

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2011.04.27</b>	(73) Titular(es): <b>KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.</b> <b>2300 WINCHESTER ROAD NEENAH,</b> <b>WISCONSIN 54956</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2010.04.28 US 328723 P</b> <b>2010.11.08 US 411101 P</b> <b>2011.01.25 US 435973 P</b>	(72) Inventor(es): <b>RUSSELL FREDERICK ROSS</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2013.03.06</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2017.07.26</b> <b>166/2017</b>	

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO PARA ENTREGA DE MEDICAÇÃO PARA A ARTRITE REUMATÓIDE**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS DISPOSITIVOS PARA ENTREGAR UM FÁRMACO PARA A ARTRITE REUMATÓIDE ATRAVÉS DE UMA BARREIRA DÉRMICA. OS DISPOSITIVOS INCLUEM MICROAGULHAS PARA PENETRAR O ESTRATO CÓRNEO E TAMBÉM INCLUEM ESTRUTURAS FABRICADAS SOBRE UMA SUPERFÍCIE DAS MICROAGULHAS, PARA FORMAR UMA NANOTOPOGRAFIA. UM PERFIL ALEATÓRIO OU NÃO ALEATÓRIO DE ESTRUTURAS PODE SER FABRICADO, TAL COMO UM PERFIL COMPLEXO INCLUINDO ESTRUTURAS COM DIFERENTES DIMENSÕES E/OU FORMAS. O PERFIL DE ESTRUTURAS NA SUPERFÍCIE DAS MICROAGULHAS PODE INCLUIR ESTRUTURAS NANODIMENSIONAIS.

**RESUMO**

**"DISPOSITIVO PARA ENTREGA DE MEDICAÇÃO PARA A  
ARTRITE REUMATÓIDE"**

São descritos dispositivos para entregar um fármaco para a artrite reumatóide através de uma barreira dérmica. Os dispositivos incluem microagulhas para penetrar o estrato córneo e também incluem estruturas fabricadas sobre uma superfície das microagulhas, para formar uma nanotopografia. Um perfil aleatório ou não aleatório de estruturas pode ser fabricado, tal como um perfil complexo incluindo estruturas com diferentes dimensões e/ou formas. O perfil de estruturas na superfície das microagulhas pode incluir estruturas nanodimensionais.

## DESCRIÇÃO

### "DISPOSITIVO PARA ENTREGA DE MEDICAÇÃO PARA A ARTRITE REUMATÓIDE"

#### Estado da Técnica

A artrite reumatóide (RA) é uma doença crónica que afecta milhões de pessoas no mundo todo e para a qual não existe nenhuma cura conhecida. Embora habitualmente associada com ataque às sinóvias das articulações, a doença pode afectar múltiplos tecidos e órgãos, incluindo a pele, os pulmões, os rins e o sistema circulatório.

As opções de tratamento têm progredido através de melhorias da terapia nutricional, fisioterapia, terapia ocupacional e outros semelhantes. As opções de tratamento fisiológico também têm progredido para incluir o tratamento visando a supressão dos sintomas através da gestão da dor através da utilização de analgésicos e de anti-inflamatórios (tanto agentes anti-inflamatórios esteróides com não esteróides (NSAI)), bem como fármacos mais recentes anti-reumáticos de modificação da doença (os DMARD), que também podem incluir agentes biológicos (por exemplo inibidores de proteínas tis como os bloqueadores de TNF- $\alpha$  e os bloqueadores de IL-1, etc.).

Tanto a entrega sistémica do fármaco como a entrega alvejante do fármaco podem ser utilizadas no tratamento da RA. Por exemplo, entregam-se amiúde os anti-inflamatórios corticosteróides directamente por injeção numa articulação, enquanto vários DMARD são entregues por via oral sistemicamente numa tentativa de tornar mais lenta a progressão da doença. A entrega oral e a injeção têm sido os meios principais de entrega de fármacos para a RA. Estes métodos de aplicação são, no entanto, problemáticos, uma vez que os fármacos são entregues com uma concentração inicial muito alta seguindo-se um declínio constante da concentração. Além disto, como muitos dos DMARD denotam problemas de toxicidade, a concentração máxima inicial do fármaco é severamente limitada, e como tal a concentração que se segue à administração será extremamente pequena.

Os dispositivos de entrega de fármaco que proporcionam uma via para a entrega dos agentes para a RA num estado eficaz a concentrações eficazes e constantes ao longo de um período de tempo seriam muito vantajosos. Para atingir este objectivo é preciso ultrapassar muitas dificuldades. Por exemplo, O corpo humano desenvolveu muitos sistemas para evitar a entrada de substâncias estranhas tais como a degradação enzimática no tracto gastrointestinal, as componentes estruturais que evitam a absorção através do epitélio, a eliminação hepática, e a resposta imunológica e a corpos estranhos.

Têm sido desenvolvidos dispositivos transdérmicos para a entrega prolongada de determinados fármacos incluindo os destinados ao tratamento da vertigem e do vício do fumo, bem como para agentes contraceptivos. Para ser bem-sucedido, um dispositivo transdérmico tem que entregar um agente através da epiderme, que tenha evoluído com a função principal de manter as substâncias estranhas fora. A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, tem uma estabilidade estrutural proporcionada por corneócitos sobrepostos a fibras de queratina com ligações cruzadas mantidas em conjunto por coreodesmosomas e englobadas numa matriz lipídica, proporcionando este conjunto uma função barreira excelente. Por baixo do estrato córneo encontra-se o estrato granuloso, no qual se formam junções estreitas entre queratinócitos. As junções estreitas são estruturas em barreira que incluem uma rede de proteínas transmembranares englobadas em membranas de plasma adjacentes (por exemplo, claudinas, ocludina, e moléculas de adesão de junções) bem como múltiplas proteínas de placa (por exemplo, ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina, simplequina). Encontram-se junções estreitas no epitélio interno (por exemplo, no epitélio intestinal, na barreira sangue-cérebro) bem como no estrato granuloso da pele. Por baixo tanto do estrato córneo como do estrato granuloso encontra-se o estrato espinhoso. O estrato espinhoso inclui células de Langerhans, que são células dendríticas que se podem tornar em células funcionando

completamente como apresentadoras de antigénios e que podem instituir uma resposta imune e/ou uma resposta a um corpo estranho contra um agente invasor.

Foi proposta uma entrega transdérmica para determinados fármacos para a RA. Por exemplo, foram sugeridos pachos transdérmicos para utilização com plantas medicinais aiurvédicas (Verma, *et al.*, *Ancient Sci. Life*, 2007; **11**: 66-9) e com o analgésico fentanil (Berliner, *et al.*, *Clin. J. Pain*, 2007 Julho-Agosto; **23**(6): 530-4).

Infelizmente, os métodos de entrega transdérmica limitam-se hoje em dia à entrega de agentes com pequena massa molecular que possuam uma lipofilicidade moderada e não apresentem carga. Mesmo com o atravessamento bem-sucedido da fronteira natural, ainda existem problemas no tocante à manutenção da actividade dos agentes entregues e para evitar as respostas imunes e contra corpos estranhos.

A utilização de métodos suplementares para facilitar a entrega transdérmica de agentes activos tem melhorado esta via de entrega. Por exemplo, verificou-se que dispositivos com microagulhas eram úteis no transporte de material para ou através da pele, embora a utilização de um dispositivo de microagulhas com fármacos para a RA ainda não tenha sido descrita. Em geral, um dispositivo de microagulhas inclui um conjunto de agulhas que podem penetrar o estrato córneo da pele e atingem uma camada

subjacente. Foram descritos exemplos de dispositivos com microagulhas na Patente U.S. Nº 6.334.856 a favor de Allen, *et al.* e na Patente U.S. Nº 7.226.439 a favor de Prausnitz, *et al.*

Está descrito um dispositivo e um método de formar um dispositivo para entrega de um fármaco para a artrite reumatóide através de uma barreira dérmica, com as características do preâmbulo para as reivindicações 1 e 12 no WO 2008/024.141. Foram descritos outros dispositivos e métodos de formação de dispositivos para a entrega de agentes terapêuticos no WO 2005/049.128, no WO 2007/112.309, na EP 2.100.850, no WO 2009/079.589, no WO 2008/003.564 e no US 2008/312.610.

### **Descrição Resumida da Invenção**

Num seu aspecto, a invenção presente descreve um dispositivo para entrega de um ou mais fármacos para a artrite reumatóide (RA) através de uma barreira dérmica, consoante a reivindicação 1.

Num seu outro aspecto, a invenção presente descreve um método para formar um dispositivo para entrega de um fármaco para a artrite reumatóide através de uma barreira dérmica consoante a reivindicação 12.

### **Breve Descrição dos Desenhos**

Na parte seguinte desta especificação é feita uma descrição completa e instrutiva do assunto da invenção, incluindo o seu melhor modo, para indivíduos com conhecimentos médios da técnica, fazendo referência às figuras apenas, nas quais:

A Fig. 1 ilustra uma concretização de um dispositivo de microagulhas.

A Fig. 2 ilustra outra concretização de um dispositivo de microagulhas.

A Fig. 3 ilustra uma concretização de uma microagulha incluindo uma superfície que define uma nanotopografia que pode interagir com uma matriz extracelular (ECM).

A Fig. 4 ilustra uma concretização de um perfil complexo que pode ser formado numa superfície de uma microagulha.

A Fig. 5 ilustra um perfil incluindo múltiplas iterações do perfil complexo da Fig. 4.

A Fig. 6 ilustra um fractal triangular de Sierpinski.

As Figs. 7A-7D ilustram nanotopografias de um fractal complexo e semelhantes a um fractal.

A Fig. 8 ilustra outro perfil complexo que pode ser formado à superfície de uma microagulha.

A Fig. 9 ilustra densidades de empacotamento exemplares como podem ser utilizadas para

estruturas nanodimensionais como as descritas neste documento incluindo uma concepção de empacotamento quadrado (Fig. 9A), uma concepção de empacotamento hexagonal (Fig. 9B), e uma concepção de empacotamento circular (Fig. 9C). As Figs. 10A-10C ilustram esquematicamente um método de nanoimpressão tal com se pode utilizar numa concretização de formação de um dispositivo.

A Fig. 11 ilustra esquematicamente uma concretização de um dispositivo.

A Fig. 12 é uma vista em perspectiva de uma concretização de um pacho transdérmico antes da entrega de um composto farmacológico.

A Fig. 13 é uma vista de frente do pacho da Fig. 13.

A Fig. 14 é uma vista em perspectiva do pacho da Fig. 12 em que o membro libertado está parcialmente retirado do pacho.

A Fig. 15 é uma vista de frente do pacho da Fig. 12.

A Fig. 16 é uma vista em perspectiva do pacho transdérmico da Fig. 12 depois da remoção do membro de libertação e durante a utilização.

A Fig. 17 é uma vista de frente do pacho da Fig. 16.

A Fig. 18 é uma vista em perspectiva de outra concretização de um pacho transdérmico antes da entrega do composto farmacológico.

A Fig. 19 é uma vista de frente do pacho da Fig. 18.

A Fig. 20 é uma vista em perspectiva do pacho da Fig. 18 em que o membro de libertação está parcialmente removido por pelagem a partir do pacho.

A Fig. 21 é uma vista de frente do pacho da Fig. 20.

A Fig. 22 é uma vista em perspectiva do pacho da Fig. 18 em que o membro de libertação está completamente pelado a partir do pacho.

A Fig. 23 é uma vista em perspectiva do pacho transdérmico da Fig. 18 após remoção do membro de libertação e durante a utilização.

As Figs. 24A-24E ilustram diversos perfis de nanotopografia tais como descritos neste documento.

A Fig. 25 é uma SEM de uma película incluindo uma superfície com um nanoperfil.

As Figs. 26A e 26B são duas SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 27 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 28 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 29 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 30 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 31 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 32 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 33 é uma SEM de uma película incluindo outra superfície com um nanoperfil.

A Fig. 34 ilustra graficamente os efeitos da permeabilidade da albumina de soro de bovino (BSA) numa monocamada de células em películas em poliestireno com perfis de nanoperfis tal como descritos neste documento.

As Fig. 35A e 35B ilustram graficamente os efeitos sobre a permeabilidade a imunoglobulina-G (IgG) numa monocamada de células numa película em poliestireno perfilado com nanoperfis tal como descrito neste documento.

