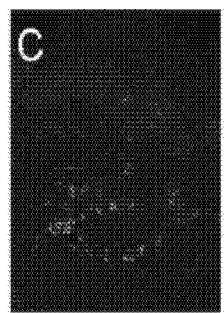


图 25C

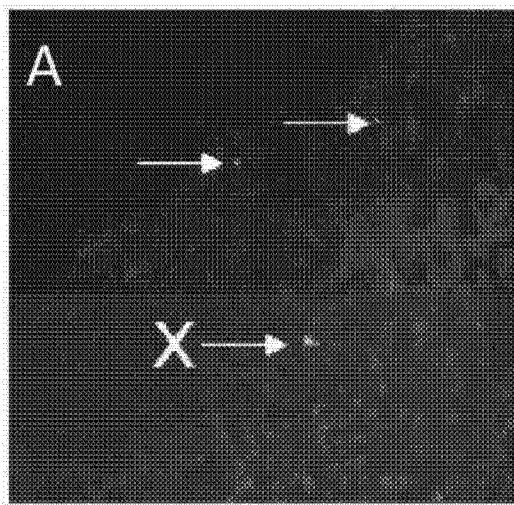


图 26A

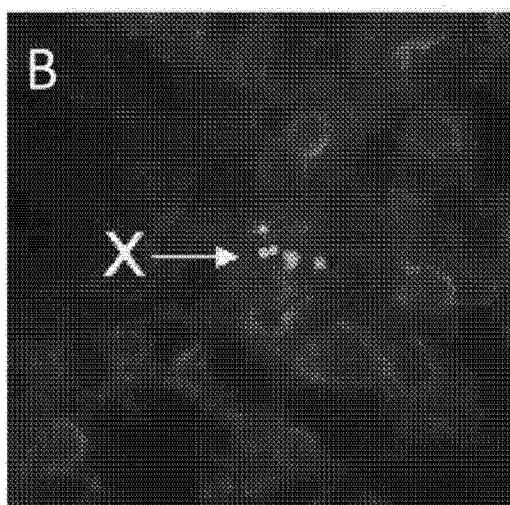


图 26B

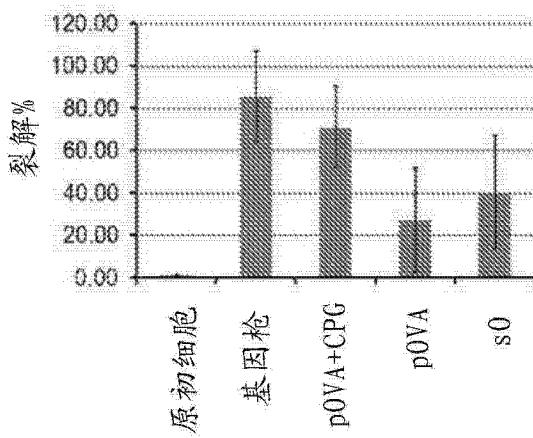


图 27

