

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 623**

51 Int. Cl.:

<b>A61M 37/00</b>	(2006.01)
<b>B29C 41/36</b>	(2006.01)
<b>B81C 99/00</b>	(2010.01)
<b>B29C 41/42</b>	(2006.01)
<b>B29C 41/22</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/IB2012/052283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153266**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12726203 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2707080**

54 Título: **Método para la fabricación de una microaguja**

30 Prioridad:

**09.05.2011 GB 201107642**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.12.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CORK (100.0%)  
Office of Technology Transfer Western Road  
Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MOORE, ANNE y  
VRDOLJAK, ANTO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 647 623 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la fabricación de una microaguja

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para fabricar microagujas para la entrega percutánea de fármacos, vacunas u otros materiales. El método implica pre-llenar al menos parcialmente una cavidad de formación de agujas de un molde con un disolvente, antes de la aplicación de una composición de formación de microagujas. Una vez que se ha aplicado la composición, el disolvente y la composición pueden mezclarse, por ejemplo, como resultado de la difusión, después el disolvente puede retirarse y la microaguja resultante puede desmoldarse.

Antecedentes de la invención

15 La vía de entrega por defecto para la mayoría de las vacunas y los productos biológicos actuales, así como muchos fármacos, es la inyección usando agujas hipodérmicas y jeringas. Aunque su uso está bien establecido y es habitual, esta vía de aplicación tiene varios inconvenientes. La inyección de la aguja hipodérmica es dolorosa, requiere la implicación de personal capacitado, genera residuos punzantes peligrosos y, además, muchos de los productos requieren el almacenamiento y la distribución en cadena de frío.

20 Una alternativa a los sistemas de entrega basados en agujas hipodérmicas que es útil para algunos fármacos es el parche transdérmico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos sistemas solo son aplicables para la entrega de moléculas lipófilas y de bajo peso molecular que puedan atravesar espontáneamente la capa más externa de la piel, el estrato córneo.

25 Se han propuesto diversas plataformas de entrega basadas en microagujas como reemplazo de la vía hipodérmica actual en los casos en los que un parche transdérmico sencillo es ineficaz, tales como las descritas en Banga (2009) *Expert Opin Drug Deliv* 6(4): 343-54; Prausnitz et al. (2008) *Nat Biotechnol* 26(11): 1261-8 y Donnelly et al. (2010) *Drug Deliv* 17(4): 187-207. Las microagujas son proyecciones macizas o huecas de escala micrométrica que varían en altura normalmente en 50-700  $\mu\text{m}$  que perforan el estrato córneo y, por tanto, permiten o facilitan el transporte de fármacos y vacunas a través de la barrera cutánea en los casos en los que la administración transdérmica sencilla es ineficaz.

35 El concepto de matrices de microagujas para la administración de fármacos a través de la piel se propuso por primera vez en 1970, tal como en la Patente de los EE.UU. N.º 3.964.482. Desde entonces se han propuesto una serie de métodos para la producción de microagujas macizas, huecas o solubles. En los últimos años se propusieron varios métodos que describen la fabricación de microagujas poliméricas o de azúcar tales como aquellos en las patentes de los EE.UU. 6.451.240 y 6.945.952, el documento WO2002/064193A2; el documento WO2008/13058A2; Sullivan et al. (2008) *Advanced Materials* 20(5): 933-938; Raphael et al. (2010) *Small* 6(16): 1785-1793; Lee et al. (2011) *Biomaterials* 32(11): 3134-40.

45 El documento WO 2008/011625 describe un dispositivo para la liberación sostenida de fármaco a través o dentro de una barrera biológica, tal como la piel. El dispositivo puede incluir un sustrato de base que comprende un fármaco disperso en un material de matriz; y una o más microagujas que se prolongan desde el sustrato de base, en el que la una o más microagujas comprenden un material hidrosoluble o hinchable en agua, en el que la una o más microagujas se disuelven o se hinchan después de la inserción en la barrera biológica, proporcionando una vía de transporte para que el fármaco pase desde el sustrato de base a la barrera biológica.

50 Las microagujas poliméricas parecen ofrecer ciertas ventajas en comparación con otros tipos de microagujas. Esto se demuestra bien en varios informes sobre el uso de microagujas solubles hechas de azúcares o polímeros biocompatibles para la administración de vacunas, describiendo los informes recientes que la entrega de virus de la gripe inactivados es la más avanzada técnica e inmunológicamente hasta la fecha (Raphael et al. (2010) *Small* 6(16): 1785-1793; Sullivan et al. (2010) *Nat Med* 16(8): 915-20). La mayoría de los métodos actuales se basan en la producción de microagujas degradables relleno con la formulación un molde negativo (hembra) que tiene microdepresiones que definen la superficie de las microagujas y el posterior secado y/o endurecimiento del material.

55 Sin embargo, el relleno de las microcavidades del molde con la formulación líquida no es un proceso espontáneo debido a las dimensiones de escala microscópica de las cavidades, a la tensión superficial y, con frecuencia, a la alta viscosidad de la formulación líquida con la que se rellenan.

60 Se han empleado diversos métodos con el fin de rellenar las cavidades de agujas del molde con la formulación deseada. Los enfoques utilizados con más frecuencia son (a) aplicar una fuerza centrífuga sobre el molde con la formulación depositada sobre la parte superior del molde, tal como se describe en la patente de los EE.UU. 2011/0028905A1, (b) presurizar el molde con la formulación depositada sobre la parte superior del molde, tal como se describe en el documento WO2008/130587A2 y (c) someter a vacío el molde con la formulación depositada sobre la parte superior del molde, tal como se describe en Monahan et al. (2001) *Anal. Chem.* 73, 3193-3197. Estos

métodos permiten el rellenado uniforme de los pocillos con volúmenes extremadamente pequeños, lo que podría ser difícil de conseguir con otros métodos de rellenado tales como la microinyección directa, la impresión por chorro de tinta, el micropipeteo o usando un Picospritzer, como se analiza en Grayson et al. (2004) *PROCEEDING OF THE IEEE*, 92(1), 6-21.

Sin embargo, los métodos de fabricación para la producción de matrices de microagujas solubles descritos hasta la fecha tienen ciertas desventajas. Uno de los principales inconvenientes en los métodos de fabricación descritos de parches de microagujas solubles es la necesidad de aplicar grandes volúmenes de formulación sobre el molde de microagujas en la etapa de rellenado en la que solamente una fracción del volumen utilizado realmente rellena los agujeros de las agujas mientras que el resto permanece sin utilizar. Aunque teóricamente el exceso de la formulación que permanece sobre la superficie de los moldes puede reutilizarse, dicho enfoque de reciclaje puede implicar problemas de cumplimiento de acuerdo con el código de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, del inglés *Good Manufacturing Practice*) cuando el proceso se aumenta a escala a un nivel industrial. Este problema se acentúa especialmente en los métodos que emplean el rellenado por vacío ya que el disolvente de formulación podría evaporarse parcialmente durante la etapa de rellenado y cambiar su composición. Otros métodos tales como los métodos basados en la centrifugación son un reto en un aspecto de aumento a escala a un nivel industrial.

Además, los métodos descritos hasta la fecha en general requieren múltiples etapas de rellenado si se han de usar para el rellenado del volumen completo del cuerpo de la aguja con cualquier formulación que pierda volumen tras el secado, tal como todas las formulaciones a base de agua. Esto ocurre cuando el volumen de formulación colocado inicialmente en la cavidad de la aguja disminuye debido a la pérdida de agua (o cualquier otro disolvente) como resultado de la evaporación del disolvente. Esto dará lugar a agujas solo parcialmente rellenas y el proceso de rellenado tendría que repetirse para rellenar el resto de la cavidad de la aguja. Si se repite, sin embargo, la etapa de llenado podría dar como resultado la disolución parcial/secado recurrente de la formulación ya entregada en la primera etapa. Dicha disolución/secado repetido podría dañar algunos principios activos sensibles tales como proteínas y virus.

Otra desventaja potencial de los métodos de fabricación actuales como se describen es la necesidad de usar una capa de soporte en las que están incrustadas las microagujas. Esta capa de soporte se usa normalmente para fijar y conectar microagujas individuales en una matriz compacta. Aunque en ciertas aplicaciones la capa de soporte también puede contener un principio activo, por lo general es farmacológicamente irrelevante y solo es una necesidad de diseño que no desempeña ningún papel activo en el proceso real de entrega de fármaco. Sin embargo, hacer una capa de soporte se suma a la complejidad del proceso de fabricación y control de calidad y, por tanto, aumenta el coste. Por tanto, métodos de fabricación que omiten el requisito de una capa de soporte podrían simplificar el proceso de producción.

Otra limitación más de la mayoría de los métodos basados en moldes actuales es que todo el parche de microagujas eficazmente tiene que ser uniforme, es decir, todas las agujas son iguales en la composición. Sin embargo, la generación de parches heterogéneos que contienen microagujas individuales que están compuestas de diferentes materiales y que contienen diferentes componentes activos, puede ser beneficiosa en ciertas aplicaciones. Por ejemplo, varios componentes activos pueden no ser mutuamente compatibles en la misma formulación o pueden requerir diferentes formulaciones para su estabilización, o puede requerirse una reacción deseada entre ellos solo tras la entrega en la piel, por ejemplo, una interacción enzima-sustrato. Además, en el caso de algunas formulaciones de fármaco/vacuna en las que los componentes no pueden mezclarse en una única solución, este método superaría el requisito de que se rellenen múltiples componentes en viales separados ya que cada fármaco/vacuna podría incluirse en el mismo dispositivo de entrega de vacunas en microagujas individuales aisladas.

Un enfoque teórico para eludir al menos algunos de los inconvenientes descritos del método actual sería depositar la formulación líquida de interés directamente dentro de cada cavidad de aguja del molde, como se analizó en teoría en el documento WO2008/130587A2. Sin embargo, dada la precisión a escala micrométrica necesaria para dichos dispositivos de dispensación y los moldes respectivos, así como los problemas de tensión superficial y viscosidad de las formulaciones, este enfoque no parece ser una opción viable en el estado actual de la tecnología. Según el conocimiento de los presentes inventores, hasta la fecha no se ha hecho ningún dispositivo funcional de este tipo por las razones anteriores.

Aparte de los métodos basados en el molde para la producción de microagujas solubles, se han descrito varios enfoques no basados en moldes, tal como en Lee et al. (2011) *Biomaterials* 32(11):3134-40. Sin embargo, estos métodos se basan en el uso de altas temperaturas durante el proceso de fabricación (> 100 °C), lo que es incompatible con componentes biofarmacéuticos frágiles tales como proteínas y virus. Como alternativa, se han descrito métodos que tienen como objetivo potenciar el secado o curado de la formulación que contiene el fármaco (documento EP228309), sin embargo, estos métodos todavía se basan en métodos de llenado descritos anteriormente, tales como la centrifugación u otras fuerzas físicas.

Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo método que supera el problema del rellenado parcial del molde, sin la necesidad de aplicar una fuerza centrífuga sobre el molde, presurizar el molde o someter a vacío el molde.

5 Ellos han descubierto que si el molde se pre-rellena con el disolvente, antes de la aplicación de una composición de formación de microagujas, la composición rellena adecuadamente el molde, produciendo una microaguja completa.

10 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la fabricación de una microaguja usando un molde (2) que tiene una cavidad de formación de la aguja, caracterizado porque el método comprende las etapas de (a) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja con un disolvente (1), (b) aplicar una composición de formación de microagujas (3) a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el disolvente (1), (c) permitir que el disolvente y la composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión, (d) retirar el disolvente y (e) desmoldar la microaguja.

15 El método puede usarse para la fabricación de una microaguja con un cuerpo de la aguja formado por dos materiales de composición, mediante el uso de un método que comprende las siguientes etapas:

- 20 (a) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja con un primer disolvente,
- (b) aplicar una primera composición de formación de microagujas a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el disolvente, en el que la primera composición de formación de microagujas se aplica en una cantidad para rellenar parcialmente la cavidad de la aguja después de la retirada del disolvente;
- 25 (c) dejar que el primer disolvente y la primera composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión;
- (d) retirar el primer disolvente;
- 30 (e) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja restante con un segundo disolvente,
- (f) aplicar una segunda composición de formación de microagujas a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el segundo disolvente;
- 35 (g) permitir que el segundo disolvente y la segunda composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión;
- (h) retirar el segundo disolvente; y
- 40 (i) desmoldar la microaguja,

formando de este modo una microaguja con un cuerpo hecho de dos materiales de composición diferentes.