As Figs. 36A e 36B são imagens de contrastação 3D viva/morta com fluoresceína mostrando o transporte paracelular e transcelular de IgG através de uma monocamada de células numa superfície em poliestireno perfilada como descrito neste documento.

A Fig. 37 ilustra graficamente os efeitos da permeabilidade a BSA numa monocamada de células em películas em polipropileno perfiladas com nanoperfis tal como descritos neste documento.

A Fig. 38 ilustra graficamente os efeitos sobre a permeabilidade em relação a IgG numa monocamada de células em películas em polipropileno perfiladas como nanoperfis tal como descrito neste documento.

As Figs. 39A e 39B são imagens de contrastação 3D viva/morta com fluoresceína mostrando o transporte paracelular de IgG através de uma monocamada de células numa superfície em polipropileno perfilada como descrito neste documento.

As Figs. 40A-40F são imagens de microscopia electrónica de varrimento (SEM) de células cultivadas em superfícies nanoperfiladas tal como descrito neste documento.

A Fig. 41 ilustra os efeitos sobre a permeabilidade a etanercept numa monocamada de células sobre películas em polipropileno ou poliestireno perfilados com nanoperfis tal como descritas neste documento.

A Fig. 42 ilustra o aumento da permeabilidade ao etanercept de uma camada celular após duas horas de contacto com películas em

polipropileno ou poliestireno perfilados com nanoperfis tal como descritas neste documento.

A Fig. 43 é um conjunto de microagulhas incluindo uma camada superficial definindo um perfil de nanoestruturas sobre ela.

A Fig. 44 é uma microagulha única do conjunto da Fig. 43.

A Fig. 45 ilustra graficamente o perfil de PK de uma terapêutica proteica entregue com um dispositivo tal como descrito neste documento.

As Fig. 46A e 46B são imagens de secções cruzadas da pele após entrega transdérmica de uma terapêutica proteica através da pele. A Fig. 46A é uma secção cruzada de pele que esteve em contacto com um dispositivo transdérmico definindo uma nanotopografia sobre ela, e a Fig. 46B é uma secção cruzada de pele que esteve em contacto com um dispositivo transdérmico não incluindo nenhum perfil de nanotopografia formado sobre ela.

A Fig. 47 ilustra graficamente a concentração no soro de sangue de uma terapêutica proteica entregue com um dispositivo tal como descrito neste documento.

**Descrição Pormenorizada de Concretizações Representativas**

Será agora feita referência em pormenor a diversas concretizações do assunto descrito, um ou mais exemplos do qual se encontram adiante. Cada exemplo é proporcionado a título de explicação, e não de limitação. De facto, será aparente aos indivíduos com conhecimentos técnicos que se podem fazer diversas modificações e variações da descrição presente sem que exista afastamento em relação ao assunto. Pretende-se que a descrição presente inclua essas modificações e variações tal como se incluem no âmbito das reivindicações apensas.

Em geral, é descrito um dispositivo para a entrega de compostos úteis no tratamento da RA. Mais especificamente, o dispositivo inclui uma pluralidade de microagulhas numa superfície e um perfil de estruturas fabricadas nas microagulhas. Pelo menos uma porção das estruturas é fabricada numa escala nanométrica. O dispositivo também está associado a um ou mais fármacos para RA, num reservatório que se encontra em comunicação por fluido com a superfície que inclui as microagulhas.

O dispositivo pode incluir e entregar compostos que suprimem os sintomas, tais como analgésicos e fármacos anti-inflamatórios, bem como compostos DMARD, incluindo DMARD biológicos. Sem que se pretenda uma dependência de qualquer teoria em particular, entende-se que as estruturas à escala nanométrica fabricadas na superfície do dispositivo melhoram a entrega dos compostos através da

barreira dérmica. Pela utilização do dispositivo, os fármacos para a RA podem ser entregues a uma concentração estável ao longo de um período prolongado de tempo. O dispositivo pode evitar o pico inicial de concentração que é habitual quando se utilizam métodos previamente conhecidos para entrega de fármacos para a RA, incluindo a entrega oral e a injeção.

Podem incorporar-se os fármacos para RA no dispositivo, incluindo sem limitação, um ou mais analgésicos, anti-inflamatórios, DMARD, fármacos baseados em ervas, e as suas combinações. Compostos específicos podem, evidentemente, estar adentro de uma ou mais das categorias gerais descritas neste documento. Por exemplo, muitos compostos funcionam tanto como analgésicos como fármacos anti-inflamatórios; os fármacos derivados de ervas podem de igual modo funcionar como DMARD e também como anti-inflamatórios. Além disto, múltiplos compostos que podem ser englobados numa única categoria podem ser incorporados no dispositivo. Por exemplo, o dispositivo pode incluir múltiplos analgésicos, tais como acetaminofene com codeína, acetaminofeno com hidrocodona (vicodina), e assim por diante.

Incluem-se nos exemplos dos analgésicos e/ou NSAID que se podem incorporar nos dispositivos, analgésicos disponíveis sem receita (OTC) a doses relativamente pequenas, incluindo acetamida (acetaminofene ou

paracetamol), ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e naproxeno sódico, e outros semelhantes. Podem incluir-se nos analgésicos e/ou anti-inflamatórios sob prescrição que se podem incorporar no dispositivo, sem limitação, analgésicos OTC a concentrações obrigando a uma prescrição, celecoxib, sulindac, oxaprozina, salsalato, piroxicam, indometacina, etodolac, meloxicam, nabumetona, ceterolac e cetorolac trometamina, tolmetina, diclofenac, diproqualona e diflunisal. Podem incluir-se nos analgésicos narcóticos codeína, hidrocodona, oxycodona, fentanil e propoxifeno.

O dispositivo pode incluir um ou mais compostos esteróides anti-inflamatórios, sobretudo glucocorticóides, incluindo, sem limitação, cortisona, dexametasona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona, tramcinolona, e metilprednisolona, betametasona e aldosterona.

Os DMARD que se podem incluir no dispositivo podem incluir tanto fármacos que sejam moléculas pequenas como agentes biológicos. Podem sintetizar-se quimicamente os DMARD, ou podem produzir-se por processos de engenharia genética (por exemplo, por técnicas recombinantes).

Incluem-se nos DMARD quimicamente sintetizados incluídos neste documento, sem limitação, azatioprina, ciclosporina (ciclosporina, ciclosporina A), D-penicilamina, sais de ouro (por exemplo, auranofina,

aurotiomalato de sódio (Miocrisma), cloroquina, hidroxicloroquina, leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfassalazina e ciclofosfamida. Incluem-se nos DMARD biológicos, sem limitação, os bloqueadores de TNF- $\alpha$  tais como etanercept (Enbrel<sup>®</sup>), infliximab (Remicade<sup>®</sup>), adalimumab (Humira<sup>®</sup>), certolizumab pegó (Cimzia<sup>®</sup>) e golumumab (Simponi<sup>™</sup>); os bloqueadores de IL-1 tais como anakinra (Kineret<sup>®</sup>); anticorpos monoclonais contra células B incluindo rituximab (Rituxan<sup>®</sup>); bloqueadores da coestimulação de células T tais como abatacept (Orencia<sup>®</sup>), e bloqueadores de IL-6 tais como tocilizumab (RoActemra<sup>®</sup>, Actemra<sup>®</sup>); um inibidor de calcineurina tal como tacrolimus (Prograf<sup>®</sup>).

O dispositivo pode incorporar um ou mais fármacos baseados em ervas ou outros derivados de produtos naturais. Por exemplo, podem ser incorporados no dispositivo compostos aiurvédicos tais como ácido bosuéllico (extracto de *Boswellia serrata*) e curcumina (curcuminóides de *Curcuma longa*), bem como outros compostos derivados de produtos naturalis tais como sulfato de glucosamina (produzido por hidrólise de exoesqueletos de crustáceos ou por fermentação de um grão).

O dispositivo pode incorporar múltiplos fármacos para RA. Por exemplo, o dispositivo pode incluir uma combinação de DMARD para além de um fármaco analgésico e/ou um anti-inflamatório. Incluem-se nas combinações habituais

de DMARD, por exemplo, metotrexato em combinação com hidroxicloroquina, metotrexato em combinação com sulfassalazina, sulfassalazina em combinação com hidroxicloroquina, e todos estes três DMARD em conjunto, isto é, hidroxicloroquina, metotrexato e sulfassalazina.

Os dispositivos podem incorporar vantajosamente compostos com massa molecular elevada e/ou pequena. Por exemplo, antigamente, a entrega transdérmica de terapêuticas proteicas tem provado ser problemática devido às barreiras naturais da pele. Sem que signifique uma ligação a uma qualquer teoria, a presença da nanotopografia de uma microagulha do dispositivo pode interactuar vantajosamente com células e a ECM da barreira dérmica e melhorar a eficácia da entrega e absorção de terapêuticas proteicas. Como se utiliza neste documento, o termo 'terapêutica proteica' refere-se em geral a qualquer composto proteico biologicamente activo incluindo, sem limitação, compostos naturais, sintéticos e recombinantes, proteínas de fusão, quimeras, e assim por diante, bem como compostos incluindo os 20 aminoácidos padrão e/ou aminoácidos sintéticos. Por exemplo, a presença do dispositivo no ou na proximidade do estrato granuloso pode abrir junções estreitas e permitir e/ou melhorar o transport paracelular de agentes com massa molecular elevada. Como se utiliza neste documento, o termo agentes com massa molecular elevada refere-se em geral a agentes definindo uma massa molecular maior do que cerca de 400 Da,

maior do que cerca de 10 kDa, maior do que cerca de 20 kDa, ou maior do que cerca de 100 kDa).

Mesmo quando se encara a entrega de fármacos com menor massa molecular para RA, o dispositivo pode proporcionar uma maior eficácia e uma melhor absorção devido à interacção do dispositivo com componentes do tecido conjuntivo dérmico acompanhadas por uma diminuição da resposta a corpos estranhos e um melhor aumento do potencial químico localizado da área. Além disto, o dispositivo pode entregar os fármacos para RA a uma concentração constante ao longo de um período de tempo longo, o que pode ser vantajoso.

O dispositivo inclui, para além do ou dos fármacos para RA, microagulhas sobre as quais foram fabricadas diversas estruturas nanodimensionais. Tal como se utiliza neste documento, o termo 'fabricadas' refere-se em geral a estruturas que hajam sido especificamente concebidas, produzidas, e/ou construídas de modo a existir numa superfície do dispositivo e não deve ser equacionada a um aspecto da superfície que seja meramente um produto ocasional de um processo de formação do dispositivo. Deste modo, existirá um perfil de nanoestruturas previamente determinado sobre a superfície das microagulhas.

Durante a utilização, o dispositivo, e especificamente, as estruturas nanodimensionais na

superfície das microagulhas, podem interagir com o tecido dérmico e as suas componentes. Esta interação pode regular ou modular (isto é modificar) a transdução intracelular e/ou de sinais associada com as interações entre células, com a endocitose, a resposta inflamatória, e assim por diante. Por exemplo, através da interação entre a nanotopografia numa superfície e os materiais ou estruturas biológicas vizinhas, o dispositivo pode regular e/ou modular o potencial de membrana, as proteínas membranares, e/ou as junções intercelulares (por exemplo, junções estreitas, junções de lacunas, e/ou desmassomas). Isto pode encorajar a entrega transdérmica dos fármacos para RA. Além disto, os fármacos para RA podem ser entregues através da barreira dérmica sem instigar uma resposta contra corpos estranhos ou imune.