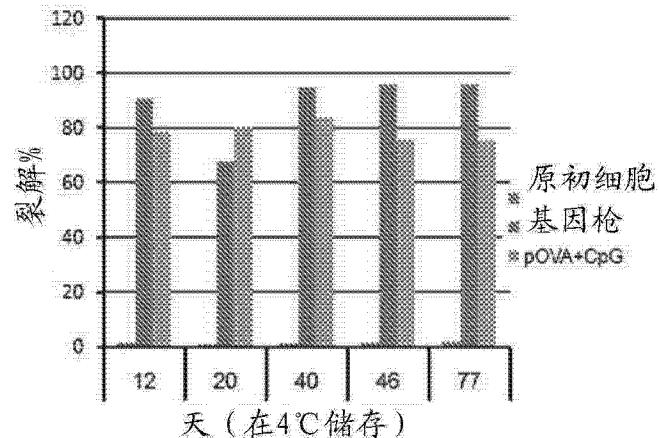


图 28

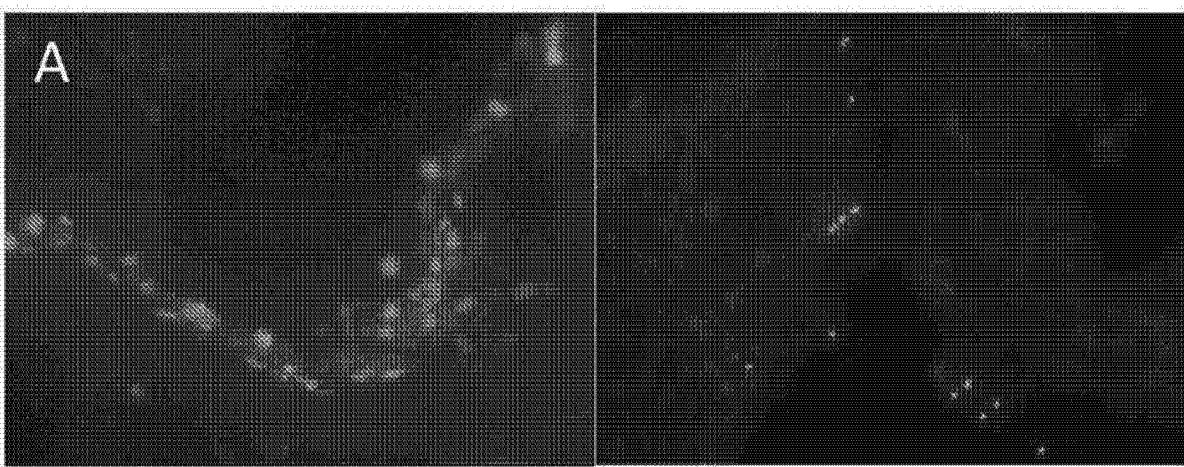


图 29A

图 29B

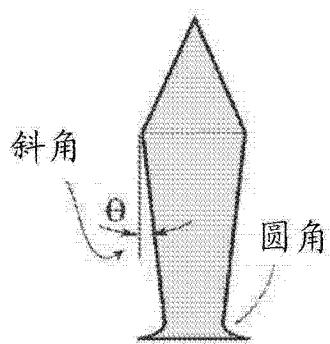


图 30

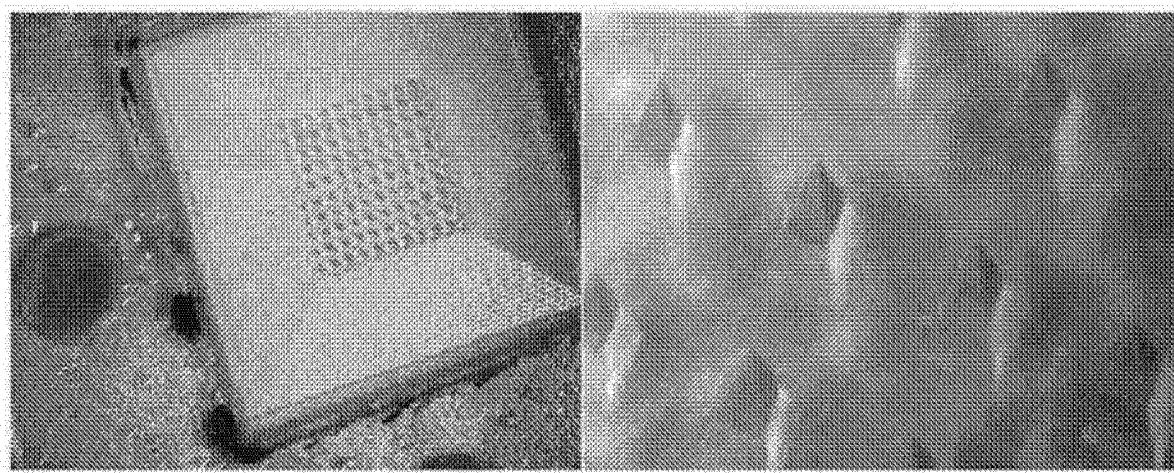


图 31

图 32

可垂直调节的铸造床壁 (b)