45 El disolvente puede rellenar el molde mediante la pulverización de gotitas atomizadas de disolvente directamente dentro de la cavidad de formación de la aguja.

La composición de formación de microagujas puede aplicarse a la cavidad de formación de la aguja en una cantidad que exceda el volumen de la cavidad tras la retirada del disolvente, de manera que un disco de material seco se forma aproximadamente la base de microagujas a la retirada del disolvente.

50 La composición de formación de microagujas puede secarse a temperatura ambiente.

El disolvente puede retirarse por evaporación.

55 En una primera realización de este aspecto de la invención, la composición de formación de microagujas forma un material soluble después del secado, de manera que cuando la microaguja se aplica a la piel u otro tejido de un sujeto, se disuelve.

60 En relación con esta realización, la composición de formación de microagujas puede comprender un principio activo, de manera que cuando la microaguja se disuelva después de la aplicación a la piel, el principio activo se entregue en el tejido subyacente del sujeto.

65 El material soluble puede ser o comprender uno o una combinación de materiales seleccionados entre el siguiente grupo: polímeros, hidratos de carbono, celulósicos, azúcares, polioles o ácido algínico o un derivado del mismo.

El material soluble puede comprender uno o una combinación de materiales seleccionados entre los siguientes: alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), rafinosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, glicerina, CMC y alginato de sodio.

5 El disolvente utilizado para la dispersión del material soluble puede ser, por ejemplo, agua, alcohol C2-C8 o un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes.

El principio activo puede ser un agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico.

10 El principio activo puede ser un fármaco o vacuna.

El principio activo puede seleccionarse entre el siguiente grupo: un anticuerpo, un virus o vector vírico vivo o inactivado, una bacteria, proteína, glicoproteína, lípido, oligosacárido, polisacárido, nucleótidos, oligonucleótidos, ADN o ARN.

15 El principio activo puede ser termolábil.

El material soluble puede comprender un adyuvante de vacuna.

20 Cuando se usa el método para fabricar una microaguja con un cuerpo de la aguja formado por dos materiales de la composición, las composiciones de formación de microagujas primera y segunda pueden comprender principios activos iguales o diferentes.

25 Cuando el método se usa para fabricar una microaguja con un cuerpo de la aguja formado por dos materiales de la composición, el primer material de la composición de formación de microagujas puede formar una punta de microaguja con una alta resistencia mecánica y la segunda composición de formación de microagujas puede formar una porción por debajo de la punta de baja resistencia mecánica.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención para formar una matriz de microagujas, mediante el uso de un molde que tiene una pluralidad de cavidades de formación de agujas, de manera que se fabrica una pluralidad de microagujas.

35 El método puede usarse para formar una matriz de microagujas heterogénea, mediante el uso de una pluralidad de diferentes composiciones de formación de microagujas, aplicándose cada composición a un subconjunto de las cavidades de formación de agujas.

40 Cuando el método se usa para fabricar una microaguja con un cuerpo de la aguja formado por dos materiales de la composición, las composiciones de formación de microagujas primera y/o segunda pueden entregarse sucesiva o simultáneamente en diferentes cavidades de microagujas del mismo molde formando de este modo una matriz de microagujas heterogénea.

La microaguja y/o la matriz pueden desmoldarse mediante la adhesión a una superficie adhesiva aplicada sobre la parte superior del molde relleno y tirando de las microagujas fuera del molde.

45 Por ejemplo, puede usarse cinta adhesiva flexible adecuada para la aplicación sobre la piel humana y/o animal para el desmoldeo.

50 También se describe en el presente documento una microaguja. La microaguja puede fabricarse mediante un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

También se describe en el presente documento una matriz de microagujas. La matriz de microagujas puede fabricarse mediante un método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

55 Dentro de la matriz, cada aguja puede ser independiente y estar separada de otras agujas por un área de adhesivo.

Esto es resultado del método de fabricación, donde cada microaguja se forma aisladamente en el molde y está en pie individualmente, de manera que cuando se aplica el adhesivo se transfiere individualmente en al adhesivo. Esta configuración es distinta de otros tipos de matriz de microagujas donde todas las microagujas están incrustadas en una capa de soporte.

60 La matriz de microagujas puede ser heterogénea en el sentido de que comprende al menos dos subconjuntos de microagujas que tienen diferentes composiciones. Las microagujas de un subconjunto dado pueden agruparse juntas sobre la matriz, para formar "parches" de microagujas de una composición dada.

65

También se describe en el presente documento un método para entregar un principio activo a un sujeto, que comprende la etapa de aplicar a un sujeto una matriz como se ha descrito anteriormente, que comprende el principio activo disperso en al menos parte del cuerpo de la microaguja, de manera que el principio activo se entregue al tejido subyacente del sujeto. La matriz puede, por ejemplo, aplicarse a la piel, de manera que perfora el estrato córneo del sujeto.

También se describe en el presente documento un dispositivo que comprende una microaguja o matriz de microagujas como se ha descrito anteriormente.

También se describe en el presente documento un kit para su uso en un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende una composición de formación de microagujas y uno o más de los siguientes: (a) un molde de formación de microagujas, (b) un aparato para la entrega precisa de material de la composición a las cavidades del molde, (c) una cámara de secado y (d) una cinta adhesiva adecuada para el desmoldeo.

El método de la presente invención tiene varias ventajas con respecto a los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo:

(i) el método permite el relleno completo del molde de microagujas, produciendo de este modo microagujas completas que son lo suficientemente afiladas para perforar un tejido del tejido corporal, tal como el estrato córneo, para acceder al tejido subyacente de un sujeto.

(ii) el método evita la necesidad de aplicar grandes volúmenes de formulación sobre el molde de microagujas en la etapa de relleno en la que solamente una fracción del volumen utilizado realmente rellena los agujeros de las agujas mientras que el resto permanece sin usar;

(iii) el método permite que se hagan matrices de microagujas en una única etapa de relleno sin la necesidad de reciclar material de formulación;

(iii) el método facilita la preparación de matrices de microagujas heterogéneas;

(iv) el método evita etapas de disolución/secado repetidas y el uso de altas temperaturas asociadas a algunos enfoques anteriores, que son inadecuados para principios activos termolábiles.

(v) el método permite el uso de una capa de soporte (en la que las microagujas están incrustadas) separada, en lugar de integral, que simplifica el proceso de producción;

(iv) el método es simple, fácil de aumentar a escala y ha incrementado el potencial para ser compatible con las GMP.

#### Descripción de las figuras

Fig. 1. Diagrama esquemático de un proceso de fabricación de una matriz de microagujas solubles. (A) Se aplicó agua (1) a un molde de PDMS (2) al vacío o por pulverización. (B) El exceso de agua se retiró de la superficie usando una cuchilla afilada. (C y D) La solución de fármaco concentrada se aplicó directamente sobre la parte superior de las cavidades de las agujas (3). (E) La concentración de la solución de fármaco se equilibró en la ampolla y la cavidad de la microaguja superiores como resultado de la difusión entre la formulación altamente concentrada en el bulbo y el agua en las cavidades. (F) La solución de fármaco se secó. (G) Se aplicó cinta adhesiva flexible (4) sobre la parte superior del molde para que se adhiriera a las bases de las agujas y se levantó (H) proporcionando (I) una matriz de microagujas solubles rellenas de fármaco lista para su aplicación.

Fig. 2. Diagrama esquemático de un proceso de fabricación de una matriz de microagujas solubles con formulación concentrada en las puntas de las agujas. (A) Se aplicó agua (1) a un molde de PDMS (2) al vacío o por pulverización. (B) El exceso de agua se retiró de la superficie usando una cuchilla afilada. (C y D) Se aplicó una pequeña cantidad de solución de fármaco concentrado en agua directamente sobre la parte superior de las cavidades de las agujas. (E) La concentración de la solución de fármaco se equilibró en la ampolla y la cavidad de la microaguja superiores como resultado de la difusión entre la formulación altamente concentrada en el bulbo y el agua en las cavidades. (F) La solución de fármaco se secó para proporcionar la formulación concentrada en las puntas de las agujas. (G) Se aplicó un segundo disolvente (etanol al 96 %) a un molde y (H) el exceso se retiró usando una cuchilla afilada. (I y J) Se añadió solución de polivinilpirrolidona (PVP) en etanol al 96 % (6) sobre la parte superior de la formulación seca y se secó. (K) Se aplicó cinta adhesiva flexible sobre la parte superior del molde para que se adhiriera a las bases de las agujas y se levantó (L) proporcionando una matriz de microagujas solubles rellenas de fármaco en las puntas de las agujas y una base de soporte dura hecha de PVP (M).

Fig. 3. Secado de la formulación de fármaco hecha gotear sobre un molde de PDMS pre-rellenado con agua. La formulación que consiste en trehalosa al 50 % (p/v) y azul de metileno entregada sobre la parte superior de un molde de PDMS pre-rellenado con agua se seca en aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. La segunda imagen también muestra que la difusión de la formulación desde el bulbo superior a la cavidad de las microagujas parece estar completa incluso después de 1 min (las puntas de las agujas son de color azul lo que confirma que la difusión equilibró la concentración en la ampolla y la cavidad de la microaguja).

Fig. 4. Ejemplos de microagujas solubles. Matriz de microagujas homogénea (A1) y aguja individual (A2). Matriz heterogénea que contiene agujas hechas de dos formulaciones diferentes (B1) y parte ampliada (B2). Matriz de microagujas con formulación concentrada en las puntas de las agujas con base de PVP transparente (C1-C2). Agujas incompletas que se formarían si pre-rellenado de las cavidades de las agujas con agua se omitiese del procedimiento de fabricación (D1-D2).

Fig. 5. Estabilidad de adenovirus (AdV), virus de la viruela Ankara modificado (MVA) y lisozima incluidos en microagujas durante 14 días a temperatura ambiente. Se incluyeron AdV que codifica para la proteína fluorescente mCherry (A), MVA que codifica para la proteína RFP (B) y lisozima (C) en microagujas solubles hechas de trehalosa (AdV) o trehalosa/PVA (MVA y lisozima) y se dejaron a temperatura ambiente durante 14 días. El eje Y representa unidades equivalentes de log de UFP para AdV y MVA o porcentaje de actividad para la lisozima con barras de error que muestran la desviación típica.

Fig. 6. Cinética de la disolución de microagujas solubles con formulación concentrada en las puntas de las agujas. Se fabricaron matrices con agujas de 500  $\mu\text{m}$  de alto con las puntas de las agujas hechas de trehalosa con la adición de colorante rojo Congo y una base hecha de PVP con la adición de colorante azul de metileno. Después, las matrices se aplicaron sobre piel de cerdo cadavérico y se dejaron durante 1 s, 10 min y 60 min después de lo cual se obtuvieron imágenes usando un microscopio óptico.

Fig. 7. Transfección de la piel usando matrices de microagujas solubles con AdV- $\beta$ -gal (A) o MVA- $\beta$ -gal (B). Se aplicaron matrices de microagujas con agujas largas de 280  $\mu\text{m}$  que contienen ya sea AdV- $\beta$ -gal o MVA- $\beta$ -gal sobre piel de cerdo recién extirpada y después se examinó para determinar la expresión de  $\beta$ -galactosidasa.

Fig. 8. Inducción de anticuerpos contra el antígeno del toxoide tetánico debido a la vacunación con antígeno en matrices de microagujas solubles. Se formuló antígeno de proteína de toxoide tetánico con trehalosa y PVA ('T/P') y se incorporó en matrices con microagujas altos de 280  $\mu\text{m}$  o 500  $\mu\text{m}$ . Estas matrices se aplicaron a orejas de ratones (1 a cada oreja de cada ratón). Como controles, se inyectó toxoide tetánico en formulación ("ToxTet en T/PVA ID") o en PBS ("ToxTet en PBS ID") en forma de un líquido por vía intradérmica. Se determinaron los títulos séricos de anticuerpos anti-toxoide tetánico 3 semanas después de la inmunización por ELISA.