Devido à melhor interação com as componentes biológicas vizinhas, os dispositivos podem facilitar uma melhor absorção de um agente entregue. Por exemplo, o perfil farmacocinético (PK) (isto é, o perfil da absorção através das membranas epiteliais) de uma terapêutica proteica pode ser melhorado através da utilização de um dispositivo incluindo um perfil nanotopográfico. A título de exemplo, uma terapêutica proteica com uma massa molecular maior do que 100 kDa, por exemplo de entre cerca de 20 kDa e cerca de 200 kDa, ou de cerca de 150 kDa, pode ser entregue por via transdérmica através de um pacho no qual se defina uma nanotopografia. Numa concretização, pode

utilizar-se um pacho para entregar uma dose única da terapêutica proteica, por exemplo entre cerca de 200 e cerca de 500  $\mu\text{L}$ , ou cerca de 250  $\mu\text{L}$ . Depois da ligação do pacho transdérmico à pele, o receptor pode exibir um perfil PK que reflecte um aumento rápido da concentração no soro do sangue de entre cerca de 500 e cerca de 1.000 nanogramas de terapêutica por mililitro por centímetro quadrado da área do pacho, por exemplo entre cerca de 750 e cerca de 850 nanogramas de terapêutica por mililitro por centímetro quadrado de área do pacho, adentro de entre cerca de 1 e cerca de 4 horas da administração. Este aumento inicial rápido do teor no soro de sangue, que reflecte uma absorção rápida da terapêutica através da barreira dérmica, pode ser seguido por uma diminuição menos rápida da concentração no soro de sangue ao longo de entre cerca de 20 e cerca de 30 horas, por exemplo ao longo de cerca de 24 horas, até a uma concentração do terapêutico no soro sanguíneo que seja desprezável. Além disto, a absorção rápida do terapêutico entregue pode ser acompanhada por pouca ou nenhuma inflamação. Especificamente, além de promover uma entrega melhor de um agente através de uma barreira dérmica, os dispositivos também podem limitar a resposta a corpo estranho e outras reacções indesejáveis, tais como a inflamação. A utilização de dispositivos anteriormente conhecidos, tais como pachos transdérmicos sem nenhuma nanotopografia definida na superfície de contacto com a pele, levavam amiúde a áreas locais de inflamação e irritação.

Adicionalmente, e sem que se pretenda ficar ligado a nenhuma teoria em especial, crê-se que por interação com um substrato com um nanoperfil, as células individuais podem sofrer uma regulação em alta ou em baixa da produção de determinadas citocinas, incluindo determinadas quimioquinas. Através desta alteração no perfil de expressão, a resposta celular a um dispositivo de entrega de fármaco pode ser minimizada. Por exemplo, pode minimizar-se a inflamação e/ou a resposta a um corpo estranho através da regulação em alta de uma ou mais citocinas anti-inflamatórias e/ou da regulação em baixa de uma ou mais citocinas pró-inflamatórias. Muitas citocinas foram caracterizadas consoante o seu efeito sobre a inflamação. As citocinas pró-inflamatórias que podem demonstrar perfis de expressão alterados quando as células que as expressam são afectadas pela presença de um dispositivo incluindo uma nanotopografia fabricado nelas podem incluir, sem limitação, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL16, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , KC, MCP-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, VEGF, e outras semelhantes. As citocinas anti-inflamatórias que podem demonstrar um perfil de expressão alterado podem incluir, sem limitação, IL-1 ra, IL-4, IL-10, IL-13, e outras semelhantes. As citocinas associadas à resposta a um corpo estranho que podem demonstrar um perfil de expressão alterado podem incluir, sem limitação, IL-4, IL-10, IL-13, e assim por diante.

O dispositivo pode ser construído a partir de diversos materiais, incluindo metais, cerâmicos, semicondutores, orgânicos, polímeros, etc., bem como dos seus compósitos. A título de exemplo, podem utilizar-se para formar um dispositivo aço inoxidável com pureza farmacêutica, titânio, níquel, ferro, ouro, estanho, crómio, cobre, ligas de estes ou outros metais, silício, dióxido de silício, e polímeros. Tipicamente, as microagulhas do dispositivo são formadas de um material biocompatível que seja capaz de exibir um perfil com estruturas nanodimensionais sobre uma superfície. O termo "biocompatível" refere-se em geral a material que não afecte adversamente de modo substancial as células ou os tecidos na área na qual se entregará o dispositivo. Também se pretende que os materiais não provoquem nenhum efeito substancialmente indesejável do ponto de vista medicinal em nenhuma outra área de um sujeito vivo que esteja a utilizar um dispositivo. Os materiais biocompatíveis podem ser sintéticos ou naturais. Alguns exemplos de materiais biocompatíveis, que são também biodegradáveis, incluem polímeros de hidroxiácidos tais como ácido láctico e polilactido de ácido glicólico, poliglicólido, polilactido-co-glicólido, copolímeros com PEG, polianidridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), e poli(lactido-co-caprolactona). Podem incluir-se em outros materiais adequados, sem limitação, policarbonato, poli-ácido metacrílico, acetato de etilenovinilo, politetrafluoroetileno, e poliésteres. As

diversas componentes de um dispositivo (por exemplo, as microagulhas, a base, o topo, as áreas contendo fármacos, etc.) podem ter natureza porosa ou não porosa, podem ser homogêneas ou heterogêneas ao longo do dispositivo, no que toca a materiais, geometria, solidez, e assim por diante, e podem ter uma forma rígida fixa ou semifixa.

A Fig. 1 ilustra um dispositivo transdérmico com microagulhas típico 10. Tal como se pode ver, o dispositivo inclui um conjunto de agulhas individuais 12; cada uma das quais formada a uma dimensão e forma assegurando que penetre na totalidade ou em parte a barreira dérmica sem quebrar as microagulhas individuais. As microagulhas podem ser sólidas, como na Fig. 1, porosas, ou podem incluir uma parte oca. Uma microagulha pode incluir uma porção oca, por exemplo, uma cavidade anelar que se pode prolongar pela totalidade ou parte da agulha, paralelamente à direcção da agulha ou a um ângulo ou saindo por um lado da agulha, consoante apropriado. Por exemplo, a Fig. 2 ilustra um conjunto de microagulhas 14 incluindo cada uma delas um canal 16 de um dos lados da agulha que pode ser utilizado para entrega de um fármaco para a RA a uma localização subdérmica. Por exemplo, um canal 16 pode estar parcialmente alinhado com uma abertura na base 15 de modo a formar uma junção entre a abertura e o canal 16, permitindo a passagem de uma substância através do canal 16.

Podem seleccionar-se as dimensões do canal 16, quando presente, especificamente de modo a induzir um caudal capilar de um fármaco. Ocorre em geral um caudal capilar quando as forças adesivas de um fluido para as paredes de um canal são maiores do que as forças coesivas entre as moléculas do líquido. Especificamente, a tensão capilar é inversamente proporcional à dimensão da secção transversal do canal 16 e directamente proporcional à tensão superficial do líquido, multiplicada pelo coseno do ângulo de contacto do fluido em contacto com o material que forma o canal. Deste modo, para facilitar o caudal capilar no pacho, a dimensão da secção transversal (por exemplo, largura, diâmetro, etc.) do canal 16 pode ser selectivamente controlada, sendo que as dimensões menores resultam em geral em maior tensão capilar. Por exemplo, em algumas concretizações, a dimensão da secção transversal do canal é tipicamente de entre cerca de 1 micrómetro e cerca de 100 micrómetros, em algumas concretizações de entre cerca de 5 micrómetros e cerca de 50 micrómetros, e em algumas concretizações, de entre cerca de 10 micrómetros e cerca de 30 micrómetros. A dimensão pode ser constante ou pode variar como função do comprimento do canal 16. O comprimento do canal também pode variar para acomodar diferentes volumes, caudais, e períodos de permanência para o fármaco. Por exemplo, o comprimento do canal pode ser de entre cerca de 10 micrómetros e cerca de 800 micrómetros, em algumas concretizações pode ser de entre 50 micrómetros e cerca de 500 micrómetros, e em algumas concretizações,

entre cerca de 100 micrómetros e cerca de 300 micrómetros. A área da secção transversa do canal também pode variar. Por exemplo, a área da secção transversa pode ser de entre 50 micrómetros quadrados e cerca de 1.000 micrómetros quadrados, em algumas concretizações pode ser de entre cerca de 100 micrómetros quadrados e cerca de 500 micrómetros quadrados, e em algumas concretizações, de entre cerca de 150 micrómetros quadrados e cerca de 350 micrómetros quadrados. Além disto, a razão de aspecto (comprimento/dimensão da secção transversal) do canal pode variar entre cerca de 1 e cerca de 50, em algumas concretizações entre cerca de 5 e cerca de 40, e em algumas concretizações entre cerca de 10 e cerca de 20. Nos casos em que a dimensão da secção transversal (por exemplo, largura, diâmetro, etc.) e/ou do comprimento possa variar em função do comprimento, a razão de aspecto pode ser determinada a partir das dimensões médias.

Deve entender-se que o número de microagulhas ilustrado nas figuras tem objectivos meramente ilustrativos. O número real de microagulhas utilizado num conjunto de microagulhas pode ser, por exemplo, de entre cerca de 500 e cerca de 10.000, em algumas concretizações entre cerca de 2.000 e cerca de 8,000, e em algumas concretizações, entre cerca de 4.000 e cerca de 6.000.

Uma microagulha individual pode ter um fuste direito ou afunilado. Numa concretização, o diâmetro de uma

microagulha pode ser máximo na base da microagulha e afunilar-se até um ponto no terminal mais distante da base. Uma microagulha pode também ser fabricada para ter um fuste que inclui tanto uma porção direita (não afunilada) e uma porção afunilada.

Uma microagulha pode ser formada com um fuste cuja secção transversal seja circular ou não circular. Por exemplo, a secção transversal de uma microagulha pode ser poligonal (por exemplo em forma de estrela, quadrada, triangular), oblonga, ou ter outra forma qualquer. O fuste pode ter um ou mais furos e/ou canais.

Pode otimizar-se o tamanho das agulhas individuais dependendo da espessura de alveamento pretendida, das necessidades de resistência da agulha para evitar uma quebra num tipo de tecido determinado, etc. Por exemplo, a dimensão da secção transversal de uma microagulha transdérmica pode ser de entre cerca de 10 nanómetros (nm) e 1 milímetro (mm), ou de entre cerca de 1 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ) e cerca de 200 micrómetros, ou de entre cerca de 10 micrómetros e cerca de 100 micrómetros. O diâmetro exterior pode ser de entre cerca de 10 micrómetros e cerca de 100 micrómetros e o diâmetro interior de uma agulha oca pode ser de entre cerca de 3 micrómetros e cerca de 80 micrómetros. A ponta apresenta tipicamente um raio menor ou igual a cerca de 1 micrómetro.

O comprimento de uma microagulha dependerá em geral da aplicação a que se destina. Por exemplo, uma microagulha pode ter um comprimento de entre cerca de 1 micrómetro e cerca de 1 milímetro, por exemplo cerca de 500 micrómetros ou menos, ou entre cerca de 10 micrómetros e cerca de 500 micrómetros, ou entre cerca de 30 micrómetros e cerca de 200 micrómetros.

Um conjunto de microagulhas não tem que incluir microagulhas que sejam todas idênticas. Um conjunto pode incluir a mistura de microagulhas com diversos comprimentos, diversos diâmetros externos, diâmetros internos, formas da secção transversal, superfícies nanoestruturadas, e/ou espaçamentos entre as microagulhas. Por exemplo, as microagulhas podem ser espaçadas de uma maneira uniforme, tal como numa malha rectangular ou quadrada ou em círculos concêntricos. O espaçamento pode depender de numerosos factores, incluindo a altura e a largura das microagulhas, bem como a quantidade e o tipo de qualquer substância que se pretenda movimentar através das microagulhas. Enquanto diversas disposições de microagulhas podem ser úteis, uma disposição especialmente útil das microagulhas é a de um espaçamento "ponta-a-ponta" entre microagulhas com cerca de 50 micrómetros ou mais, em algumas concretizações cerca de 100 a cerca de 800 micrómetros, e em algumas concretizações, entre cerca de 200 e cerca de 600 micrómetros.

Fazendo de novo referência à Fig. 1, as microagulhas podem estar mantidas num substrato 20 (isto é, ligadas ou sendo uma unidade em conjunto com um substrato) de tal modo que esteja orientada na perpendicular ou a um ângulo com o substrato. Numa concretização, as microagulhas podem estar orientadas na perpendicular ao substrato podendo ser proporcionada uma maior densidade de microagulhas por unidade de área do substrato. No entanto, um conjunto de microagulhas pode incluir uma mistura de orientações de microagulhas, de alturas, de materiais, ou de outros parâmetros. O substrato 20 pode ser construído a partir de uma folha rígida ou flexível de metal, cerâmico, plástico ou outro material. O substrato 20 pode ter uma espessura variável para corresponder às necessidades do dispositivo, tal como de cerca de 1.000 micrómetros ou menos, em algumas concretizações entre cerca de 1 e cerca de 500 micrómetros, e em algumas concretizações, entre cerca de 10 e cerca de 200 micrómetros.