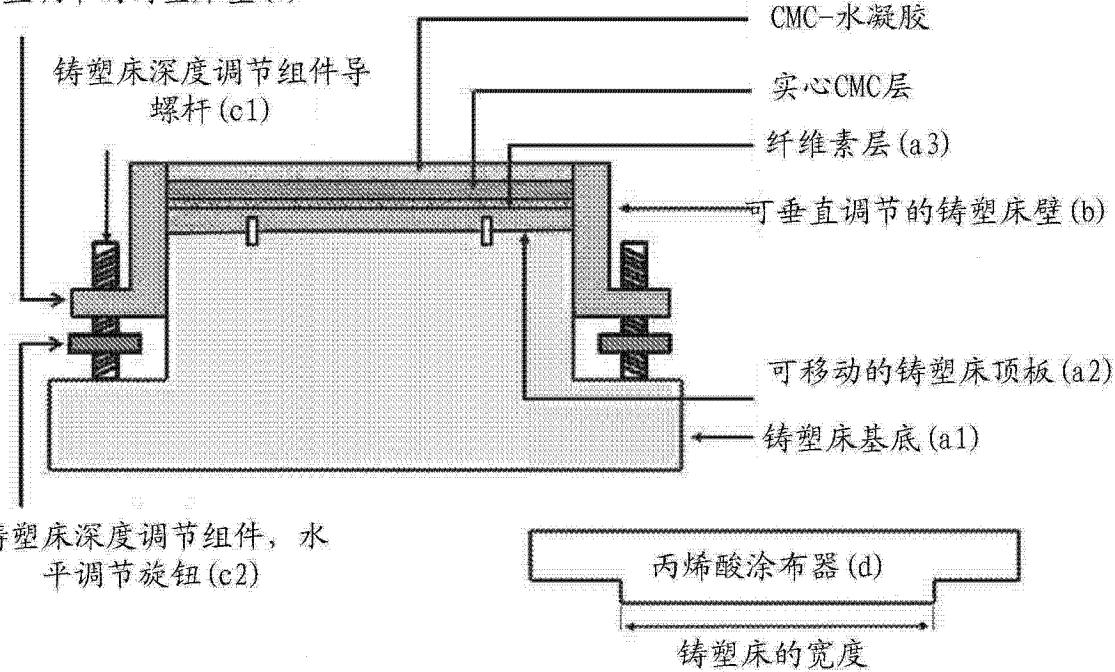


图 33

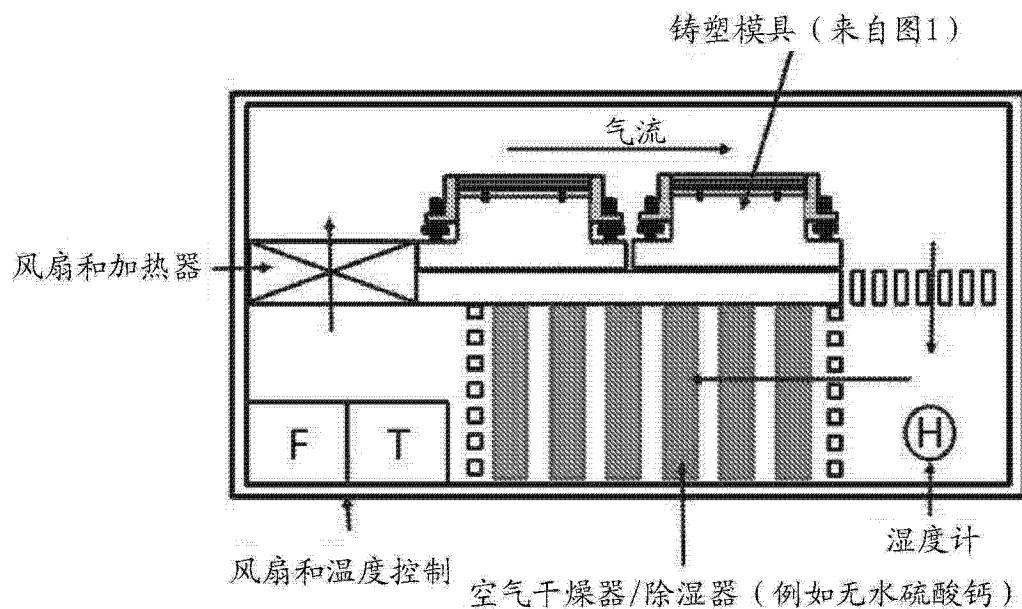


图 34