Fig. 9. Inducción de anticuerpos mediante un vector vírico de adenovirus recombinante que induce respuestas de anticuerpos al antígeno MSP-1 de *Plasmodium yoelii* codificado (Draper et al (2009) *Cell Host Microbe* 5, 95-105 y (2008) *Nat Med* 14, 819-21). Se formuló adenovirus recombinante vivo con trehalosa y se incorporó en matrices con microagujas de 280  $\mu\text{m}$  o 500  $\mu\text{m}$  de alto; denominadas 'DMN280  $\mu\text{m}$ ' y 'DMN500  $\mu\text{m}$ ' respectivamente. Estas matrices se aplicaron a orejas de ratones (1 a cada oreja de cada ratón). Como control, se inyectó adenovirus recombinante en forma de un líquido por vía intradérmica (ID). En el día 86 después de la sensibilización, todos los ratones se volvieron a inmunizar con la misma pauta de vacuna. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos contra el transgén recombinante, MSP-1, 8 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después de la inmunización de refuerzo mediante ELISA.

Fig. 10. Inducción de anticuerpos mediante una vacuna de la gripe estacional disponible clínicamente. Se formuló una vacuna antigripal inactivada trivalente estacional ('TIV'), recomendada para su uso en la campaña de inmunización en el hemisferio norte 2010/2011, con trehalosa y PVA y se incorporó en matrices con microagujas de 500  $\mu\text{m}$  de alto. Se incorporó en cada matriz un total del 1 % de la dosis humana total, equivalente a 0,15  $\mu\text{g}$  de cada antígeno de hemaglutinina (HA). Estas matrices se aplicaron a orejas de ratones (1 a cada oreja de cada ratón), dando como resultado la entrega de 0,3  $\mu\text{g}$  de cada HA a cada animal, lo que equivale a un total del 2 % de las dosis humanas completas. Como control, se inyectó un 10 % de una dosis humana completa de TIV (lo que equivale a 1,5  $\mu\text{g}$  de cada HA) se inyectó en forma de un líquido por vía intramuscular (IM). En el día 28 después de la sensibilización, todos los ratones se volvieron a inmunizar con la misma pauta de vacuna. Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos contra los antígenos de la vacuna el día 28 y el día 42 mediante ELISA.

Descripción detallada

Barreras biológicas

Los dispositivos de microagujas desvelados pueden aplicarse para el transporte de materiales dentro o a través de barreras biológicas tales como la piel (o partes de la piel), el tejido mucoso, membranas celulares u otras

membranas biológicas en seres humanos, animales o plantas. La aplicación normal de los dispositivos desvelados es para la entrega de materiales dentro o a través de la piel. La piel de mamífero puede subdividirse en tres capas; el estrato córneo (EC); en los seres humanos éste tiene 10-20 µm de profundidad, la epidermis viable, que es de 50-100 µm en los seres humanos, y la dermis, que es de 1-3 mm en los seres humanos. La capa más externa, el estrato córneo está compuesto de queratinocitos muertos estrechamente compactados incrustados en una matriz lipídica intercelular altamente organizada que forma una barrera que es impermeable a microbios y moléculas grandes tales como antígenos de vacuna. Es esta capa exterior la que limita la entrega transdérmica sin ayuda satisfactoria.

10 Microagujas

Los dispositivos de microagujas desvelados en el presente documento incluyen matrices o parches utilizados para la entrega de un principio activo a través del estrato córneo de la piel o para la retirada o el muestreo de fluido de la piel o los intersticios. Consisten en una base sustancialmente plana, sobre la que se monta una pluralidad de microagujas en la que no necesariamente todas las microagujas están hechas de los mismos materiales ni llevan necesariamente el mismo principio activo. Tras la aplicación a la piel, las microagujas se prolongan a través del estrato córneo dentro de la epidermis o más profundamente dentro de la dermis subyacente donde el principio activo se libera o el tejido se controla o se muestrea.

20 Los métodos de aplicación de las microagujas sobre la piel pueden variar desde el movimiento de rodadura único a la presión del parche de forma sustancialmente vertical sobre la piel con o sin el uso de dispositivos especiales, esencialmente como se describe en Haq et al. (2009) *Biomed Microdevices* 11:35-47.

La microaguja tiene una resistencia mecánica suficiente para penetrar en el estrato córneo.

25 La pluralidad de microagujas se dispone sobre una matriz o parche ya sea en una sola fila o como una matriz bidimensional. El parche o matriz de microagujas puede proporcionarse como un solo parche con las dimensiones de, por ejemplo, entre 3-15 mm x 3-15 mm. Como alternativa, una lámina de soporte puede contener un mayor número de parches que posteriormente pueden cortarse en parches individuales del tamaño requerido. Una matriz individual puede contener de 10 a 1000 o más microagujas, por ejemplo 25-100 por parche.

30 La forma de las microagujas se diseña para permitir la penetración satisfactoria dentro de la piel. Los ejemplos incluyen microagujas con forma cónica o piramidal, como se describe en Wilke et al. (2005 *Microelectronics Journal* 36:650-656). Por lo general, se requiere una punta de la aguja afilada para penetración de la piel satisfactoria. Dichas formas son bien conocidas en el campo.

Métodos de fabricación de microagujas solubles

40 Los dispositivos de microagujas desvelados en el presente documento se hacen mediante el rellenado controlado de las cavidades que corresponden al negativo de las microagujas con el material biocompatible para formar las microagujas y retirarlas de una manera controlada para formar una matriz de microagujas listo para su aplicación. Todo el procedimiento de hacer la matriz de microagujas puede realizarse a una temperatura ambiente o más baja, por lo que es adecuado para su uso con sustancias termosensibles.

45 Moldes de microagujas

50 En el presente documento se usan moldes maestros de microagujas para la fabricación de moldes negativos (hembra) que tienen microdepresiones que definen la superficie de las microagujas. Los moldes maestros de microagujas pueden hacerse de una diversidad de materiales. Los materiales de construcción adecuados incluyen silicio, dióxido de silicio, acero de calidad farmacéutica, titanio, oro, níquel, hierro, estaño, cromo, cobre y aleaciones de estos metales, polímeros tales como policarbonato, ácido polimetacrílico, acetato de etilenvinilo, poliésteres.

55 Pueden usarse otros polímeros biodegradables tales como ácido láctico y polilactida de ácido glicólico, poliglicolida, polilactida-co-glicólida, así como poliuretanos y otros polímeros biodegradables. También pueden usarse otros materiales tales como cualquiera de los monosacáridos, disacáridos o polisacáridos. Al igual que en la presente invención, el molde maestro se usa solamente para la fabricación del molde hembra y no para la aplicación a la piel, las matrices maestras no necesariamente poseen la rigidez necesaria por lo general para la aplicación a la piel. Esto permite que los moldes maestros estén hechos de una gama más amplia de materiales que normalmente no poseen una alta rigidez.

60 Los moldes maestros microagujas consisten en la pluralidad de microagujas que puede tener una longitud de entre 50 y 1000 µm. Las microagujas pueden tener una relación de aspecto (altura a diámetro en la base) de al menos 3:1 a al menos 1:1 o inferior. Son formas adecuadas los tipos de agujas cónicas y piramidales en los que el diámetro de la aguja disminuye con la distancia desde la base que termina en una punta afilada. Se muestran otras formas de microproyección posibles, por ejemplo, en el documento WO2003 /024518.

Moldes

5 Los moldes hembra utilizados para formar microagujas mediante métodos desvelados en el presente documento pueden hacerse de una matriz de microagujas maestra macho usando una diversidad de métodos y materiales. Los materiales adecuados incluyen, por ejemplo, materiales cerámicos, caucho de silicona, cera, poliuretano, polidimetilsiloxano (PDMS) u otros materiales que puede tomar y mantener fielmente la forma negativa del molde de agujas maestro.

10 Una forma de hacer moldes es mediante el vaciado del material líquido apropiado sobre una matriz de microagujas maestra macho. Dichos materiales pueden secarse y endurecerse manteniendo de este modo la forma negativa de la matriz maestra. El polidimetilsiloxano y el poliuretano son ejemplos de materiales adecuados para este método de fabricación de moldes y se usan habitualmente para este proceso.

15 Otra forma de hacer moldes es a partir de materiales que funden a temperatura elevada lo que les permite ser vaciados sobre el molde maestro. Después de enfriarse dichos materiales conservan la forma negativa del molde maestro. Como alternativa, la matriz de microagujas maestra macho puede presionarse sobre los materiales ablandados para hacer una matriz negativa. Diversas ceras y termoplásticos son ejemplos de los materiales adecuados para este método de fabricación de moldes.

20 Otros métodos de fabricación de moldes de microagujas incluyen la perforación directa de las cavidades en el material del molde, por lo general mediante el uso de láseres, métodos de grabado por iones reactivos o descarga electrostática, dependiendo del material del molde.

25 Los moldes pueden ser reutilizables o de un solo uso. Opcionalmente, los moldes pueden esterilizarse antes de su uso usando técnicas de esterilización conocidas, tales como la esterilización en autoclave o por radiación gamma. La elección del método de esterilización depende del material del molde.

Micromoldeo

30 Las matrices de microagujas pueden hacerse por micromoldeo, proporcionando un molde que tiene una microdepresión que define la superficie de la microaguja, llenando la microdepresión con material de moldeo y moldeando el material para formar una microaguja. El principio o principios activos pueden incluirse en la composición de las microagujas moldeadas.

35 El método de la presente invención puede comprender las siguientes etapas:

(a) proporcionar un molde con cavidades que corresponden al negativo de las microagujas,

40 (b) llenar las cavidades con agua u otro disolvente,

(c) aplicar la formulación concentrada que contiene material de interés de forma individual sobre la parte superior de cada cavidad de la aguja y en contacto con disolvente que ya está en la cavidad,

45 (d) mezcla y difusión espontánea entre la formulación entregada y el disolvente con el que se rellenaron previamente las cavidades,

(e) retirar el disolvente y desmoldar las microagujas, por ejemplo, mediante la aplicación de la cinta adhesiva sobre la parte superior del molde y tirando de toda la matriz de microagujas fuera del molde.

50 Puede incluirse una etapa adicional para concentrar el material de interés en el cuerpo de la aguja solamente o parte del cuerpo de la aguja solamente, estando hecho el resto del cuerpo y el disco de soporte de un material diferente.

Las microagujas pueden formarse con un polímero biodegradable a una temperatura ambiente.

55 Una descripción esquemática de un método de acuerdo con la invención se proporciona en la Fig. 1.

El pre-llenado de las cavidades del molde con agua u otro disolvente puede conseguirse, por ejemplo, sumergiendo el molde bajo el agua o disolvente y sometiendo el sistema al vacío usando una bomba apropiada, como se describe en Monahan et al. (2001) *Anal. Chem.* 73:3193-3197.

60 Como alternativa, las cavidades de las agujas pueden rellenarse con agua u otro disolvente pulverizando el disolvente directamente dentro del molde usando un aparato de pulverización apropiado, tal como una boquilla Schlick o equivalente, o atomizando el disolvente mediante un dispositivo ultrasónico, o mediante otros medios adecuados. Las gotitas que se entregan en el molde varían de una pulverización en forma de niebla a gotitas finas.

65

El tamaño de las gotitas debe ser lo suficientemente pequeño para entrar en las puntas del molde de microagujas sin formar burbujas de aire. El tamaño promedio de las gotitas que se entregan sobre el molde y dentro de las cavidades puede ser, por ejemplo, de menos de 15, menos de 10 o menos de 8 micrómetros de diámetro.

5 El exceso de agua u otro disolvente utilizado para rellenar las cavidades que queda sobre la superficie del molde pueden retirarse por raspado de la superficie usando una cuchilla de acero, un raspador de goma o soplado del exceso del disolvente usando soplado de aire comprimido a la superficie en un ángulo bajo, por ejemplo, en un ángulo de menos de 30 grados a la superficie.

10 El disolvente utilizado para rellenar los moldes puede enfriarse opcionalmente para ralentizar la evaporación. El disolvente puede enfriarse a una temperatura más baja que la ambiente, por ejemplo, a 4-8 °C o menos.

Como alternativa, los moldes pueden colocarse sobre la superficie enfriada activamente para ralentizar la evaporación.

15 La formulación en forma de solución concentrada que contiene material de interés después se aplica sobre la parte superior de cada cavidad de aguja individualmente en forma de una gota que debe entrar en contacto directo con el disolvente ya presente en la cavidad de la aguja.