O dispositivo pode definir uma nanotopografia na superfície de uma microagulha com um perfil aleatório ou organizado. O dispositivo pode adicionalmente definir uma nanotopografia na superfície do substrato a partir da qual a microagulha se estende, embora isto não seja necessário. A Fig. 3 ilustra esquematicamente as extremidades de duas microagulhas representativas 22. Nesta concretização específica, as microagulhas 22 definem um buraco principal 24 tal como se pode utilizar para a entrega de um fármaco

para a RA através das microagulhas 22. A superfície 25 da microagulha 22 pode definir a nanotopografia 26. Nesta concretização específica, a nanotopografia 26 define um perfil aleatório na superfície 25 da microagulha 22.

Uma microagulha pode incluir uma pluralidade de estruturas idênticas formadas numa superfície ou pode incluir diferentes estruturas formadas com diversos tamanhos, formas e suas combinações. Um perfil predeterminado de estruturas pode incluir uma mistura de estruturas com diversos comprimentos, diâmetros, formas de secção transversa, e/ou espaçamentos entre as estruturas. Por exemplo, as estruturas podem ser espaçadas entre si de um modo uniforme, tal como numa malha rectangular ou quadrada ou em círculos concêntricos. Numa concretização, as estruturas podem variar quanto ao seu tamanho e/ou forma e podem formar uma nanotopografia complexa. Por exemplo, uma nanotopografia complexa pode definir um fractal ou uma geometria do tipo da de um fractal.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "fractal" refere-se em geral a uma estrutura geométrica ou física com uma forma fragmentada em todas as escalas de medição, entre a maior e a menor escala, de tal modo que determinadas propriedades matemáticas ou físicas da estrutura se comportam como se as dimensões da estrutura fossem maiores do que as dimensões espaciais. As propriedades matemáticas ou físicas com interesse podem

incluir, por exemplo, o perímetro de uma curva ou o caudal num meio poroso. A forma geométrica de um fractal pode ser separada em partes, cada uma das quais define auto-semelhança. Adicionalmente, um fractal tem uma definição recursiva e uma estrutura fina a escalas arbitrariamente pequenas.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "semelhante a fractal" refere-se em geral a uma estrutura geométrica ou física com uma ou mais, mas não todas, as características de um fractal. Por exemplo, uma estrutura semelhante a fractal pode incluir uma forma geométrica que inclui partes auto-semelhantes, mas pode não incluir uma estrutura fina a uma escala arbitrariamente pequena. Noutro exemplo, uma forma geométrica ou uma estrutura física semelhante a fractal pode não diminuir (ou aumentar) em escala igualmente entre iterações de escala, como um fractal pode, embora aumente ou diminua entre iterações recursivas de uma forma geométrica do perfil. Um perfil semelhante a fractal pode ser mais simplea do que um fractal. Por exemplo, pode ser regular e descrita de modo relativamente fácil em linguagem geométrica tradicional Euclidiana, enquanto um fractal não o pode.

A título de exemplo, a superfície de microagulha definindo uma nanotopografia complexa pode incluir estruturas com a mesma forma geral (por exemplo, pilares) e os pilares podem ser formados a diferentes escalas de

medição (por exemplo, pilares em nanoescala bem como pilares em microescala). Noutra concretização, a microagulha pode incluir numa superfície estruturas que variam tanto na dimensão da escala como na forma ou que variam apenas na forma enquanto formadas à mesma nanoescala. Adicionalmente, podem ser formadas estruturas numa disposição organizada ou com uma distribuição aleatória. Em geral, pelo menos uma porção das estruturas podem ser nanoestruturas formadas a uma nanoescala, por exemplo, definindo uma dimensão de secção transversa inferior a cerca de 500 nanómetros, por exemplo inferior a cerca de 400 nanómetros, inferior a cerca de 250 nanómetros, ou inferior a cerca de 100 nanómetros. A dimensão da secção transversal das nanoestruturas pode ser em geral maior do que cerca de 5 nanómetros, por exemplo maior do que cerca de 10 nanómetros, ou maior do que cerca de 20 nanómetros. Por exemplo, as nanoestruturas podem defini uma dimensão de secção transversal de entre cerca de 5 nanómetros e cerca de 500 nanómetros, entre cerca de 20 nanómetros e cerca de 400 nanómetros, ou de entre cerca de 100 nanómetros e cerca de 300 nanómetros. Nos casos em que a dimensão da secção transversal de uma nanoestrutura varia em função da altura da nanoestrutura, a dimensão da secção transversa pode ser determinada como uma média da base à ponta das nanoestruturas, ou como a dimensão máxima da secção transversa da estrutura, por exemplo a dimensão da secção transversa na base de uma nanoestrutura em forma de cone.

A Fig. 4 ilustra uma concretização de uma nanotopografia complexa como pode ser formada numa superfície. Este perfil específico inclui um pilar central grande 100 e pilares circundantes 102, 104, com menores dimensões proporcionados num perfil regular. Como se pode ver, este perfil inclui uma iteração de pilares, cada um dos quais é formado com a mesma forma geral, mas varia em relação à dimensão horizontal. Este perfil complexo específico é um exemplo de um perfil semelhante a fractal que não inclui uma alteração idêntica em escala entre iterações recursivas sucessivas. Por exemplo, enquanto os pilares 102 são primeiras nanoestruturas que definem uma dimensão horizontal que é cerca de um terço da do maior pilar 100, que é uma microestrutura, sendo os pilares 104 segundas nanoestruturas que definem uma dimensão horizontal que é cerca de metade da dos pilares 102.

Um perfil que inclui estruturas de diferentes dimensões pode incluir estruturas maiores com uma dimensão de secção transversal formada numa maior escala, por exemplo, microestruturas com uma dimensão da secção transversal maior do que cerca de 500 nanómetros em combinação com nanoestruturas menores. Numa concretização, as microestruturas de uma nanotopografia complexa podem ter uma dimensão de secção transversal de entre cerca de 500 nanómetros e cerca de 10 micrómetros, de entre cerca de 600 nanómetros e cerca de 1,5 micrómetros, ou de entre cerca de

650 nanómetros e cerca de 1,2 micrómetros. Por exemplo, a nanotopografia complexa da Fig. 4 inclui pilares de microdimensão 100 com uma dimensão da secção transversal de cerca de 1,2 micrómetros.

Quando um perfil inclui uma ou mais microestruturas maiores, por exemplo, com uma dimensão da secção transversal maior do que cerca de 500 nanómetros, determinada quer como dimensão média de secção transversal para a estrutura, quer como a maior dimensão da secção transversal da estrutura, a nanotopografia complexa também incluirá nanoestruturas, por exemplo, primeiras nanoestruturas, segundas nanoestruturas com tamanho e/ou forma diferentes, etc. Por exemplo, os pilares 102 da nanotopografia complexa da Fig. 4 têm uma dimensão da secção transversa de cerca de 400 nanómetros, e os pilares 104 têm uma dimensão da secção transversa de cerca de 200 nanómetros.

Uma nanotopografia pode ser formada em qualquer número de elementos diferentes. Por exemplo, um perfil de elementos pode incluir dois elementos diferentes, três elementos diferentes, estando ilustrado um exemplo dela na Fig. 4, quatro elementos diferentes, ou mais. As proporções relativas da recorrência de cada elemento diferente também podem variar. Numa concretização, os elementos mais pequenos de um perfil estarão presentes em maior número do que os elementos maiores. Por exemplo no perfil da Fig. 4,

existem oito pilares 104 para cada pilar 102, e existem oito pilares 102 para o pilar central grande 100. À medida que os elementos aumentam de tamanho, existirão em geral menores recorrências do elemento na nanotopografia. A título de exemplo, um primeiro elemento que seja de cerca de 0,5, por exemplo entre cerca de 0,3 e cerca de 0,7 em termos de área da secção transversal, enquanto um elemento maior possa estar presente na topografia cerca de cinco vezes ou mais do que o segundo elemento. Um primeiro elemento que tenha cerca de 0,25, ou entre cerca de 0,15 e cerca de 0,3 de área da secção transversa do que um segundo elemento maior, pode estar presente na topografia cerca de 10 ou mais vezes do que o segundo elemento.

O espaçamento entre elementos individuais também pode variar. Por exemplo, a distância centro a centro das estruturas individuais pode ser de entre 50 nanómetros e cerca de 1 micrómetro, por exemplo entre cerca de 100 nanómetros e cerca de 500 nanómetros. Por exemplo, a distância centro a centro das estruturas individuais pode ser numa escala nanodimensional. Por exemplo, quando se considera a distância entre estruturas nanodimensionais, a distância centro a centro das estruturas pode ser inferior a cerca de 500 nanómetros. Isto não é obrigatório para uma topografia, no entanto, e as estruturas individuais podem estar mais distantes umas das outras. A distância centro a centro das estruturas pode variar dependendo do tamanho das estruturas. Por exemplo, a razão da média das dimensões das

secções transversais de duas estruturas adjacentes e a distância centro a centro das duas estruturas pode ser de entre cerca de 1:1 (por exemplo, tangentes) e cerca de 1:4, de entre cerca de 1:1,5 e cerca de 1:3,5, ou entre cerca de 1:2 e cerca de 1:3. Por exemplo, a distância centro a centro pode se aproximadamente dupla da média das dimensões das secções transversais de duas estruturas adjacentes. Numa concretização, duas estruturas adjacentes tendo cada uma delas uma dimensão da secção transversal de cerca de 200 nanómetros podem ter uma distância centro a centro de cerca de 400 nanómetros. Deste modo, a razão entre as médias dos diâmetros e a distância centro a centro das estruturas neste caso será 1:2.

O espaçamento entre estruturas pode ser o mesmo, isto é, equidistantes, ou pode variar para estruturas num perfil. Por exemplo, as estruturas mais pequenas num perfil podem estar distanciadas de uma primeira distância, e a distância entre estas estruturas mais pequenas e uma estrutura maior no perfil ou entre duas estruturas das maiores no perfil, pode ser a mesma ou diferente desta primeira distância.

Por exemplo, no perfil da Fig. 4, as estruturas mais pequenas 104 apresentam uma distância centro a centro de cerca de 200 nanómetros. A distância entre os maiores pilares 102 e os pilares circundantes 104 é menor, cerca de 100 nanómetros. A distância entre o pilar maior 100 e cada

um dos pilares circundantes 104 é também menor do que a distância centro a centro entre os menores pilares 104, cerca de 100 nanómetros. Evidentemente, isto não é obrigatório, e todas as estruturas podem ser equidistantes ou pode existir uma variação qualquer entre as distâncias. Numa concretização, as estruturas diferentes podem estar em contacto umas com as outras, por exemplo em cima umas das outras, tal como se descreve melhor adiante, ou adjacentes e em contacto umas com as outras.

As estruturas de uma topografia podem ser todas formadas com a mesma altura, em geral de entre cerca de 10 nanómetros e cerca de 1 micrómetro, mas isto não é obrigatório, e as estruturas individuais num perfil podem variar de tamanho em uma, duas ou três dimensões. Numa concretização, algumas ou todas as estruturas de uma topografia podem apresentar uma altura inferior a cerca de 20 micrómetros, inferior a cerca de 10 micrómetros, ou inferior a cerca de 1 micrómetro, por exemplo inferior a cerca de 750 nanómetros, inferior a cerca de 680 nanómetros, ou inferior a cerca de 500 nanómetros. Por exemplo as estruturas podem ter uma altura de entre cerca de 50 nanómetros e cerca de 20 micrómetros ou de entre cerca de 100 nanómetros e cerca de 700 nanómetros. Por exemplo, as nanoestruturas ou microestruturas podem ter uma altura de entre cerca de 20 nm e cerca de 500 nm, entre cerca de 30 nm e cerca de 300 nm, ou de entre cerca de 100 nm e cerca de 200 nm, embora se pudesse entender que as

estruturas podem ser nanodimensionais numa dimensão de secção transversa e podem ter uma altura que possa ser medida numa microescala, por exemplo maior do que cerca de 500 nm. As estruturas microdimensionais podem apresentar uma altura que seja a mesma ou diferente da de estruturas nanodimensionais com o mesmo perfil. Por exemplo, as estruturas microdimensionais podem apresentar uma altura de entre cerca de 500 nanómetros e cerca de 20 micrómetros, ou de entre cerca de 1 micrómetro e cerca de 10 micrómetros, noutra concretização. As estruturas microdimensionais também podem ter uma dimensão de secção transversa numa microescala maior do que cerca de 500 nm, e podem apresentar uma altura que seja numa nanoescala, inferior a cerca de 500 nm.