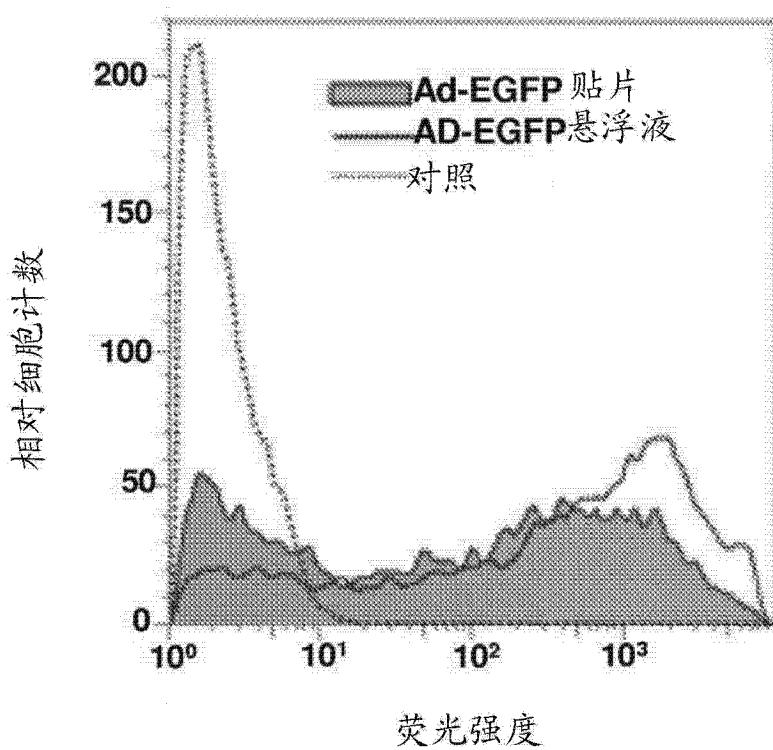


图 35

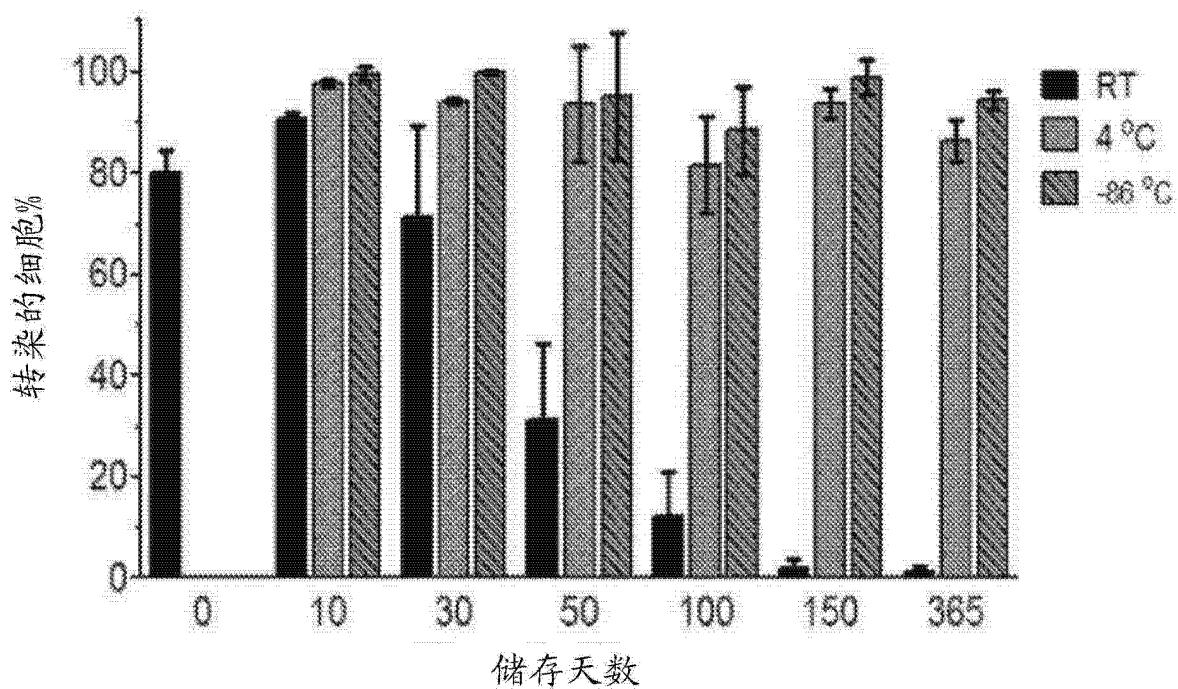


图 36