20 La formulación puede disponerse sobre los pocillos por diversos medios. En una realización, la formulación se entrega manualmente con la ayuda de una bomba precisa, por ejemplo, una bomba o bomba de jeringa impulsada por un motor de velocidad gradual utilizado en sistemas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) convencionales, conectada a una aguja o capilar fino en un extremo de salida. El flujo está por lo general en el intervalo de 1-10  $\mu\text{l}/\text{min}$  para la aplicación manual, dependiendo del tamaño de las microagujas. Los capilares adecuados están hechos de vidrio, silicio, acero, politetrafluoroetileno (PTFE), etileno propileno fluorado (FEP), poliéter éter cetona (PEEK) u otros materiales inertes. Como alternativa, pueden usarse agujas hipodérmicas de acero inoxidable, por ejemplo, agujas de 31G. Los diámetros interior y exterior de los capilares/agujas no son críticos para el funcionamiento del método ya que el capilar/aguja no necesita entrar en las cavidades del molde sino que en su lugar se deposita la formulación sobre la parte superior de los pocillos de agujas, como se representa en la Fig. 1.

30 Los capilares utilizados habitualmente son capilares con el diámetro interior de, por ejemplo, 100-300  $\mu\text{m}$  y diámetros exteriores de, por ejemplo, 200-500  $\mu\text{m}$ . Los capilares o agujas utilizados deben ser adecuados para la entrega de la formulación en forma de gotas individuales cuyo diámetro puede ser menor, igual o mayor que la abertura de la cavidad de la aguja. En una realización, el diámetro de una gota de formulación entregada es mayor que el diámetro de la cavidad de la microaguja dando como resultado el cuerpo de la microaguja acoplado con el anillo circundante hecho del mismo material. En otra realización, la formulación se deposita en forma de una gota que tiene un diámetro igual o menor que la abertura de la cavidad. En este caso la formulación no entra en contacto directo con el molde sino solamente con el agua/disolvente con el que se rellenaron las cavidades. Esto puede dar como resultado adicionalmente las microagujas en las que el principio activo rellena solo la parte de la microaguja, como se analiza adicionalmente a continuación.

En una realización de la invención la precisión de la entrega se controla manualmente usando una lupa.

45 En otra realización, la formulación puede entregarse en pocillos de aguja de una manera automatizada usando los sistemas desarrollados para depositar una serie de pequeñas gotas sobre sustratos en un patrón regular. Una diversidad de dichos instrumentos está fácilmente disponible en el mercado, por ejemplo, de BioDot, Inc. (Irvine, California) o usando dispensadores de chorro. Los dispositivos adecuados consisten en un cabezal móvil en dos o tres dimensiones, un depósito de líquido, una zona de pre-dispensación y una abertura en la zona de pre-dispensación. El líquido se entrega activamente sobre la superficie del molde, ya sea mediante un método sin contacto en el que las gotas de formulación se expulsan sobre la superficie del molde o por métodos de "touch off", en los que la formulación líquida primero hace un puente del cabezal a la superficie del molde antes de ser separada del cabezal dispensador. El cabezal dispensador puede ser de un solo canal que entrega una gota de formulación a la vez o de múltiples canales que entrega de dos o más gotas de formulación a la vez. Si el número de canales es igual al número de pocillos en el molde toda la matriz puede desarrollarse en una sola etapa de dispensación.

55 La formulación que se entrega a las aberturas de la cavidad de la aguja no tiene que ser la misma para todas las microagujas en la matriz. Pueden entregarse diferentes formulaciones que tengan diferente composición sobre la misma matriz. Esto puede conseguirse ya sea dispensando las formulaciones secuencialmente sobre los pocillos respectivos usando un solo canal o dispensando diferentes formulaciones simultáneamente usando canales de dispensación dedicados.

60 El volumen exacto de la formulación que se entrega depende de la concentración de la formulación, del volumen de las microagujas y del tipo de microagujas (aguja con la formulación en todo el volumen o en la punta de la aguja solamente). En una realización de la invención en la que se necesita conseguirse que todo el volumen de la microaguja contenga el principio activo, el volumen de la gota entregada en cada cavidad de microaguja es mayor que el volumen de la microaguja. El volumen exacto se calcula teniendo en cuenta la concentración de la masa total

65

de la formulación que se entrega. Normalmente, el volumen de la formulación que se entrega será de manera que, después de la retirada del disolvente, la cantidad de residuo seco sea suficiente para rellenar la cavidad de la aguja.

5 En una realización, el volumen del residuo seco es incluso mayor que el volumen de microaguja que forma un disco alrededor de la cavidad de la microaguja. Este disco que se forma es importante para la estabilidad de la aguja una vez que la aguja se transfiere sobre la cinta adhesiva y se aplica sobre la piel. El disco sirve como un soporte de base ancho que impide que la microaguja se voltee durante la inserción dentro de la piel. El diámetro del disco de soporte puede ser, por ejemplo, el 150 %, el 200 % o el 400 % del diámetro de base de la aguja o más que eso. La Fig. 4A1-A2 muestra una microaguja con la formulación en todo el volumen de la aguja y el disco formado alrededor de la base de la aguja.

10 En otra realización, el volumen de la formulación líquida que se entrega se elige de manera que, después de que se retire el disolvente, el volumen de la formulación seca sea menor que el volumen de la cavidad de la microaguja. En este caso se requiere una etapa adicional para hacer el resto del cuerpo de la aguja y estabilizar el disco, como se explica a continuación.

15 El diámetro del disco de soporte construido aproximadamente la base de la aguja es una función de las características superficiales del molde, de la tensión superficial y del ángulo de contacto entre la formulación que se entrega y el molde y del volumen de formulación entregado. Un mayor volumen entregado generalmente dará como resultado un disco de soporte más grande. Una tensión superficial baja entre la formulación que se entrega y el molde generalmente también dará como resultado un disco que tenga un diámetro más grande. La tensión superficial de la formulación puede alterarse mediante la adición de tensioactivos tales como polisorbato, oleato de glicerol y dodecil sulfato de sodio. Como alternativa, puede usarse un material de molde con mayor o menor hidrofobia para alterar el diámetro de disco o las propiedades de la superficie del molde pueden alterarse para que sea más humectable, por ejemplo, mediante los métodos descritos en el documento WO 2008/130587A2.

20 Después de que la formulación entregada entra en contacto con el disolvente ya presente en la cavidad de la microaguja, la difusión finalmente equilibrará la concentración de los principios activos a través de la cavidad y la formulación entregada sobre la cavidad. El disolvente de la cavidad difunde dentro de la gota concentrada superior de la formulación mientras que las sustancias de la formulación altamente concentrada difunden dentro del disolvente en la cavidad de la microaguja. Simultáneamente, el disolvente comienza a evaporarse dando como resultado la disminución del volumen de la gota de formulación sobre la cavidad. Dependiendo de la composición de la formulación y del principio o principios activos que se usan, este proceso puede realizarse en condiciones ambientales o acelerarse colocando el molde en el vacío con o sin adición de desecante. El proceso de retirada del disolvente puede realizarse a temperatura ambiente, por ejemplo, a 22-25 °C, o superior, o inferior, a la temperatura ambiente, dependiendo de la formulación y del principio activo que se usan. La duración del proceso de retirada del disolvente es, por ejemplo, de entre 10 min y 10 horas, dependiendo de la formulación que se usa y del diseño de la aguja, requiriendo las agujas más altas y más grandes un proceso más largo y, posiblemente, la aplicación de vacío.

30 El proceso de secado puede ser de manera que el volumen de la gota inicial de la formulación disminuya debido a la evaporación de agua terminando con el pocillo de la microaguja relleno con la formulación seca. El volumen y la concentración de la formulación utilizada puede elegirse de manera que el volumen del contenido seco tras el secado sea suficiente para rellenar la cavidad de la aguja y para formar un disco de soporte alrededor de la base de la aguja con un diámetro más grande, por ejemplo, aproximadamente 3 veces más grande, que el diámetro de la base de la aguja.

35 En una realización de la invención, pueden prepararse microagujas en las que el principio activo está contenido en la parte del cuerpo de la aguja solamente. Un ejemplo de un método de este tipo se muestra esquemáticamente en la Figura 2. Usando este método, la cantidad de la formulación que se entrega en la etapa de entrega de la formulación en este método (Fig. 2, etapa C) es generalmente menor que el volumen utilizado normalmente en el método descrito anteriormente. La concentración de la formulación entregada en este método puede ser igual o menor que la concentración de una formulación utilizada para hacer microagujas con el disco de soporte todo hecho del mismo material. Generalmente, la concentración y el volumen de la formulación que se entrega sobre cada pocillo se eligen de manera que tras la retirada del disolvente el volumen del residuo seco sea menor que el volumen de la cavidad de la microaguja. Durante la retirada del disolvente la formulación se retrae por debajo del nivel de superficie de la cavidad de la microaguja terminando con la formulación seca concentrada en solo una parte del cuerpo de la aguja.

40 El volumen ocupado por la formulación seca puede estar, por ejemplo, en el intervalo del 5-95 % del volumen del cuerpo de la microaguja. El resto del cuerpo de la aguja (si existe) y del disco de soporte generalmente están hechos de material o materiales diferentes de los utilizados para hacer la punta de la aguja. El material utilizado para hacer el resto del cuerpo de la aguja y el disco de soporte puede elegirse de modo que sea soluble en al menos un disolvente en el que el primer o los primeros materiales presentan una mala solubilidad. Por ejemplo, si la punta de la aguja está hecha de una formulación que consiste en trehalosa el resto del cuerpo de la aguja puede estar hecho de PVP disuelto en etanol en la que la trehalosa es insoluble. De esta manera, unir la base de la aguja sobre la punta de la aguja no disolverá la punta ni alterará el principio activo incluido en la punta. Opcionalmente, el segundo

material también puede contener el mismo u otro principio activo. Opcionalmente, puede añadirse una tercera capa o más al molde de microagujas para construir una microaguja de varias capas.

5 La fabricación del resto del cuerpo de la aguja y el disco de soporte se realiza generalmente mediante el mismo procedimiento que la fabricación de la punta (Fig. 2, etapas G-K). El molde se rellena con el segundo disolvente, el exceso se retira y se añade la segunda formulación sobre la parte superior del pocillo de la aguja y se deja secar dando como resultado una microaguja en la que la primera sustancia se concentra en el área de la punta seguida del apoyo y el disco hechos del segundo material.

10 La mayoría de los métodos actuales de microagujas solubles requieren la formación de una capa de soporte adicional en la que se fijan las microagujas. Las matrices de microagujas hechas por el método de la invención no requieren la adición de una capa de soporte. Las microagujas se desmoldan del molde usando una cinta adhesiva adecuada en una sola etapa. La cinta adhesiva adecuada se coloca sobre la parte superior del molde que contiene microagujas secas y alrededor de los discos de apoyo. El tamaño de la lámina adhesiva puede ser más grande que el tamaño de la matriz y excede del perímetro exterior de la matriz por lo menos en 1 mm o más. Se aplica una presión uniforme sobre la lámina adhesiva y el molde usando por ejemplo la punta del dedo o una herramienta adecuada, por ejemplo, rodillos de caucho. Los discos que rodean las bases de las microagujas y la base de la microaguja se adhieren a la cinta adhesiva. Después, toda la matriz se desmolda tirando de la cinta adhesiva con las microagujas unidas fuera del molde. La cinta adhesiva puede ser adecuada para la aplicación sobre la piel humana y animal, por ejemplo, Cinta Médica de Poliéster con un solo Recubrimiento 1516 3M(TM) o similar. La cinta adhesiva utilizada puede ser adecuado para su uso sobre la piel humana y animal, en ese caso la matriz desmoldada está esencialmente lista para su aplicación sin la adición de ninguna capa de soporte. Las matrices de microagujas dispuestas en la forma descrita tienen una ventaja sobre las matrices existentes ya que cada aguja se separa de otras agujas por un área de cinta adhesiva. De esta manera, tras la inserción dentro de la piel, cada aguja estará rodeada por un área de piel unida firmemente sobre la cinta adhesiva. Esto dará como resultado una presión elástica constante sobre cada punta de aguja individual asegurando que las agujas permanezcan insertadas en la piel mientras se disuelven. Esto evita que las agujas se vuelquen hacia fuera de la piel durante la disolución debido al posible movimiento de la piel.