A razão de aspecto das estruturas (a razão entre a altura de uma estrutura e a dimensão da secção transversa dessa estrutura) pode ser de entre cerca de 0,15 e cerca de 30, entre cerca de 0,2 e cerca de 5, entre cerca de 0,5 e cerca de 3,5, ou entre cerca de 1 e cerca de 2,5. Por exemplo, as nanoestruturas podem ter uma razão de aspecto adentro de qualquer uma destas gamas.

A superfície do dispositivo pode incluir um único caso de um perfil, como se ilustra na Fig. 4, ou pode incluir diversas iterações do mesmo perfil ou de perfis diferentes. Por exemplo, a Fig. 5 ilustra uma superfície

com um perfil incluindo o perfil da Fig. 4 em múltiplas iterações sobre uma superfície.

A formação de uma nanotopografia numa superfície de uma microagulha pode aumentar a área superficial da microagulha sem um aumento correspondente do volume. Crê-se que um aumento da área superficial em relação ao volume melhora a interacção da superfície da microagulha com os materiais biológicos circundantes. Por exemplo, um aumento da razão da área superficial em relação ao volume encorajará, crê-se, a interacção mecânica entre a nanotopografia e as proteínas circundantes, por exemplo, proteínas extracelulares da matriz (ECM) e/ou proteínas da membrana do plasma. Tal como se utiliza neste documento, o termo "proteína" refere-se em geral a uma cadeia molecular de aminoácidos que é capaz de interactuar estruturalmente, enzimaticamente ou de outro modo com outras proteínas, polipéptidos ou quaisquer outras moléculas orgânicas ou inorgânicas.

Em geral, a razão entre a área superficial e o volume de uma superfície com um nanoperfil pode ser maior do que cerca de  $10.000 \text{ cm}^{-1}$ , maior do que cerca de  $150.000 \text{ cm}^{-1}$ , ou maior do que cerca de  $750.000 \text{ cm}^{-1}$ . A determinação da razão entre a área superficial e o volume pode ser levada a cabo envolvendo qualquer metodologia padrão, tal como conhecida na técnica. Por exemplo, pode obter-se a área da superfície específica para uma superfície pelo

método da adsorção física de gás (método de B.E.T.) utilizando azoto como gás para a absorção, conhecida em geral na técnica e descrita por Brunauer, Emmet, e Teller (J. Amer. Chem. Soc., **60**, Fevereiro de 1938, págs. 309-319). A área superficial BET pode ser inferior a cerca de 5 m<sup>2</sup>/g, numa concretização, por exemplo de entre cerca de 0,1 m<sup>2</sup>/g e cerca de 4,5 m<sup>2</sup>/g, ou de entre cerca de 0,5 m<sup>2</sup>/g e cerca de 3,5 m<sup>2</sup>/g. Também se podem estimar os valores para a área superficial e o volume a partir da geometria de moldes utilizados para formar uma superfície, segundo os cálculos habituais em geometria. Por exemplo, pode estimar-se o volume a partir do volume calculado para cada elemento de um perfil e do número total de elementos de um perfil numa área determinada, por exemplo, ao longo da superfície de uma única microagulha.

Para um dispositivo que defina uma nanotopografia fractal ou semelhante a fractal perfilada numa superfície, a nanotopografia pode ser caracterizada através da determinação da dimensão fractal do perfil. A dimensão fractal é uma quantidade estatística que proporciona uma indicação de quão completamente um fractal parece encher o espaço à medida que as iterações recursivas continuam para escalas cada vez mais pequenas. A dimensão fractal de uma estrutura bidimensional pode ser representada como:

$$D = \frac{\log N(e)}{\log(e)}$$

em que  $N(e)$  é o número de estruturas auto-semelhantes que é necessária para cobrir o objecto completo quando o objecto é diminuído de  $1/e$  em cada direcção espacial.

Por exemplo, quando se considerar o fractal bidimensional conhecido como triângulo de Sierpensi ilustrado na Fig. 6, no qual os pontos médios dos três lados de um triângulo equilátero são ligados e o triângulo interno resultante é removido, a dimensão fractal é calculada como se segue:

$$D = \frac{\log N(e)}{\log(e)}$$

$$D = \frac{\log 3}{\log 2}$$

$$D \cong 1,585$$

Deste modo, o fractal triângulo de Sierpensi exhibe um aumento do comprimento da linha em relação ao triângulo equilátero bidimensional. Adicionalmente, este aumento do comprimento da linha não é acompanhado por um correspondente aumento da área.

A dimensão fractal do perfil ilustrado na Fig. 4 é de cerca de 1,84. Numa concretização, a nanotopografia da

superfície do dispositivo pode exibir uma dimensão fractal maior do que cerca de 1, por exemplo entre cerca de 1,2 e cerca de 5, entre cerca de 1,5 e cerca de 3, ou entre cerca de 1,5 e cerca de 2.5.

As Figs. 7A e 7B ilustram imagens com ampliações crescentes de outro exemplo de uma nanotopografia complexa. A nanotopografia das Figs. 7A e 7B inclui uma matriz de pilares de tipo fibroso 70 localizados sobre um substrato. No terminal distante de cada pilar individual, o pilar divide-se em múltiplas fibras mais pequenas 60. No terminal distante de cada uma destas fibras mais pequenas 60, cada fibra divide-se mais uma vez em múltiplos filamentos (não visíveis nas Figs. 7A e 7B). As estruturas formadas numa superfície que têm uma razão de aspecto maior do que cerca de 1 podem ser flexíveis, tal como o são as estruturas ilustradas nas Figs. 7A e 7B, ou podem ser rígidas.

As Figs. 7C e 7D ilustram outro exemplo de uma nanotopografia complexa. Nesta concretização, uma pluralidade de pilares 72 incluindo cada um deles um oco anular através deles 71, são formados num substrato. No terminal distante de cada pilar oco, é formada uma pluralidade de pilares mais pequenos 62. Como se pode ver, os pilares das Figs. 7C e 7D mantêm a sua rigidez e orientação vertical. Adicionalmente, e em contraste com os perfis anteriores, os pilares mais pequenos 62 desta concretização diferem na sua forma dos pilares maiores 72.

Especificamente, os pilares mais pequenos não são ocos, mas são sólidos. Deste modo, uma nanotopografia incluindo estruturas formadas a escalas diferentes não obrigam a que todas as estruturas sejam formadas com a mesma forma, e as estruturas podem variar tanto em tamanho como em forma das estruturas a uma escala diferente.

A Figura 8 ilustra outro perfil incluindo estruturas nanodimensionais tal como podem ser formadas na superfície de uma microagulha. Como se pode ver, nesta concretização, podem formar-se estruturas de perfis individuais com o mesmo tamanho em geral, mas com orientações e formas diferentes umas das outras.

Além de ou em alternativa ao exame das razões da área superficial em relação ao volume e/ou da dimensão fractal, as microagulhas dos dispositivos de entrega dos fármacos para a RA podem ser caracterizadas por outros métodos incluindo, sem limitação, a rugosidade da superfície, o módulo elástico, a energia da superfície, e assim por diante.

São conhecidos em geral na técnica métodos para determinar a rugosidade da superfície. Por exemplo, pode utilizar-se um processo de um microscópio de força atómica em modo de contacto ou de não contacto segundo a prática habitual, para determinar a rugosidade da superfície de um material. A rugosidade da superfície que pode ser utilizada

para caracterizar uma microagulha pode incluir a rugosidade média ( $R_A$ ), a rugosidade média de mínimo de quadrados, a torção, e/ou a curtose. Em geral, a rugosidade média da superfície (isto é, a média aritmética da altura na superfície é um parâmetro de rugosidade como definido na série ISO 25178) de uma superfície definindo sobre ela uma nanotopografia que pode ser inferior a cerca de 200 nanómetros, inferior a cerca de 190 nanómetros, inferior a cerca de 100 nanómetros, ou inferior a cerca de 50 nanómetros. Por exemplo, a rugosidade média de uma superfície pode ser de entre cerca de 10 nanómetros e cerca de 200 nanómetros, ou de entre cerca de 50 nanómetros e cerca de 190 nanómetros.

Pode caracterizar-se a superfície da microagulha pelo módulo elástico da superfície, por exemplo pela alteração de módulo elástico aquando da adição de uma nanotopografia à superfície. Em geral, a adição de uma pluralidade de estruturas formando uma nanotopografia na superfície da microagulha pode diminuir o módulo elástico de um material, uma vez que a adição de estruturas nanodimensionais à superfície levará a uma diminuição da continuidade da superfície e a uma alteração relacionada da área da superfície. Comparando com uma microagulha semelhante formada consoante o mesmo processo e a partir dos mesmos materiais, excepto no tocante ao perfil da nanotopografia na superfície, a microagulha incluindo uma nanotopografia nela pode exibir uma diminuição do módulo

elástico de entre cerca de 35% e cerca de 99%, por exemplo entre cerca de 50% e cerca de 99%, ou de entre cerca de 75% e cerca de 80%. A título de exemplo, o módulo de compressão efectivo de uma superfície nanoperfilada pode ser menor do que cerca de 50 MPa, ou menos do que cerca de 20 MPa. Numa concretização o módulo de compressão efectivo pode ser de entre cerca de 0,2 MPa e cerca de 50 MPa, entre cerca de 5 MPa e cerca de 35 MPa, ou de entre cerca de 10 MPa e cerca de 20 MPa. O módulo de tensão de corte efectivo pode ser menor do que cerca de 320 MPa, ou inferior a cerca de 220 MPa. Por exemplo, o módulo de tensão de corte efectivo pode ser de entre cerca de 4 MPa e cerca de 320 MPa, ou de entre cerca de 50 MPa e cerca de 250 MPa, numa concretização.

Uma microagulha incluindo uma nanotopografia sobre ela também pode exibir um aumento da energia da superfície em comparação com a de uma microagulha semelhante que não possua o perfil de nanotopografia sobre ela. Por exemplo, a microagulha incluindo a nanotopografia formada sobre ela pode exibir um aumento da energia da superfície em comparação com uma microagulha semelhante dos mesmos materiais e formada pelos mesmo métodos, mas não incluindo a formação de um perfil de nanotopografia na sua superfície. Por exemplo, o ângulo de contacto com água de uma superfície incluindo uma nanotopografia sobre ela pode ser maior do que cerca de 80°, maior do que cerca de 90°, maior do que cerca de 100°, ou maior do que cerca de 110°. Por exemplo, o ângulo de contacto com a água de uma

superfície pode ser de entre cerca de 80° e cerca de 150°, de entre cerca de 90° e cerca de 130°, ou de entre cerca de 100° e cerca de 120°, numa concretização.

Quando se formam nanoestruturas na superfície do dispositivo, a densidade de empacotamento das estruturas pode ser maximizada. Por exemplo, o empacotamento quadrado (Fig. 9A), o empacotamento hexagonal (Fig. 9B), ou uma sua variante qualquer pode ser utilizado para perfilar os elementos na microagulha. Quando se concebe um perfil no qual elementos de diversos tamanhos com áreas de secção transversal A, B, e C sejam adjacentes uns aos outros na microagulha, pode utilizar-se ao empacotamento circular como indicado na Fig. 9C. Evidentemente, as variações da densidade de empacotamento e a determinação das alterações a elas associadas das características da superfície, estão bem compreendidas nas capacidades de um entendido na técnica.

As microagulhas incluindo uma nanotopografia fabricada na superfície das microagulhas podem ser formadas seguindo um processo com um só passo, isto é, as microagulhas são formadas com as nanoestruturas na sua superfície na altura da sua formação. Em alternativa, pode utilizar-se um processo em diversos passos, no qual se fabrica um perfil de nanoestruturas numa microagulha previamente formada. Por exemplo, pode formar-se em primeiro lugar uma matriz de microagulhas e depois

fabricar-se um perfil aleatório ou não aleatório de nanoestruturas na superfície das microagulhas formadas. Tanto no processo em um só passo como no processo em dois passos, podem fabricar-se as estruturas nanodimensionais na superfície da microagulha ou numa superfície de um molde consoante qualquer método adequado de fabrico de nanotopografias incluindo, sem limitação, nanoimpressão, moldagem por injeção, litografia, moldagem por adição, e assim por diante.