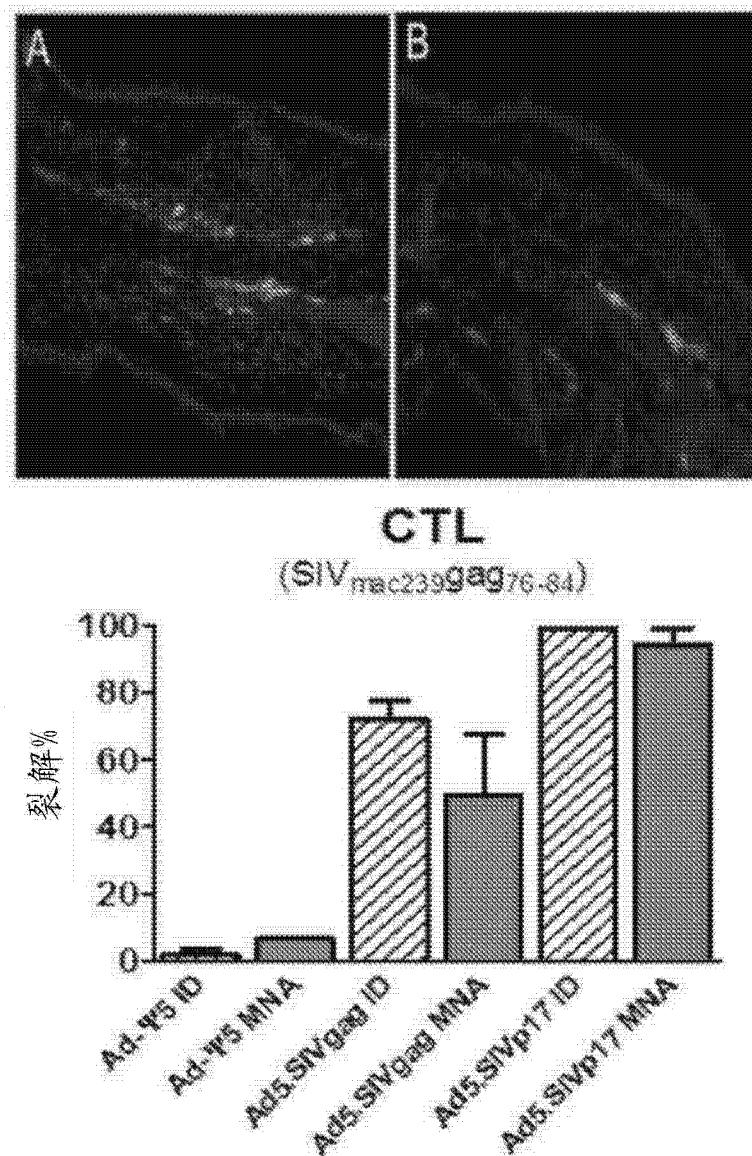


图 37

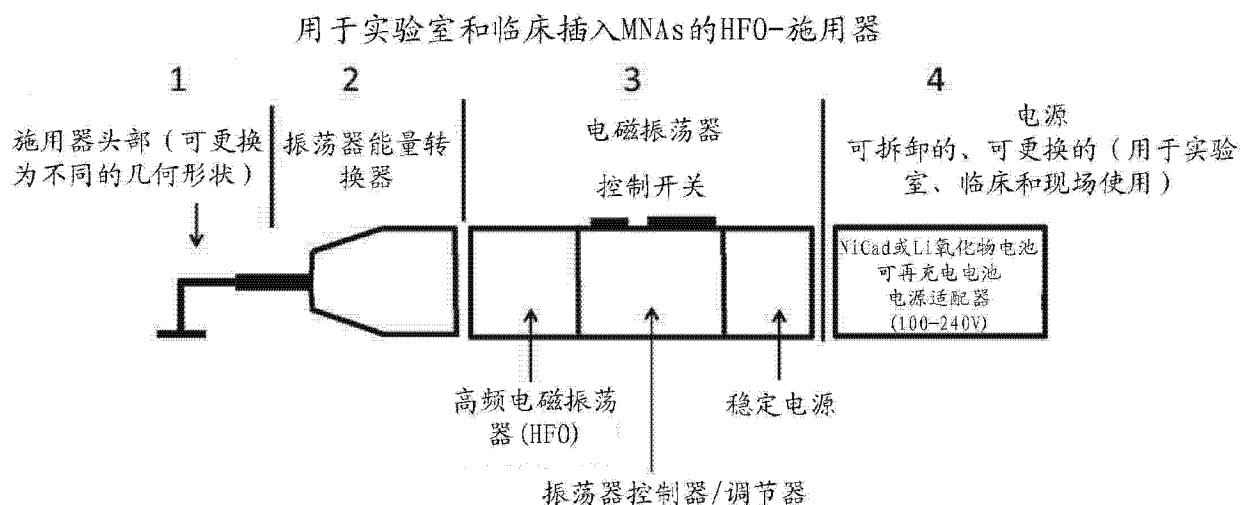


图 38