20 Después del desmoldeo, las matrices de microagujas dispuestas sobre una cinta adhesiva pueden secarse adicionalmente si es necesario. De nuevo, esto puede realizarse en condiciones ambientales o acelerarse mediante la colocación de la matriz en el vacío con o sin adición de desecante, a temperatura ambiente, por ejemplo, a 22-25 °C, o superior, o inferior, a la temperatura ambiente. La duración de la etapa de secado opcional puede ser de 30 min o más.

35 Para algunas formulaciones puede usarse la colocación de las matrices de microagujas al vacío en presencia de desecante para el almacenamiento a largo plazo.

#### 40 Envasado

En una realización de la invención, una pluralidad de matrices de microagujas colocadas sobre la misma lámina adhesiva puede cortarse en matrices individuales y colocarse dentro de un embalaje individual. Después, el embalaje puede sellarse herméticamente y puede contener un desecante para asegurar que las microagujas conserven un bajo contenido de humedad.

45 Opcionalmente, todo el proceso descrito de preparación de moldes y de formulación hasta el envasado final puede realizarse usando técnicas asépticas y de esterilización conocidas para asegurar la esterilidad del producto final y el cumplimiento de las normas GMP.

#### 50 Materiales de construcción

Las matrices de microagujas descritas en el presente documento pueden hacerse al menos en parte de un material que se disuelva cuando la matriz se aplique a la piel y esté en contacto con la humedad en la piel.

55 Los materiales adecuados para la producción de matrices de microagujas solubles incluyen cualesquier polímeros biocompatibles, biodegradables o bioerosionables, hidratos de carbono, celulósicos, azúcares, alcoholes de azúcar, polioles o ácido algínico o un derivado del mismo. Los materiales adecuados para la producción de matrices de microagujas compatibles para su uso humano o veterinario incluyen cualesquier polímeros biocompatibles, hidratos de carbono, celulósicos, azúcares, alcoholes de azúcar, polioles o ácidos algínico o un derivado del mismo, que generalmente se consideran como seguros (GRAS, del inglés *generally regarded as safe*) o están aprobados para su uso clínico en seres humanos o animales.

60 Las formulaciones adecuadas pueden contener solo un componente o pueden ser mezclas de más de un componente mezclado en cualquier relación adecuada. Los ejemplos incluyen el uso de azúcares tales como trehalosa o sacarosa y polímeros tales como alcohol polivinílico (PVA) o PVP, solos o en combinación.

Además de los componentes principales, las formulaciones adecuadas para la fabricación de microagujas pueden incluir opcionalmente uno o más tensioactivos y/o agentes estabilizantes, tales como azúcares formadores de vidrio amorfos.

5 También además de los componentes principales y porque los dispositivos descritos penetran la piel humana, puede incluirse en la formulación una o más sustancias farmacéuticamente aceptables que presenten características antibacterianas, tales como tiomersal, meta cresol y cloruro de benzalconio.

10 Las formulaciones adecuadas pueden elegirse basándose en la velocidad de disolución deseada *in vivo*. Es bien conocida en la técnica la cinética de degradación o disolución de diversos polímeros, por ejemplo, PLGA, en el tejido. Adicionalmente, pueden usarse diferentes formulaciones en diferentes capas de la microaguja que se disuelvan a diferentes velocidades en el tejido, permitiendo de este modo la liberación por pulsos del material activo.

15 Como alternativa, puede usarse una formulación de disolución lenta en una parte de la microaguja, o la matriz de microagujas, para controlar el fluido intersticial, mientras que una segunda o posterior formulación o formulaciones pueden liberarse rápidamente para entregar un material activo.

20 Tras la aplicación sobre la piel, las microagujas pueden disolverse completamente o solo parcialmente, dependiendo de los materiales utilizados para la fabricación, la longitud de la aguja, la duración de la exposición sobre la piel, las características y el espesor de la piel. Los parámetros exactos de fabricación y aplicación de las matrices de microagujas se elegirán con el fin de garantizar la entrega del principio activo al tejido subyacente con una cinética apropiada de liberación y/o disolución.

25 Los disolventes utilizados para la disolución de la formulación pueden ser agua, alcoholes tales como etanol, propanol, butanol y mezclas de los mismos. Otros disolventes no acuosos adecuados incluyen hidrocarburos, ésteres, éteres, cetonas, lactonas, nitrilos, amidas y mezclas de los mismos. Los disolventes adecuados son compatibles con el material del molde y dan como resultado niveles residuales mínimos en la matriz de microagujas final seca.

30 Principios activos que se entregan

El principio o principios activos que se entregan en la piel usando microagujas pueden comprender una sustancia terapéutica, tal como un fármaco o una vacuna.

35 El principio o principios activos utilizados pueden ser termolábiles.

40 La expresión "principio activo" utilizado en el presente documento se refiere a cualquier sustancia con propiedades potenciales terapéuticas, profilácticas, así como de diagnóstico, cuando se administra a seres humanos, animales o aves, incluyendo las aplicaciones *ex vivo*. Los ejemplos incluyen proteínas y péptidos tales como factores de crecimiento, ácidos nucleicos y moléculas más pequeñas tales como antibióticos, esteroides, anestésicos, agentes antivíricos.

45 El principio activo que se entrega usando microagujas puede ser una vacuna. El término "vacuna" utilizado en el presente documento se refiere a cualquier composición profiláctica para la prevención de una enfermedad o una composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad existente.

50 El término "tratamiento" utilizado en el presente documento significa la entrega de la vacuna a un sujeto que padece una enfermedad existente con el fin de disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado a la enfermedad existente y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

55 El término "prevención" utilizado en el presente documento significa la administración de la vacuna a un sujeto que no padece la enfermedad diana y/o a un sujeto todavía no presenta síntomas de la enfermedad diana adquirida para prevenir o afectar a la causa de la enfermedad (por ejemplo, una infección) o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado a la enfermedad.

60 Una vacuna puede comprender un único o múltiples componentes incluyendo pero no limitados a una vacuna de organismo completo, tal como un patógeno vivo, muerto o atenuado; una vacuna de subunidades que comprende solo una parte de un patógeno, o un péptido o proteína derivable de dichos organismos que comprende uno o más epítopo o epítomos y adyuvante o adyuvantes antigénicos; una secuencia de nucleótidos, tal como una molécula de ARN o ADN que codifica un péptido o polipéptido que comprende un epítopo o epítomos y adyuvante o adyuvantes antigénicos.

65 La formulación de vacuna puede incluir un vector que permite o potencia de la entrega de una secuencia de nucleótidos de este tipo a una célula diana, tal como un plásmido, vector vírico, vector bacteriano o un vector de levadura. Los vectores víricos incluyen, por ejemplo, vectores adenovíricos (AdV), vectores víricos adeno-asociados,

vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos incluyendo vectores lentivíricos, vectores de baculovirus y vectores de poxvirus.

5 Los vectores de entrega pueden comprender vectores recombinantes (modificados genéticamente). Los vectores víricos pueden ser vectores viables, atenuados o de replicación deteriorada, tales como los vectores de virus de viruela modificado Ankara (MVA), adenovirus o virus del bosque Semliki.

Aplicaciones de dispositivos de microaguja

10 Los dispositivos de microaguja desvelados pueden aplicarse para el transporte de materiales dentro o a través de barreras biológicas en seres humanos, animales o plantas.

15 Un dispositivo de microagujas como se describe en el presente documento debe ser fácil de fabricar y de usar y puede ser adecuado para la autoadministración sin necesidad de ninguna habilidad especial. Esta realización puede incluir una matriz de microagujas dispuesta sobre una cinta adhesiva que se presiona sobre una parte limpia de la piel y se deja durante cierta cantidad de tiempo hasta que las microagujas se disuelven y el principio o principios activos se liberan en la piel. Después de la aplicación, la cinta adhesiva se despega de la piel.

20 Dependiendo del uso previsto, pueden diseñarse matrices de microagujas para liberar el principio o principios activos de forma relativamente rápida, por ejemplo en cuestión de minutos, o para prolongar la liberación durante un periodo más largo, por ejemplo uno o más días.

Kits

25 También se describen en el presente documento kits para su uso en los métodos de la presente invención.

El kit puede comprender una formulación para la fabricación de microagujas.

30 El kit también puede comprender un molde de formación de microagujas; aparato de entrega de formulación; cámara de secado; y cinta adhesiva adecuada.

El kit también puede comprender un principio activo para mezclar en una formulación para la formación de una matriz de microagujas solubles y cualesquier otros componentes que formen una formulación final.

35 El kit también puede comprender instrucciones de uso.

40 La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de Ejemplos, que tienen por objeto servir de ayuda a un experto habitual en la materia en la realización de la invención y no tienen por objeto de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

## **Ejemplos**

### Ejemplo 1 - Preparación de microagujas

45 Se prepararon matrices de microagujas mediante el método que se muestra esquemáticamente la Fig. 1.

50 Una matriz de microagujas de silicio maestra se fabricó mediante un método de grabado en húmedo de silicio como se describe en el documento US2007/0134829A1 y Wilke et al. (2005 *Microelectronics Journal* 36:650-656). Se hicieron moldes de microagujas negativos usando la matriz de microagujas de silicio maestra vertiendo PDMS líquido (polidimetilsiloxano) sobre la matriz de silicio, curando a una temperatura elevada (por ejemplo 100 °C durante una hora), enfriando y después despegando el molde de PDMS flexible de la matriz de silicio maestra.

55 Después, los moldes se limpiaron en agua desionizada usando un baño de ultrasonidos durante 20 min. Los moldes limpios se colocaron en un vaso de precipitados y se sumergieron bajo el agua desionizada. El vaso de precipitados se colocó en un desecador y se sometió a vacío usando una bomba de chorro de agua durante 20 min. Después, el vaso de precipitados con moldes se colocó en el refrigerador para enfriar el agua a 4-8 °C.

Se preparó un conjunto de formulaciones como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de formulaciones utilizadas para la fabricación de microagujas

Formulación	Composición/% (p/v) *				
	Trehalosa	Sacarosa	PVA	PVP	Tween 80
1	50				
2	50				0,05
3	25	25			
4	25		7,5		
5				50	
6			15		
7		50			

\* El agua se usa como disolvente en todas las formulaciones, excepto para PVP donde se usó etanol al 96 %. Pueden añadirse los colorantes azul de metileno o rojo Congo para la visualización

5 Las formulaciones se mezclaron minuciosamente y se introdujeron en tubos de PTFE conectados a una bomba de HPLC en un extremo y a un capilar de silicio al otro extremo (100 µm de DI).

10 Los moldes de PDMS se tomaron del vaso de precipitados y el exceso de agua se retiró de la superficie mediante el raspado de la superficie con una cuchilla de acero dejando solamente agua en las cavidades de las agujas. El flujo de la formulación se ajustó a 1 µl/min. Una gota de formulación se entregó directamente sobre la parte superior de cada cavidad de la aguja. Se usó una lupa de 10X para ayudar a la visualización de este proceso. El volumen de la formulación entregada puede variar dependiendo del tipo del molde y de la concentración de la formulación, sin embargo, en la mayoría de los casos fue de entre 15 y 80 nl por cavidad.

15 Después de la entrega de la formulación, los moldes se colocaron en un desecador en presencia de gel de sílice. Los moldes se dejaron en el desecador durante 5 horas para que se secan completamente.

20 Se cortó una pieza rectangular de Cinta Médica de Poliéster con un solo Recubrimiento 1516 3M(TM) con las dimensiones mayores a las dimensiones del molde por 5 mm por cada lado y se presionó sobre la parte superior del molde. Se aplicó una presión suave usando la punta del dedo. Después, las microagujas se desmoldaron desprendiendo la cinta adhesiva y se colocaron en el desecador para su almacenamiento. La Fig. 4 A1-A2 muestra la matriz de microagujas y una aguja individual producidas usando la formulación 4 con la adición de azul de metileno. Esto demuestra el método general para hacer la matriz uniforme de microagujas en la que todo el cuerpo de la aguja y el disco de soporte están hechos del mismo material.