Pode formar-se uma matriz de microagulhas por qualquer técnica de microfabricação padrão incluindo, sem limitação, litografia; técnicas de contrastação, tais como química molhada, a seco, e por remoção de foto resistências; oxidação térmica de silício; galvanoplastia e revestimento electrolítico; por processos de difusão, tais como difusão de boro, fósforo, arsénio, e antimónio; por implantação de iões; deposição de películas, tal como por evaporação (filamento, feixe de electrões, rápida, e por ensombramento e cobertura de passos), pulverização catódica, deposição química de vapor (CVD), epitaxia (em fase de vapor, em fase líquida, e feixe molecular), galvanoplastia, impressão de tela, e laminação; estereolitografia; fabrico a laser; e ablação com laser (incluindo ablação por projecção).

Pode utilizar-se um processo electroquímico de contrastação no qual se utiliza uma contrastação

electroquímica de silício sólido a silício poroso para criar redes de silício extremamente finas (da ordem de 0,01  $\mu\text{m}$ ) que se podem utilizar como estruturas de perfuração. Este método pode utilizar anodização electrolítica de silício em solução aquosa de ácido fluorídrico, potencialmente em combinação com luz, para cavar canais no silício. Variando a concentração do dopante na bolacha de silício que se vai contrastar, o potencial electrolítico durante a contrastação, a intensidade de luz incidente, e a concentração de electrólito, pode conseguir-se um controlo sobre a estrutura fina dos poros. O material não contrastado (isto é o silício remanescente) forma as microagulhas.

Também se pode utilizar contrastação com plasma, na qual uma contrastação profunda do silício com plasma é levada a cabo para criar microagulhas com diâmetros da ordem de 0,1  $\mu\text{m}$  ou mais. Podem fabricar-se indirectamente as agulhas controlando a voltagem (tal como na contrastação electroquímica).

As técnicas litográficas, incluindo a fotolitografia, a litografia por feixe electrónico, a litografia por raios X, e assim por diante podem ser utilizadas para a definição do perfil principal de uma punção. Pode então levar-se a cabo uma replicação para formar um dispositivo incluindo uma matriz de microagulhas. Incluem-se nos métodos normais de replicação, sem

limitação, a micromoldagem assistida por solvente e a moldagem, a moldagem por estampagem, a moldagem por injeção, e assim por diante. Também se podem utilizar tecnologias de automontagem incluindo copolímero em blocos separado por fases, segregação de polímeros e litografia coloidal, para a formação de uma nanotopografia numa superfície.

Podem utilizar-se combinações de métodos como se sabe. Por exemplo, os substratos perfilados com colóides podem ser expostos a contrastação com ião reactivo (RIE, também denominada contrastação a seco) de modo a refinar as características de uma nanoestrutura fabricada tal como o diâmetro de um nanopilar, a forma, a altura, a inclinação, e assim por diante. A contrastação em húmido também pode ser utilizada para produzir formas alternativas para nanoestruturas fabricadas inicialmente formadas por um processo diferente, por exemplo, técnicas de segregação de polímeros.

O diâmetro da estrutura, a forma, e a inclinação podem ser controlados por selecção de materiais e métodos apropriados. Por exemplo, a contrastação de metais inicialmente evaporados sobre substratos com perfis coloidais seguindo-se um levantamento coloidal resulta em geral em pilares em forma de prisma. Pode então utilizar-se um processo de contrastação para completar as estruturas consoante se pretenda. Também se podem fabricar

nanoestruturas poliméricas ordenadas não esféricas por técnicas de sinterização controladas pela temperatura, que formam uma variedade de aspectos nanométricos trigonais ordenados nos interstícios coloidais depois da dissolução selectiva de nanopartículas poliméricas. Estes e outros processos de formação adequados são conhecidos em geral na técnica (veja-se, por exemplo, Wood, J. R. Soc. Interface, 2007 22 de Fevereiro; **4**(12): 1-17.

Outros métodos que podem ser utilizados para formar uma microagulha incluindo uma nanotopografia fabricada numa superfície incluem métodos de litografia de nanoimpressão utilizando técnicas de fabrico por laser com precisão ultra elevada, exemplos das quais foram descritos por Hunt, *et al.*, (Patente U.S. No. 6.995.336) e Guo, *et al.* (Patente U.S. No. 7.374.864). A litografia de nanoimpressão é uma técnica de litografia em nanoescala na qual se utiliza um molde híbrido que actua tanto como um molde para litografia de nanoimpressão como uma máscara de fotolitografia. Ilustra-se um esquema da técnica da litografia de nanoimpressão nas Figs. 10A-10C. Durante o fabrico, um molde híbrido 30 imprime num substrato 32 através de pressão aplicada para formar aspectos (por exemplo, microagulhas definindo uma nanotopografia) numa camada de resistência (Fig. 10A). Em geral, a superfície do substrato 32 pode ser aquecida antes do trabalho com o molde 30, a uma temperatura acima da sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Enquanto o molde híbrido 30 está

ligado ao substrato 32, pode forçar-se um caudal de polímero viscoso para as cavidades do molde para formar os aspectos 34 (Fig. 10B). O molde e o substrato podem então ser expostos a luz ultravioleta. O molde híbrido é em geral transmissor de radiação UV excepto em determinadas áreas obstruídas. Deste modo, a radiação UV passa por secções transmissoras e até à camada resistente. Mantém-se a pressão durante o arrefecimento do molde e do substrato. O molde híbrido 30 é então removido do substrato 32 arrefecido, a uma temperatura inferior à  $T_g$  do substrato e polímero (Fig. 10C).

Para facilitar a libertação do substrato 32 nanoimpresso incluindo os aspectos fabricados 34, do molde 30, como representado na Fig. 10C, é vantajoso tratar-se o molde 30 com um revestimento de baixa energia para diminuir a adesão ao substrato 32, uma vez que uma menor energia da superfície do molde 30 e a maior diferença resultante entre as energias de superfície do molde 30, do substrato 32, e do polímero, pode tornar mais fácil a libertação destes materiais. A título de exemplo, pode utilizar-se um revestimento do molde em silício tal como trideca-(1,1,2,2-tetrahidro)-octitriclorosilano ( $F_{13}$ -TCS).

Um processo de nanoimpressão é dinâmico e inclui encher-se um molde seguindo-se a separação de um polímero formado, do molde. Para encher os aspectos do molde, tem que se aumentar a temperatura do polímero a um valor

suficientemente alto para que se inicie um caudal sob a pressão aplicada. Quanto mais alta a temperatura, menor a viscosidade do polímero, e tanto mais fácil e rápido é o enchimento do molde. Uma pressão maior também melhora a velocidade de enchimento e a quantidade enchida para melhores replicações de moldes. Para libertar o substrato nanoimpresso do molde, a temperatura do substrato pode ser baixada até um ponto no qual a resistência à libertação exceda as forças de adesão exercidas pelo molde. Variando a temperatura também é possível alterar os aspectos do polímero durante a desmoldagem para se obterem estruturas diferentes, por exemplo estruturas como as ilustradas na Fig. 8.

As nanoestruturas também podem ser formadas na microagulha seguindo processos químicos de adição. Por exemplo, deposição de películas, pulverização, deposição química de vapor (CVD), epitaxia (em fase de vapor, em fase líquida, e por feixe molecular litografia de nanoimpressão), galvanoplastia, e assim por diante, podem ser utilizados para construir estruturas numa superfície.

Podem utilizar-se os processos de monocamadas auto-montadas conhecidos na técnica para formar as estruturas na superfície da microagulha. Por exemplo, a capacidade dos copolímeros em blocos para se auto-organizarem pode ser utilizada para formar um perfil de monocamada na superfície. Pode então utilizar-se o perfil

como escantilhão para o crescimento das estruturas pretendidas, por exemplo, colóides, consoante o escantilhão do perfil da monocamada.

A título de exemplo, uma rede bidimensional de polímeros, com ligações cruzadas, pode ser produzida a partir de monómeros com dois ou mais locais reactivos. Estas monocamadas com ligações cruzadas têm sido feitas utilizando monocamadas auto-montadas (SAM) (por exemplo, um sistema ouro/alquiltiol) ou técnicas de monocamada de Langmuir-Blodgett (LB) (Ahmed *et al.*, Thin Solid Films **187**: 141-153 (1990)) como são conhecidas na técnica. A monocamada pode ter ligações cruzadas, que podem levar à formação de uma monocamada mais estruturalmente robusto.

Os monómeros utilizados para formar a monocamada perfilada podem incorporar todas as espécies estruturais necessárias para afectar a técnica de polimerização necessária e/ou a técnica de formação de monocamada, bem como para influenciar propriedades tais como a solubilidade global, os métodos de dissociação, e métodos litográficos. Um monómero pode conter pelo menos um, e mais amiúde pelo menos dois, grupos funcionais reactivos.

Uma molécula utilizada para formar uma monocamada orgânica pode incluir qualquer um de diversos grupos funcionais orgânicos ao longo de cadeias de grupos metileno. Por exemplo uma molécula pode ser uma estrutura

carbonada com cadeia longa contendo cadeias metilénicas para facilitar o empacotamento. O empacotamento entre grupos metileno pode permitir a ocorrência de forças de ligação fracas de Van der Waals, aumentando a estabilidade da monocamada produzida e contrariando as dificuldades entrópicas associadas com a formação de uma fase ordenada. Além disto, diferentes espécies terminais, tais como espécies com ligações por ponte de hidrogénio, podem estar presentes num dos terminais da molécula, para permitir o crescimento de estruturas na monocamada formada, caso em que as espécies químicas polimerizáveis podem estar colocadas a meio da cadeia ou no terminal oposto. Pode utilizar-se qualquer química de reconhecimento molecular adequada para a formação da ligação. Por exemplo, podem montar-se estruturas sobre uma monocamada baseada em interacções electrostáticas, interacção de Van der Waals, quelação metálica, ligação por coordenação (isto é, interacções ácido/base de Lewis), ligação iónica, ligação covalente, ou ligação por ponte de hidrogénio.

Quando se utilizar um sistema baseado em SAM, pode utilizar-se uma molécula adicional para formar o escantilhão. Esta molécula adicional pode ter a funcionalidade apropriada num dos seus terminais para formar um SAM. Por exemplo, sobre uma superfície de ouro, pode incluir-se um terminal tiol. Existe uma grande variedade de moléculas orgânicas que se podem empregar para levar a cabo a replicação. As espécies topoquimicamente

polimerizáveis, tais como dienos e diacetilenos, são especialmente desejáveis como componentes polimerizáveis. Estas podem estar distribuídas a comprimentos variáveis de agentes de ligação metilénicos.

Para uma monocamada LB, só é precisa uma molécula porque a espécie para reconhecimento molecular também pode servir como grupo funcional polar para os objectivos de formação da LB. Pode levar-se a cabo uma litografia numa monocamada LB transferida para um substrato, ou directamente no vazio. Por exemplo, uma monocamada LB de monómeros diacetilénicos pode ser perfilada por exposição a UV através de uma máscara ou por perfilagem com um feixe de electrões.

A formação de uma monocamada pode ser facilitada utilizando moléculas que sofrem uma polimerização topoquímica na fase de monocamada. Expondo a película em montagem a um catalisador de polimerização, pode construir-se a película *in situ*, e alterar-se de uma montagem molecular dinâmica para uma montagem polimerizada mais robusta.

Pode utilizar-se qualquer uma das metodologias conhecidas na técnica para perfilar uma monocamada. Incluem-se nas técnicas úteis para perfilar a monocamada, mas não se limitam a, fotolitografia, técnicas com feixe electrónico, técnicas com feixe iónico focado, e litografia

suave. Podem utilizar-se diversos esquemas de protecção tais como fotorresistência para um sistema baseado em SAM. De igual modo, perfis de copolímeros em blocos podem ser formados sobre ouro e selectivamente contrastados para formar perfis. Para um sistema de duas componentes, também se pode conseguir uma perfilagem com técnicas facilmente disponíveis.