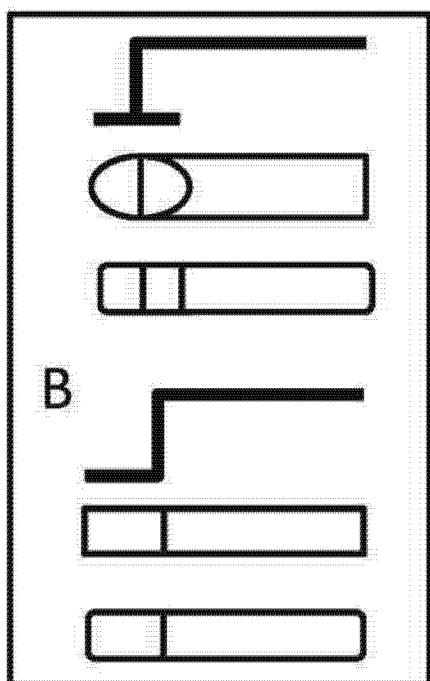


图 39

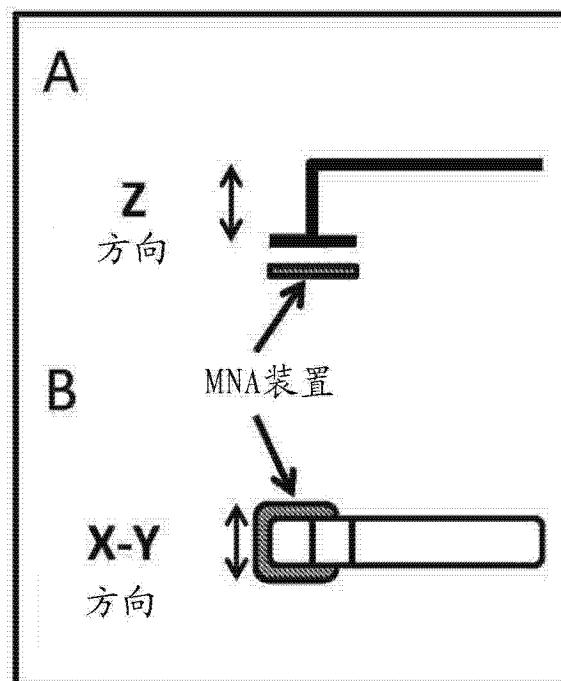


图 40