#### 25 Ejemplo 2 – Fabricación de una matriz de microagujas mediante relleno por pulverización de los moldes con disolvente

30 Se prepararon moldes de microagujas como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los moldes se limpiaron en agua desionizada usando un baño de ultrasonidos durante 20 min. Se llenaron moldes de PDMS limpios con agua desionizada enfriada a 4-8 °C mediante pulverización de agua directamente en los moldes. El agua se dispersó usando una boquilla Schlick 970 S8 equipada con una perforación de 0,5 mm. La abertura de la boquilla se puso en la posición 2; presión de aire de entrada era de 0,25 bar (250 kPa); el flujo de agua se fijó a 10 ml/min. La distancia de la boquilla al molde era de 3,5 cm. Los moldes se hicieron pasar bajo la pulverización atomizada dos veces. La duración de la pulverización varió y en la mayoría de los casos fue inferior a 1 segundo. La fabricación de microagujas y el desmoldeo se realizaron adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1. Este demuestra la posibilidad de pre-llenar las cavidades de las agujas del molde por relleno por pulverización haciendo, de este modo, el proceso más simple y más susceptible de aumentar o reducir a escala.

#### 40 Ejemplo 3 – Fabricación de una matriz de microagujas usando un robot automatizado de dispensación de microvolúmenes.

45 Se prepararon moldes de microagujas y se llenaron con agua como se ha descrito en el Ejemplo 1. Después se preparó formulación 1 que contenía azul de metileno (Tabla 1). Se usó una máquina automatizada de dispensación de microvolúmenes con un brazo robótico movable en tres dimensiones para disponer 20 nl de formulación sobre cada pocillo de 12x12 microagujas/matriz (agujas de 280 µm de alto). De este modo, el volumen nominal total de la formulación dispuesta asciende a 2,88 µl por matriz.

50 Los moldes con la formulación después se secaron y las matrices de microagujas se entregaron adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1.

Para evaluar la precisión de la máquina automatizada utilizada para dispensar la formulación en los moldes, se examinaron adicionalmente matrices de microagujas preparadas. Cada matriz de microagujas se disolvió en 0,5 ml de agua y se midió la absorción a  $\lambda = 655 \text{ nm}$  para proporcionar el volumen total de la formulación entregada en cada matriz. Los resultados muestran que el volumen real de la formulación suministrada por parche era de  $2,90 \pm 0,17 \mu\text{l}$  (media  $\pm$  desviación típica,  $n = 50$ ).

Esto demuestra la susceptibilidad de aumentar o reducir a escala y el potencial de que el proceso de fabricación de microagujas sea completamente automatizado usando máquinas de dispensación de microvolúmenes fácilmente disponibles.

#### Ejemplo 4 - Preparación de una matriz de microagujas heterogénea

Se prepararon moldes de microagujas y se llenaron con agua como se ha descrito en el Ejemplo 1. Después, se prepararon la formulación 1 que contenía azul de metileno y la formulación 3 que contenía rojo Congo (Tabla 1). La formulación 1 se introdujo en tubos de PTFE y se conectó con el primer canal de HPLC y la formulación 2 se introdujo en otro tubo y se conectó al segundo canal de HPLC. Después, la formulación 1 se entregó sobre la parte superior de una mitad de las cavidades seguida de la formulación 3 entregada a la otra mitad de las cavidades. Los moldes se secaron y se desmoldaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. La figura 4 B1-B2 muestra un ejemplo de matriz de microagujas producida mediante el método descrito. Esto demuestra la posibilidad de usar el procedimiento de fabricación de matrices de microagujas heterogéneas que contienen dos o más grupos de microagujas hechas de diferentes materiales.

#### Ejemplo 5 - Preparación de matrices de microagujas con el principio activo concentrado solo en una parte de la microaguja

Se prepararon moldes de microagujas y se llenaron con agua como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se preparó la formulación 4 que contenía colorante rojo Congo, se introdujo en tubos de PTFE y se conectó a la bomba de HPLC. Un volumen pequeño (aproximadamente 5 nl) se entregó sobre la parte superior de cada cavidad de aguja y se puso en contacto con el agua en los pocillos. Después, los moldes se secaron en el desecador durante 5 horas para proporcionar la formulación seca concentrada en la parte de la punta de las microagujas. Después, los moldes se rellenaron por pulverización de etanol al 96 % enfriado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para rellenar el resto del volumen de la cavidad. El exceso de etanol se retiró de la superficie usando una cuchilla afilada. Después, se entregó formulación 5 individualmente sobre la parte superior de cada cavidad. Después, los moldes se secaron durante la noche al vacío y se desmoldaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. La Fig. 4 C1-C2 muestra un ejemplo de microagujas producidas mediante el método descrito. Esto demuestra la modificación del método principal por la que pueden prepararse microagujas con el principio activo concentrado en solo una parte de la microaguja.

#### Ejemplo 6 - Estabilidad de componentes de vacuna incluidos en microagujas

Se prepararon las formulaciones 1 y 4. Se formuló el virus MVA que codifica la proteína fluorescente roja (MVA-RFP) en la formulación 4 a una concentración de partida de  $10^9 \text{ ufp/ml}$ . Se formuló lisozima de clara de huevo de pollo en la misma formulación a una concentración de  $100 \text{ mg/ml}$ . Se formuló adenovirus (AdV) que codifica la proteína mCherry (AdV-mCherry) en la formulación 1 a la concentración de  $2 \times 10^9 \text{ ufp/ml}$ . Se añadió FITC-Na en todas las soluciones a la concentración de  $1 \text{ mg/ml}$  para permitir una cuantificación precisa de la cantidad de formulación entregada en cada molde individual. Se prepararon matrices de microagujas que contenían componentes de ensayo como en el Ejemplo 1, se cerraron herméticamente en viales de vidrio individuales en presencia de desecante y se mantuvieron a temperatura ambiente durante hasta 14 días. En los puntos de muestreo se tomaron muestras y se congelaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después de 14 días las muestras de incubación se sometieron a ensayo para determinar la supervivencia vírica (AdV y MVA) o la actividad enzimática (lisozima).

La supervivencia de AdV y MVA que expresaban proteínas fluorescentes se midió usando citometría de flujo. Las matrices de microagujas se disolvieron en medio de cultivo celular a temperatura ambiente. Se infectaron células DF-1 (para MVA-RFP) o HEK293A (para AdV-mCherry), cultivadas en condiciones convencionales, con las soluciones de virus y se dejaron durante la noche en una incubadora con  $\text{CO}_2$ . Después de 24 h se recogieron las células y se calculó la tasa de infección midiendo la fluorescencia de las células infectadas que expresaban RFP o proteínas mCherry usando un citómetro de flujo LSRII (Becton-Dickinson). La tasa de supervivencia se calculó a partir de una curva patrón usando muestras de título conocido (en unidades UFP/ml) y se expresó como unidades de log de  $\text{UFP}_{\text{eq}}/\text{ml}$  (valor logarítmico de unidades formadoras de placa equivalentes por ml).

La actividad de la lisozima se midió mediante un ensayo turbidimétrico convencional usando células de *Micrococcus lysodeikticus*.

La Fig. 5 muestra los resultados de la supervivencia del virus o de la actividad enzimática frente al tiempo de incubación para las muestras descritas anteriormente. Se puede observar que los dos virus MVA y AdV se conservan bien en las microagujas con solo una mínima pérdida de título mientras que la actividad de la lisozima se conservó totalmente.

Esto demuestra que diversos componentes de vacuna potenciales incluyendo los vectores víricos vivos pueden estabilizarse eficientemente en microagujas secadas usando los métodos descritos.

#### Ejemplo 7 - Cinética de disolución de microagujas ex vivo

Se realizó la cinética de disolución de microagujas usando piel de cerdo cadavérico. Se prepararon matrices de microagujas de 500 µm de alto como se ha descrito en el Ejemplo 3 con puntas de agujas hechas de la formulación 1 con la adición de colorante rojo Congo y bases de agujas hechas de formulación 5 con la adición de colorante azul de metileno. Tras el secado las matrices se aplicaron *in vitro* sobre piel de cerdo previamente afeitada y se dejaron durante 1 s, 10 min o 60 min en la piel a 37 °C. Después de retirar las matrices de la piel, se obtuvieron imágenes tanto de la piel como de las matrices usando un microscopio óptico. La Fig. 6 muestra imágenes de microagujas y de piel en los respectivos puntos temporales.

Esto demuestra que microagujas hechas mediante los métodos descritos penetran eficazmente la piel y entregan las sustancias incluidas dentro del cuerpo de las microagujas en la piel en periodos relativamente cortos de exposición.

#### Ejemplo 8 - Aplicación de microagujas para la entrega de vectores víricos vivos ex vivo

Para los estudios de transfección de piel se usaron matrices de microagujas, ya sea con agujas de 280 µm o 500 µm, preparadas como se describe en el Ejemplo 1 o el Ejemplo 3. Se incluyeron virus AdV y MVA que expresaban β-galactosidasa en las agujas a la concentración aproximada de  $1,5 \times 10^4$  ufp por aguja.

Se recogió piel de cerdo recién extirpada y se usó para la transfección esencialmente como se describe en Pearton et al. (2008 *Pharm Res* 25(2): 407-16). Las matrices se dejaron sobre la piel durante 18-24 horas antes de la fijación y tinción. Después, la piel se visualizó usando un microscopio óptico. La Fig. 7 muestra la transfección satisfactoria de la piel de cerdo con virus AdV y MVA incluidos en microagujas.

Esto demuestra que (a) pueden estabilizarse eficientemente vectores víricos vivos dentro de microagujas hechas mediante los métodos descritos, (b) las microagujas puede penetrar la piel y entregar vectores dentro de la piel (c), los vectores entregados pueden infectar células cutáneas diana dando como resultado la expresión de proteínas diana.

#### Ejemplo 9 - Aplicación de microagujas para la entrega de una vacuna in vivo

Para demostrar un ejemplo de la utilidad *in vivo* de estas matrices de microagujas solubles, se usaron matrices de microagujas, ya sea con agujas de 280 µm o 25x 500 µm, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1. Las matrices de 280 µm contenían 100 microagujas, las matrices de 500 µm contenían 25 microagujas. El antígeno de vacuna, el toxoide tetánico, se formuló con Formulación 4 (Tabla 1) y se incluyó en los moldes de microagujas a la concentración aproximada de 3 Lf por matriz. Se anestesiaron ratones C57BL/6 hembra y se les aplicaron matrices de microagujas a cada oreja y se mantuvieron en su lugar durante la noche. Como controles, el toxoide tetánico de la formulación 4 (rotulado "ToxTet en T/P ID" en la Figura 8) o el antígeno en PBS (rotulado "ToxTet en PBS ID" en la Figura 8) se inyectaron, usando una aguja y una jeringa, por vía intradérmica (ID). La Figura 8 demuestra que la vacunación usando un antígeno incorporado en microagujas solubles induce títulos de anticuerpos equivalentes a la administración por vía intradérmica de vacuna líquida, como se mide mediante el título de anticuerpos al final del estudio. Esto demuestra que las microagujas solubles fabricadas como se describe en el presente documento pueden usarse satisfactoriamente para entregar una vacuna al cuerpo vivo e inducir satisfactoriamente una respuesta inmunitaria.

Como un segundo ejemplo, se usaron matrices de microagujas, ya sea con agujas de 280 µm o 500 µm preparadas como se ha descrito en el ejemplo anterior con toxoide tetánico, usando Formulación 1. Se incluyeron virus AdV que expresan el antígeno MSP de *Plasmodium yoelii*, denominados AdV-MSP (Draper et al (2009) *Cell Host Microbe* 5, 95-105 y (2008) *Nat Med* 14, 819-21) en las agujas a la concentración aproximada de  $5 \times 10^9$  partículas de virus por matriz. Se anestesiaron ratones C57BL/6 hembra y se les aplicaron matrices de microagujas a cada oreja y se mantuvieron en su lugar durante la noche. Como control, se inyectó Adv-MSP en PBS usando una aguja y una jeringa, por vía intradérmica (ID). La Figura 9 demuestra que la vacunación usando un antígeno incorporado en microagujas solubles induce títulos de anticuerpos anti-MSP equivalentes a la administración por vía intradérmica de vacuna líquida, como se mide mediante el título de anticuerpos al final del estudio. Esto demuestra que las microagujas solubles fabricadas como se describe en el presente documento pueden usarse satisfactoriamente para entregar una vacuna viva a un sistema inmunitario sin exposición previa y sensibilizado en el cuerpo vivo e inducir satisfactoriamente una respuesta inmunitaria.