Podem utilizar-se técnicas de litografia suave para perfilar a monocamada, nas quais se podem utilizar uma máscara e luz ultravioleta para perfilar. Por exemplo, pode utilizar-se uma monocamada de base sem perfil como plataforma para a montagem de uma monocamada monomérica reactiva para UV/feixes de partículas. A monocamada monomérica pode então ser perfilada por fotolitografia com UV, por litografia com feixe electrónico ou por litografia com feixe iónico, ainda que a base SAM seja não perfilada.

O crescimento de estruturas numa monocamada perfilada pode ser conseguido por diversos mecanismos de crescimento, tais como através de química redutora apropriada de um sal metálico e por utilização de nucleação mediada por sementes ou escantilhões. Utilizando os elementos de reconhecimento sobre a monocamada, pode catalisar-se o crescimento inorgânico nesta interface por diversos métodos. Por exemplo podem formar-se compostos inorgânicos sob a forma de colóides com a forma da monocamada orgânica perfilada. Por exemplo podem formar-se

escantilhões com estruturas em carbonato de cálcio ou em sílica contendo diversas funcionalidades carbonilo tais como ácido carboxílico e amida. Controlando as condições de crescimento cristalino, é possível controlar a espessura e a morfologia cristalina no crescimento mineral. Também se pode utilizar como escantilhão dióxido de titânio.

Podem utilizar-se técnicas de plastia não eléctricas com escantilhões para sintetizar metais utilizando grupos funcionais orgânicos existentes. Em especial, quelando átomos de metal às espécies carbonílicas do perfil orgânico, pode catalisar-se a deposição não eléctrica de metal no perfil, formando colóides metálicos perfilados. Por exemplo, Cu, Au, Ni, Ag, Pd, Pt e muitos outros metais plaqueáveis em condições de plastia não eléctrica podem ser utilizados para formar estruturas metálicas com a forma da monocamada orgânica. Controlando as condições da plastia não eléctrica, é possível controlar a espessura das estruturas metálicas obtidas.

Outros métodos de crescimento do tipo 'de baixo para cima' são tal como conhecidos na técnica e podem ser utilizados, por exemplo um método tal como o descrito na Patente U.S. No. 7.189.435 a favor de Tuominen, *et al.*. De acordo com este método, um substrato condutor ou semiconductor (por exemplo, um metal, tal como ouro) pode ser revestido com uma película de copolímero em blocos (por exemplo, um copolímero em blocos de poli(metacrilato de

metilo) e estireno), no qual uma componente do copolímero forma cilindros nanoscópicos numa matriz da outra componente do copolímero. Pode então colocar-se uma camada condutora no topo do copolímero para formar uma estrutura compósita. Por orientação vertical da estrutura compósita, pode remover-se parte da primeira componente, por exemplo por exposição a radiação UV, a um feixe de electrões, ou a ozono, por degradação, u outro método semelhante, para formar poros nanoscópicos naquela região da segunda componente.

Noutra concretização, descrita na Patente U.S. No. 6.926.953 a favor de Nealey, *et al.*, podem formar-se estruturas de copolímero por exposição de um substrato que tenha nele uma camada imagiológica, por exemplo uma monocamada de alquilsiloxano ou de octadeciltriclorossilano montada, a dois ou mais feixes com comprimentos de onda seleccionados para formar perfis de interferência na camada imagiológica, para mudar a molhabilidade da camada imagiológica consoante os perfis de interferência. Uma camada de um copolímero em blocos seleccionado, por exemplo um copolímero de poliestireno e poli(metacrilato de metilo) pode ser então depositada sobre a camada imagiológica exposta e recozida para separar as componentes do copolímero consoante o perfil de molhabilidade e para replicar o perfil da camada imagiológica na camada de copolímero. Podem formar-se deste modo riscas ou regiões

isoladas das componentes separadas com dimensões periódicas na gama de 100 nanómetros ou menos.

A superfície da microagulha pode incluir uma distribuição aleatória das nanoestruturas fabricadas. Opcionalmente, a superfície da microagulha pode incluir materiais adicionais, em conjunto com as nanoestruturas fabricadas. Por exemplo, a microagulha pode ter fabricada sobre ela uma camada fibrosa electrofiada, e um perfil aleatório ou não aleatório de nanoestruturas pode ser fabricado nesta camada electrofiada.

A electrofiação inclui a utilização de um fornecedor de alta voltagem para aplicar um campo eléctrico a um polímero fundido ou dissolvido mantido no tubo capilar, induzindo uma carga nas moléculas individuais do polímero. Ao aplicar-se o campo eléctrico, será induzida uma carga e/ou uma orientação dipolar na interface ar-superfície. Esta indução gera uma força que se opõe à tensão superficial. À intensidade de campo crítica, as forças electrostáticas sobrepor-se-ão às forças da tensão superficial, e será ejectado um jacto de material polimérico do tubo capilar, em direcção a uma superfície condutor, com terra. O jacto é alongado e acelerado pelo campo eléctrico externo, quando sai do tubo capilar. Quando o jacto se move ao longo do ar, parte do solvente pode evaporar-se, deixando fibras carregadas de polímero que se podem colher na superfície. À medida que as fibras são

colhidas, as fibras individuais e ainda molhadas podem aderir umas às outras, formando uma rede não tecida na superfície. Pode então fabricar-se um perfil de nanoestruturas na superfície electrofiada, por exemplo através de uma técnica de uma máquina de gravação em relevo utilizando um molde definindo as nanoestruturas pretendidas. Aplicando o molde à superfície da microagulha a valores adequados de temperatura e de pressão pode transferir-se o perfil para a superfície da microagulha. A superfície com fibras nanodimensionais electrofiadas pode melhorar ainda mais as características desejáveis de uma superfície de microagulha, por exemplo, através de uma de entre a razão entre a área superficial e o volume, a rugosidade da superfície, a energia da superfície, e assim por diante, e pode proporcionar vantagens associadas.

Para além das nanoestruturas, a superfície da microagulha pode ser quimicamente funcionalizada para uma melhor interacção com tecidos ou com células individuais. Por exemplo, uma ou mais biomoléculas tais como polinucleótidos, polipéptidos, proteínas completas, polissacáridos, e outras semelhantes podem ser ligadas à superfície da microagulha antes da utilização.

Em algumas concretizações, a superfície da microagulha pode incluir uma reactividade adequada de modo que a funcionalidade adicional pretendida se possa ligar espontaneamente à superfície sem ser necessário nenhum

tratamento prévio da superfície. No entanto, noutras concretizações, pode levar-se a cabo um tratamento prévio da superfície estruturada antes da ligação do composto pretendido. Por exemplo, a reactividade de uma estrutura da superfície pode ser amentada através da adição ou da criação de grupos amina, ácido carboxílico, hidroxilo, aldeído, tiol, ou éster na superfície. Numa concretização representativa, a superfície da microagulha incluindo um perfil de nanoestruturas formadas sobre ela pode ser aminada por contacto com um composto contendo amina tal como 3-aminopropiltriétoxissilano para aumentar a funcionalidade de amina na superfície e para ligar uma ou mais biomoléculas à superfície através da funcionalidade amina adicionada.

Podem incluir-se nos materiais que se pode pretender sejam ligados à superfície de um dispositivo com perfil proteínas de ECM tais como lamininas, tropoelastina ou elastina, tropocolagénio ou colagénio, fibronectina, e outras semelhantes. Fragmentos curtos de polipéptido podem estar ligados à superfície de um dispositivo perfilado tal como uma sequência RGD, que é parte da sequência de reconhecimento da ligação de integrina a muitas proteínas ECM. Deste modo, a funcionalização de uma superfície de microagulha com RGD pode encorajar a interacção do dispositivo com proteínas ECM e limitar mais a resposta a corpos estranhos em relação ao dispositivo durante a utilização.

O fármaco para RA para entrega através do dispositivo pode estar associado a ele segundo qualquer metodologia aceitável. Por exemplo, um pacho com microagulhas transdérmicas pode ser utilizado para a entrega de materiais debaixo do estrato córneo ao estrato espinhoso ou ao estrato germinativo, ou mesmo mais profundamente adentro da derme. O fármaco para RA pode estar contido no pacho ou ser alimentado ao pacho de modo a ser transportado através do estrato córneo em associação com a microagulha, por exemplo, dentro da microagulha ou à superfície da microagulha.

A microagulha do pacho transdérmico inclui um reservatório, por exemplo, um vaso, uma matriz porosa, etc., que armazena o fármaco para RA e proporciona o fármaco para RA para entrega. O dispositivo pode incluir um reservatório adentro do próprio dispositivo. Por exemplo, o dispositivo pode incluir uma zona oca, ou diversos poros que podem transportar um ou mais agentes para RA para entrega. O agente para RA pode ser libertado do dispositivo por degradação de uma porção ou da totalidade do dispositivo ou por difusão do agente a partir do dispositivo.

As Figs. 11A e 11B são vistas em perspectiva de um dispositivo incluindo um reservatório. O dispositivo 110 inclui um reservatório 112 definido por uma camada se

suporte 114 e uma matriz de microagulhas 116. A camada de suporte e a matriz de microagulhas 116 ligam-se entre si em torno da periferia exterior do dispositivo, como indicado em 118. A camada de suporte impermeável 114 pode estar ligada por um adesivo, um selo térmico ou algo semelhante. O dispositivo 110 também inclui uma pluralidade de microagulhas 120. Pode remover-se uma camada de libertação 122 antes da utilização do dispositivo para expor as microagulhas 120.

Uma formulação incluindo um ou mais fármacos para RA pode ser mantida dentro do reservatório 112. Os materiais adequados para utilização como camadas de suporte impermeáveis 114 podem incluir materiais tais como poliésteres, polietileno, polipropileno e outros polímeros sintéticos. O material é em geral selável termicamente ou de outra forma à camada de suporte para proporcionar uma barreira ao fluxo transversal do conteúdo do reservatório.

O reservatório 112, definido como o espaço ou folga entre a camada impermeável de suporte 14 e a matriz de microagulhas 16, proporciona uma estrutura de armazenagem na qual se mantém uma suspensão dos agentes para RA que se vão administrar. O reservatório pode ser formado a partir de uma variedade de materiais que são compatíveis com um agente que aí será contido. A título de exemplo, o reservatório pode ser formado a partir de

polímeros naturais e sintéticos, metais, cerâmicos, materiais semicondutores, e compósitos destes.

Numa concretização, o reservatório pode estar ligado ao substrato no qual se localizam as microagulhas. Noutra concretização, o reservatório pode estar separado e ser ligável de um modo removível à matriz de microagulhas ou encontrar-se em comunicação com ela por um fluido, por exemplo via tubagens apropriadas, válvulas com luer, etc.

O dispositivo pode incluir um ou diversos reservatórios para armazenar os agentes a serem entregues. Por exemplo, o dispositivo pode incluir um único reservatório que armazene uma formulação contendo um único ou diversos agentes para RA, ou o dispositivo pode incluir múltiplos reservatórios, cada um dos quais armazene um ou mais agentes para entrega à totalidade ou a uma porção da matriz de microagulhas. Múltiplos reservatórios podem armazenar cada um deles um material diferente que pode ser combinado com outros para a entrega. Por exemplo, um primeiro reservatório pode conter um fármaco para RA, por exemplo, um NSAID, e um segundo reservatório pode conter um veículo, por exemplo, soro salino, ou um segundo fármaco para RA, por exemplo, um DMARD. Podem misturar-se os diferentes agentes antes da entrega. A mistura pode ser despoletada por um meio qualquer, incluindo, por exemplo, uma quebra mecânica (isto é perfuração, degradação ou quebra), uma alteração da porosidade, ou uma degradação

electroquímica das paredes ou membranas que separam as câmaras. Múltiplos reservatórios podem conter agentes activos diferentes para entrega que podem ser entregues em conjunto uns com os outros, ou sequencialmente.

Numa concretização, o reservatório pode estar em comunicação por um fluido com uma ou mais microagulhas do dispositivo transdérmico, e as microagulhas podem definir uma estrutura (por exemplo, um furo central ou lateral) para permitir o transporte dos agentes entregues para debaixo da camada de barreira.