Como un tercer ejemplo de una utilidad *in vivo* de estas matrices de microagujas solubles, se usaron matrices de microagujas con agujas de 500 µm, preparadas como se ha descrito en el ejemplo anterior con el toxoide del tétanos, para entregar la vacuna contra el virus de la gripe estacional, trivalente, inactivada ('TIV', por sus siglas en inglés) a ratones e inducir y reforzar una respuesta inmunitaria. Se incluyó la TIV estacional clínicamente disponible, que contenía los antígenos de vacuna recomendados para la campaña de vacunación 2010/2011 del hemisferio

norte, en las microagujas en la concentración de 0,15 µg de antígeno de hemaglutinina (HA) de cada cepa por matriz, que representa el 1 % de la dosis humana completa. Se anestesiaron ratones BALB/c hembra y se aplicaron matrices de microagujas a cada oreja y se mantuvieron en su lugar durante la noche. Como control, se inyectó TIV, usando una aguja y una jeringa por vía intramuscular (IM) a una dosis del 10 % de la dosis humana total, equivalente a 1,5 µg de HA de cada cepa. Todos los ratones se reforzaron con la misma pauta de vacunación el día 28 después de la sensibilización. La Figura 10 demuestra que la vacunación usando una dosis de antígeno 5 veces inferior incorporada en microagujas solubles induce títulos de anticuerpos equivalentes a la administración de la vacuna líquida IM, como se mide mediante el título de anticuerpos al final del estudio para la vacuna 4 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después de la segunda inmunización. Esto demuestra que pueden usarse satisfactoriamente microagujas solubles fabricadas como se describe en el presente documento para entregar un nivel de 'ahorro de dosis' del antígeno a un sistema inmunitario sin exposición previa y sensibilizado en el cuerpo vivo e inducir satisfactoriamente y reforzar una respuesta inmunitaria.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la fabricación de una microaguja usando un molde (2) que tiene una cavidad de formación de la aguja, caracterizado porque el método comprende las etapas de (a) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja con un disolvente (1), (b) aplicar una composición de formación de microagujas (3) a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el disolvente (1), (c) permitir que el disolvente y la composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión, (d) retirar el disolvente y (e) desmoldar la microaguja.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de una microaguja con un cuerpo de la aguja formado por dos materiales de composición, que comprende las siguientes etapas:
- 15 (a) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja con un primer disolvente,  
 (b) aplicar una primera composición de formación de microagujas a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el disolvente, en el que la primera composición de formación de microagujas se aplica en una cantidad para rellenar parcialmente la cavidad de la aguja después de la retirada del disolvente;  
 (c) dejar que el primer disolvente y la primera composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión;  
 20 (d) retirar el primer disolvente;  
 (e) rellenar al menos parcialmente la cavidad de formación de la aguja restante con un segundo disolvente,  
 (f) aplicar una segunda composición de formación de microagujas a la cavidad de formación de la aguja de manera que la composición se ponga en contacto con el segundo disolvente;  
 (g) permitir que el segundo disolvente y la segunda composición de formación de microagujas se mezclen como resultado de la difusión;  
 25 (h) retirar el segundo disolvente; y  
 (i) desmoldar la microaguja,
- 30 formando de este modo una microaguja con un cuerpo hecho de dos materiales de composición diferentes.
3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la composición de formación de microagujas forma un material soluble después del secado, de manera que cuando la microaguja se aplica a la piel, u otro tejido, de un sujeto, se disuelve.
- 35 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la composición de formación de microagujas comprende un principio activo, de manera que cuando la microaguja se disuelve después de la aplicación al cuerpo, el principio activo se entrega en el tejido subyacente del sujeto.
- 40 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el primer material de la composición de formación de microagujas forma una punta de microaguja con una alta resistencia mecánica y la segunda composición de formación de microagujas forma una porción por debajo de la punta de baja resistencia mecánica.
- 45 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para la formación de una matriz de microagujas, mediante el uso de un molde que tiene una pluralidad de cavidades de formación de agujas, de manera que se fabrica una pluralidad de microagujas.
- 50 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, para la formación de una matriz de microagujas, mediante el uso de un molde que tiene una pluralidad de cavidades de formación de agujas, en el que las composiciones de formación de microagujas primera y/o segunda se entregan sucesivamente o simultáneamente sobre diferentes cavidades de microagujas del mismo molde formando de este modo una matriz de microagujas heterogénea.
- 55 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que una microaguja se desmolda mediante la adhesión a una superficie adhesiva aplicada sobre la parte superior del molde relleno y tirando de las microagujas fuera del molde.

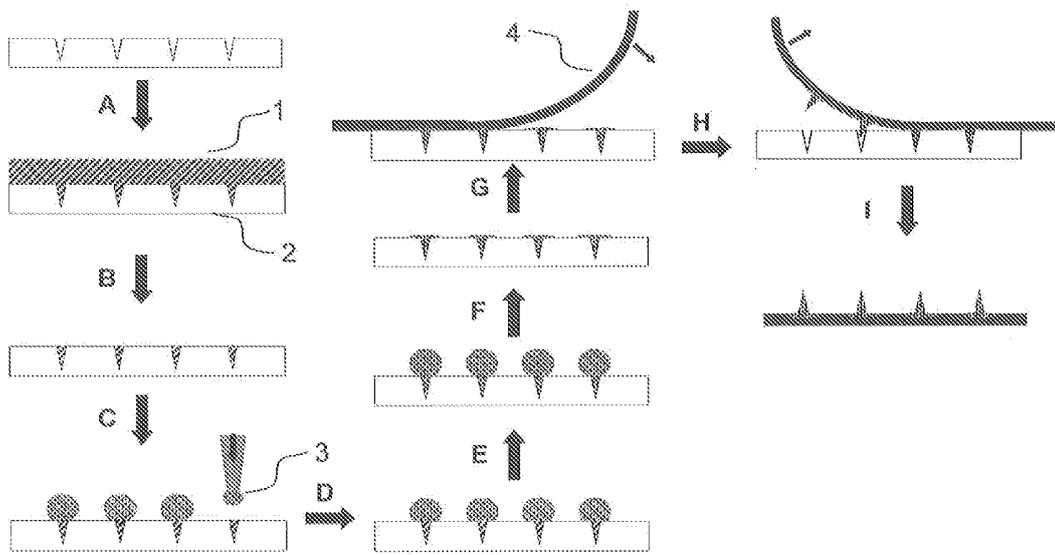


FIG. 1.

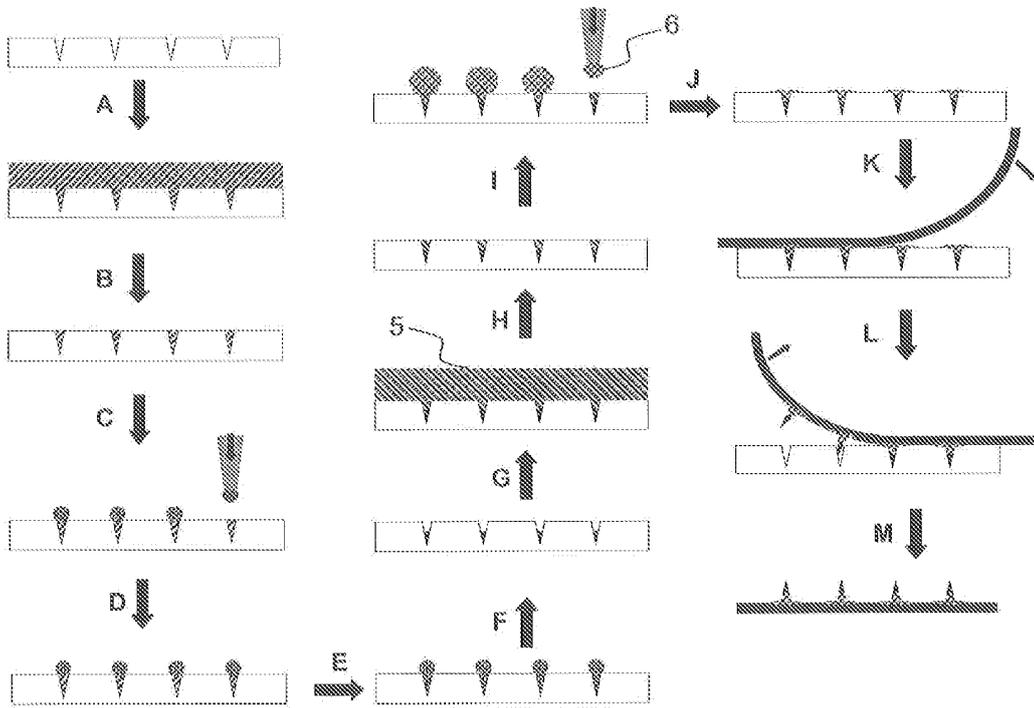


FIG. 2.

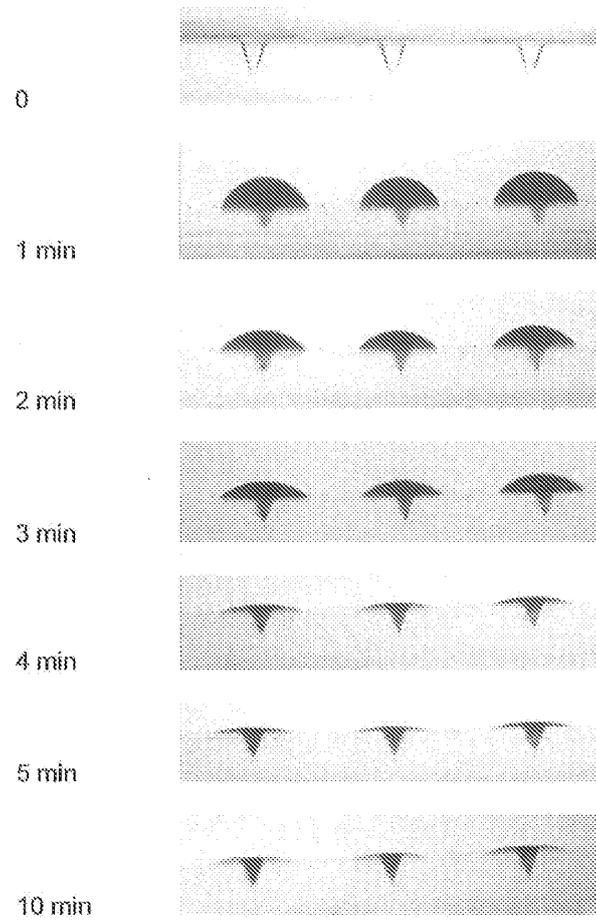


FIG. 3.

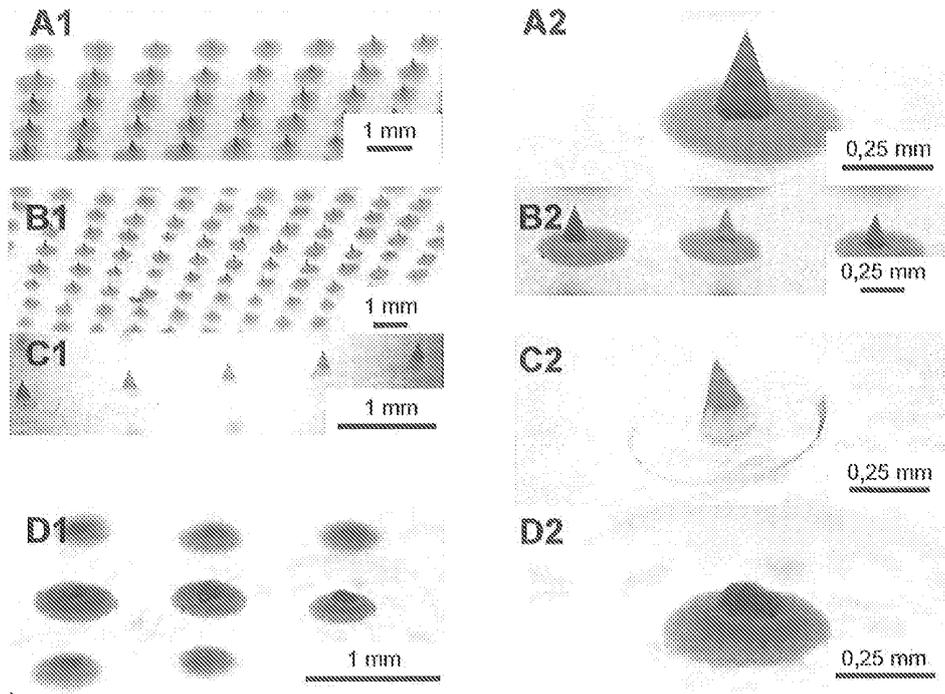
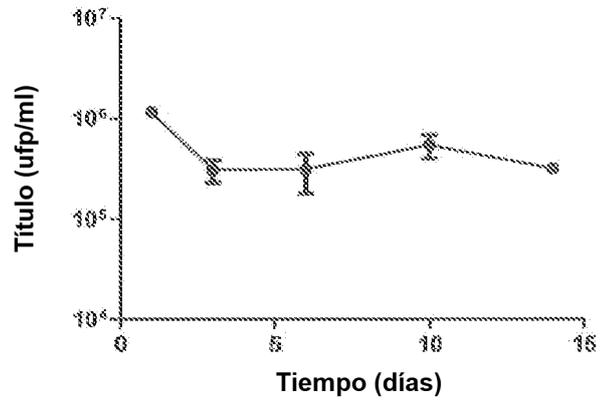
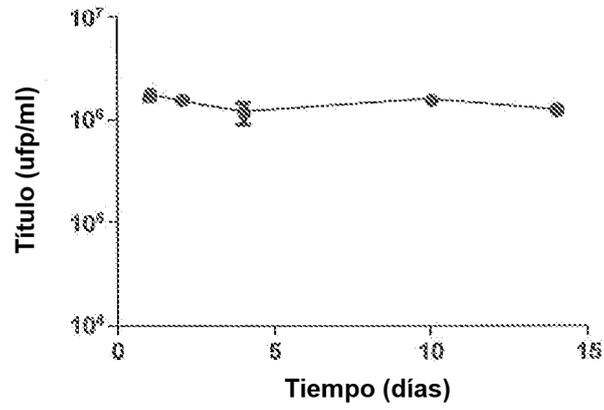


FIG. 4.

A



B



C

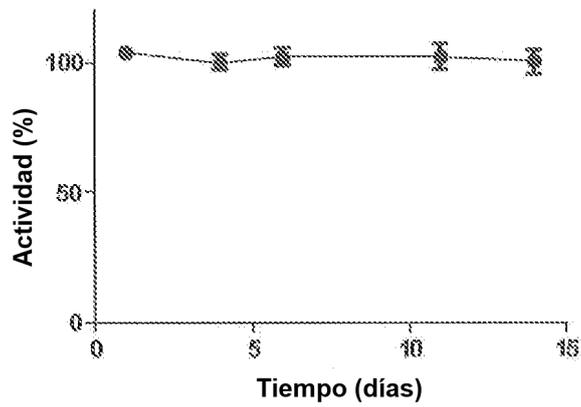


FIG. 5.

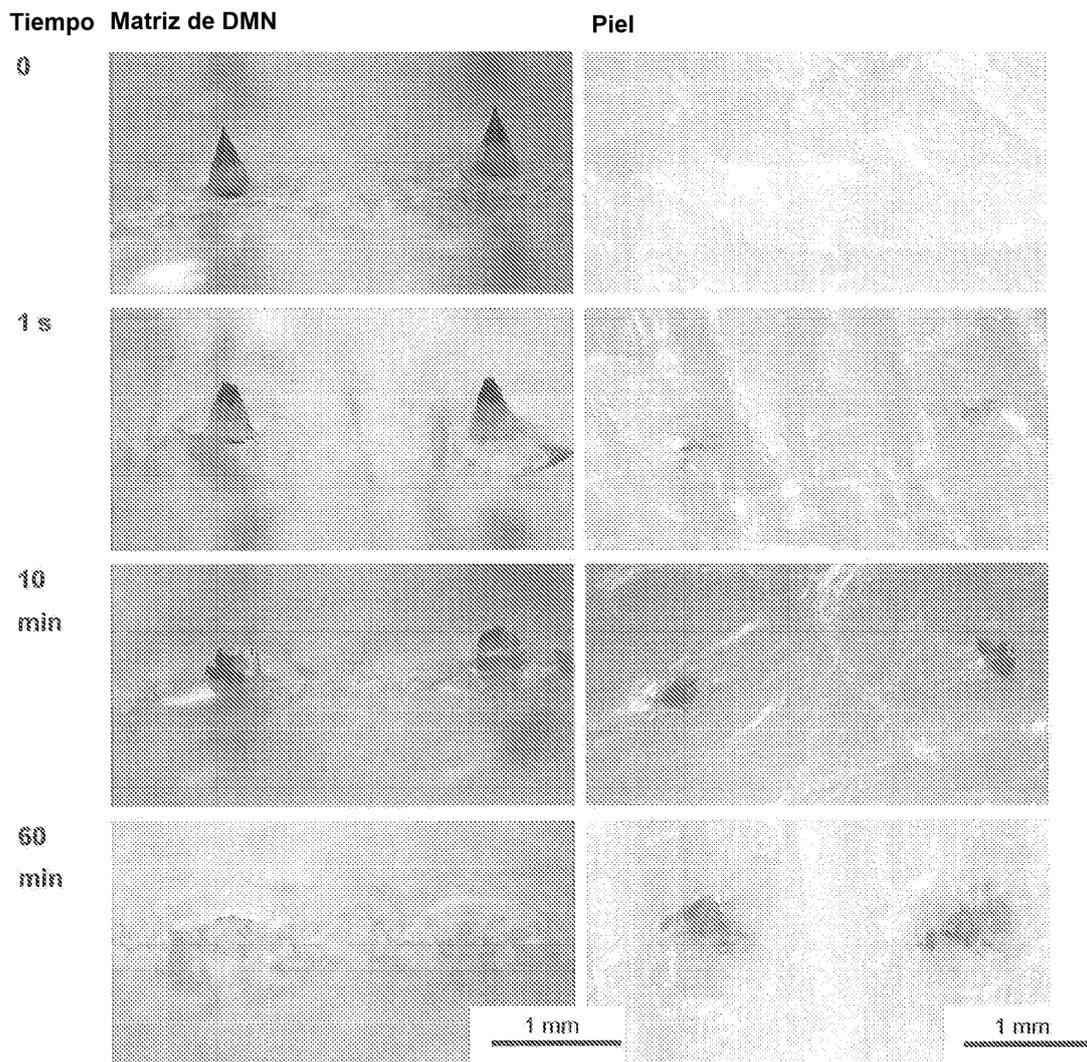


FIG. 6.

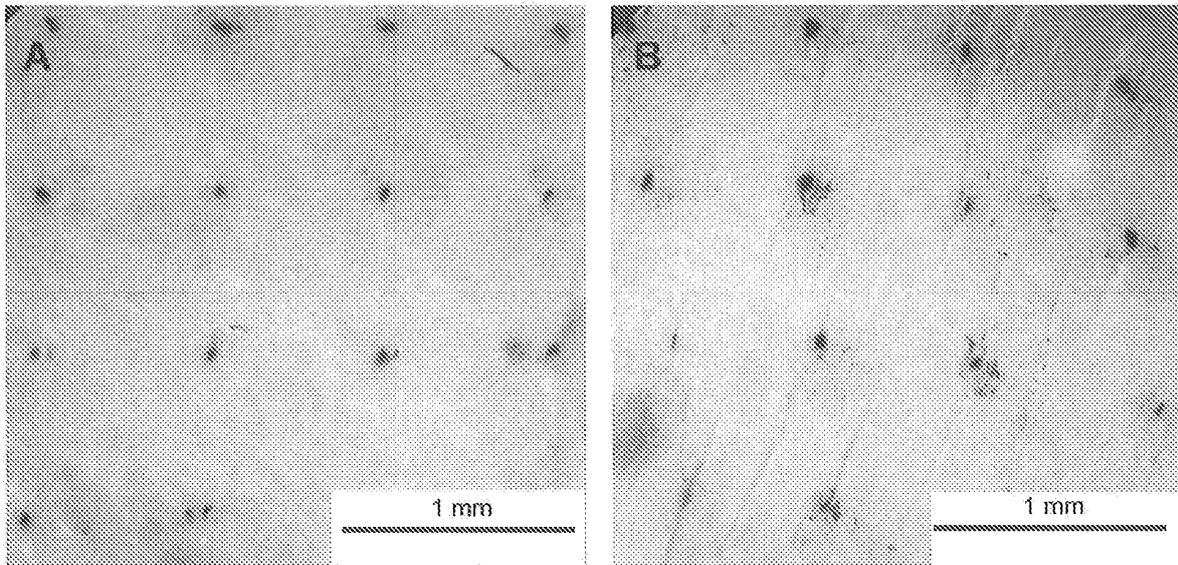


FIG. 7.

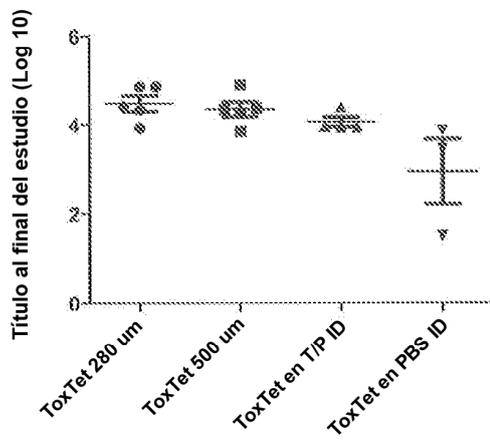
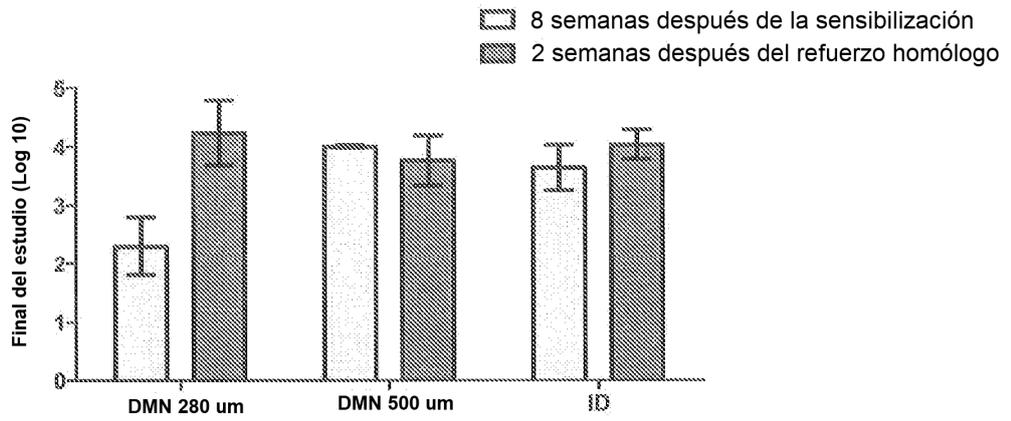


FIG. 8.



Sistema de entrega de vacuna contra adenovirus

FIG. 9.

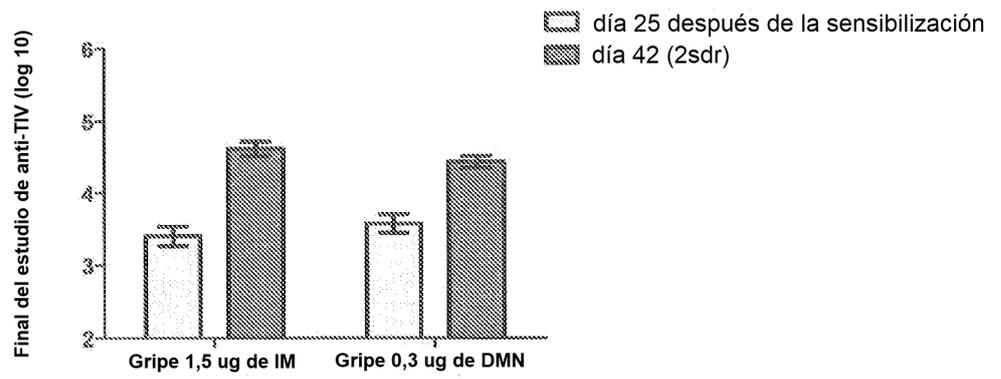


FIG. 10.