O dispositivo pode incluir um ou uma pluralidade de reservatórios para armazenar agentes a serem entregues. Por exemplo, o dispositivo pode incluir um único reservatório que armazena um único agente ou uma formulação com múltiplos agentes, ou o dispositivo pode incluir múltiplos reservatórios, cada um dos quais armazena um ou mais agentes para entrega à totalidade ou a uma parte da matriz de microagulhas. Os diversos reservatórios podem armazenar materiais diferentes que se podem combinar para entrega. Por exemplo, um primeiro reservatório pode conter um agente, por exemplo, um fármaco, e um segundo reservatório pode conter um veículo, por exemplo, soro salino. Os diferentes agentes podem ser misturados antes da entrega. A mistura pode ser despoletada por um qualquer meio, incluindo, por exemplo, uma alteração mecânica (isto é, perfuração, degradação ou quebra), alteração da

porosidade, ou degradação electroquímica das paredes ou das membranas separando as câmaras. Múltiplos reservatórios podem conter diferentes agentes activos para entrega que podem ser entregues em conjunto uns com os outros ou sequencialmente.

Os reservatórios podem estar em comunicação uns com os outros por fluido com uma ou mais microagulhas do dispositivo transdérmico, e as microagulhas podem definir uma estrutura (por exemplo, um buraco central ou lateral) para permitir o transporte dos agentes entregues por debaixo da camada de barreira.

Em concretizações alternativas, um dispositivo pode incluir uma matriz de microagulhas e uma montagem de reservatórios com prevenção de fluxo entre ambas antes da utilização. Por exemplo, um dispositivo pode incluir um membro de libertação posicionado adjacientemente tanto a um reservatório como a uma matriz de microagulhas. O membro de libertação pode ser separado do dispositivo antes da utilização, de tal modo que durante a utilização o reservatório e a matriz de microagulhas estejam em comunicação fluida entre si. Pode conseguir-se a separação através da separação completa ou parcial do membro de libertação. Por exemplo, relativamente às Figs. 12-17, apresenta-se uma concretização de um membro de libertação configurado para ser separado de um pacho transdérmico para iniciar o caudal de um composto farmacológico. Mais

especificamente, as Figs. 12-13 mostram um pacho transdérmico 300 que contém uma montagem para libertação de um fármaco 370 e uma matriz de microagulhas 380. A montagem de libertação do fármaco 370 inclui um reservatório 306 posicionado adjacente a uma membrana de controlo de velocidade 308.

A membrana de controlo de velocidade pode ajudar a tornar mais lento o caudal do composto farmacológico quando ele é libertado. Em particular, os compostos farmacológicos fluídicos passando do reservatório de fármaco para a matriz de microagulhas através de canais microfluídicos podem sofrer uma queda de pressão que resulta numa diminuição do caudal. Caso esta diferença seja muito grande, pode criar-se alguma contrapressão que impede o caudal do composto ultrapassando potencialmente a pressão capilar do fluido através dos canais microfluídicos. Assim, a utilização da membrana de controlo de velocidade pode melhorar esta diferença de pressão e permitir que o composto farmacológico seja introduzido na microagulha a um caudal mais controlado. Os materiais específicos, a espessura, etc. da membrana de controlo de velocidade podem variar com base em múltiplos factores, tais como a viscosidade do composto farmacológico, a altura em que se pretenda a entrega, etc.

A membrana de controlo da velocidade pode ser fabricada a partir de materiais permeáveis, semipermeáveis

ou microporosos que são conhecidos na técnica para controlar a velocidade de compostos farmacológicos e que apresentam permeabilidade ao potenciador de permeação inferior à do reservatório de fármaco. Por exemplo, o material utilizado para formar a membrana de controlo de velocidade pode ter uma dimensão média de poro de entre cerca de 50 nanómetros e cerca de 5 micrómetros, em algumas concretizações de entre cerca de 100 nanómetros e cerca de 2 micrómetros, e em algumas concretizações, de entre cerca de 300 nanómetros e cerca de 1 micrómetro (por exemplo, cerca de 600 nanómetros). Incluem-se nos materiais adequados para a membrana, por exemplo, redes fibrosas (por exemplo, tecidas ou não tecidas), películas com aberturas, espumas, esponjas, etc., que são formadas a partir de polímeros tais como polietileno, polipropileno, poli(acetato de vinilo), copolímeros de n-butilacetato de etileno e vinilacetato de etileno. Estes materiais de membrana também são descritos em mais pormenor nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 3.797.494, 4.031.894, 4.201.211, 4.379.454, 4.436.741, 4.588.580, 4.615.699, 4.661.105, 4.681.584, 4.698.062, 4.725.272, 4.832.953, 4.908.027, 5.004.610, 5.310.559, 5.342.623, 5.344.656, 5.364.630, e 6.375.978. Um material para membrana especialmente adequado está disponível junto da Therapie-Systeme.

Em relação às Figs. 12-13, embora seja opcional, a montagem 370 também contém uma camada adesiva 304 posicionada adjacente ao reservatório 306. A montagem de

microagulhas 380 inclui igualmente um suporte 312 do qual nasce uma pluralidade de microagulhas 330 com canais 331, tal como descrito acima. As camadas da montagem de libertação de fármaco 370 e/ou da montagem de microagulhas 380 podem ser ligadas entre si caso tal se pretenda, utilizando qualquer técnica de ligação conhecida, tal como através de ligação adesiva, ligação térmica, ligação ultrassónica, etc.

Independentemente da configuração específica que se utilizar, o pacho 300 também contém um membro de libertação 310 que está posicionado entre a montagem de libertação do fármaco 370 e a montagem de microagulhas 380. Embora o membro de libertação 310 possa opcionalmente estar ligado ao suporte adjacente 312 e/ou à membrana de controlo de velocidade 308, pretende-se tipicamente que esteja apenas fracamente ligado, ou de todo, de modo a que o membro de libertação 310 possa ser facilmente retirado do pacho 300. Caso tal se pretenda, o membro de libertação 310 também pode conter uma porção *tab* 371 (Figs. 12-13) que se prolonga pelo menos parcialmente para além do perímetro do pacho 300 para facilitar a capacidade de um utilizador para pegar no membro e puxá-lo na direcção pretendida. Na sua configuração "inactiva" como se ilustra nas Figs. 12-13, a montagem de libertação do fármaco 370 do pacho 300 mantém seguramente um composto farmacológico 307 de modo a que não flua significativamente para as microagulhas 330. O pacho

pode ser "activado" aplicando simplesmente uma força sobre o membro de libertação para o separar do pacho.

Em relação às Figs. 14-15, uma concretização para activar o pacho 300 é apresentada, na qual o membro de libertação 310 é puxado numa direcção longitudinal. Pode remover-se o membro de libertação completo 310 como se ilustra nas Figs. 16-17, ou pode só soltar-se parcialmente como se ilustra nas Figs. 14-15. Em qualquer dos casos, no entanto, o selo anteriormente formando entre o membro de libertação 310 e a abertura (não apresentado) do suporte 312, é quebrado. Deste modo, um composto farmacológico 107 pode começar a fluir da montagem de entrega de fármaco 170 e para os canais 131 das microagulhas 130 através do suporte 112. Uma ilustração exemplificativa de como o composto farmacológico 307 flui do reservatório 306 e para os canais 331 é apresentada nas Figs. 16-17. Nomeadamente, o caudal do composto farmacológico 307 é passivamente iniciado e não necessita de nenhuns mecanismos de movimentação activos (por exemplo, bombas).

Nas concretizações ilustradas nas Figs. 12-17, a saída do membro de libertação inicia imediatamente o caudal do composto farmacológico para as microagulhas porque a montagem de libertação do fármaco já se encontra disposta em comunicação por fluido com a montagem de microagulhas. Em algumas concretizações, no entanto, pode pretender-se proporcionar ao utilizador um grau de controlo maior sobre

a altura e duração da libertação do fármaco. Isto pode ser conseguido utilizando uma configuração de pacho na qual a montagem de microagulhas não se encontre inicialmente em comunicação por fluido com a montagem de libertação do fármaco. Quando se pretende utilizar o pacho, o utilizador pode manipular fisicamente as duas montagens distintas proporcionando a sua comunicação por fluido. O membro de libertação pode ser separado quer antes, quer depois de ocorrer essa manipulação física.

Em relação às Figs. 18-23, por exemplo, uma concretização específica de um pacho 200 é apresentada. As Figs. 18-19 ilustram o pacho 200 antes da utilização, e mostram uma primeira secção 250 formada por uma montagem de microagulhas 280 e uma segunda secção 260 formada por uma montagem de libertação de fármaco 270. A montagem de libertação de fármaco 270 inclui um reservatório 206 posicionado adjacente a uma membrana de controlo de velocidade 208 como descrita acima. Embora opcional, a montagem 270 também contém uma camada adesiva 204 que está posicionada adjacente ao reservatório 206. A montagem de microagulhas 280 inclui de igual modo um suporte 212 do qual se estende uma pluralidade de microagulhas 230 com canais 231, tal como descrito acima.

Nesta concretização, o suporte 212 e a membrana de controlo da velocidade 208 estão inicialmente dispostos horizontalmente adjacentes um ao outro, e um membro de

libertação 210 localiza-se sobre o suporte 212 e o membro de controlo da velocidade 208. Nesta concretização específica, pretende-se em geral que o membro de libertação 210 se ligue de um modo capaz de ser selado de novo ao suporte 212 e à membrana de controlo da velocidade 208 por um adesivo (por exemplo, um adesivo sensível à pressão). Na sua configuração "inactiva" apresentada nas Figs. 18-19, a montagem de libertação do fármaco 270 do pacho 200 mantém seguramente um fármaco 207 de modo a que não flua significativamente para as microagulhas 230. Quando se pretender "activar" o pacho, o membro de libertação 210 pode ser pelado e removido, como se ilustra nas Figs. 20-21, para quebrar o selo previamente formado entre o membro de libertação 210 e a abertura (não apresentado) do suporte 212. Em seguida, pode dobrar-se a segunda secção 260 em torno de uma linha de dobragem "F" como se ilustra através da seta direcciona na Fig. 22, de modo que o membro de controlo da velocidade 208 se disponha verticalmente adjacente ao suporte 212 e em comunicação por fluido com ele. Em alternativa, pode dobrar-se a primeira secção 250. Independentemente, a dobragem das secções 250 e/ou 260 inicia o caudal de um fármaco 207 da montagem de libertação do fármaco 270 e para os canais 231 das microagulhas 230 via o suporte 212 (Veja-se a Fig. 23).

O dispositivo pode fornecer um agente a uma velocidade que seja útil em terapêutica. De acordo com este objectivo, o dispositivo transdérmico pode incluir uma

caixa com microelectrónica e outras estruturas micro-maquinadas para controlar a velocidade da entrega quer consoante um horário previamente programado, quer através de uma interface activa com o doente, um profissional de saúde, ou um biossensor. O dispositivo pode incluir um material com uma velocidade de degradação previamente fixada, de modo a controlar a libertação de um agente para RA contido no dispositivo. A velocidade de entrega pode ser controlada manipulando diversos factores, incluindo as características da formulação que se vai entregar (por exemplo, viscosidade, carga eléctrica, e/ou composição química); As dimensões do dispositivo (por exemplo, o diâmetro externo e o volume de quaisquer aberturas); o número de microagulhas num pacho transdérmico; o número de dispositivos individuais numa matriz transportadora; a aplicação de uma força motriz (por exemplo, um gradiente de concentração, um gradiente de voltagem, um gradiente de pressão); a utilização de uma válvula; e assim por diante.

O transporte de agentes através do dispositivo pode ser controlado ou monitorizado utilizando, por exemplo, diversas combinações de válvulas, bombas, sensores, actuadores e microprocessadores. Estas componentes podem ser produzidas utilizando técnicas padrão de fabrico ou de microfabrico. Incluem-se nos actuadores que podem ser úteis com um dispositivo as microbombas, as microválvulas, e os posicionadores. Por exemplo, um microprocessador pode ser programado para controlar uma

bomba ou válvula, deste modo controlando a velocidade da entrega.

O caudal de um agente através do dispositivo pode ocorrer com base na difusão ou na acção capilar, ou pode ser induzido utilizando bombas mecânicas convencionais ou forças não mecânicas tais como electro-osmose ou electroforese, ou convecção. Por exemplo, na electro-osmose, posicionam-se os eléctrodos numa superfície biológica (por exemplo, na superfície da pele), numa microagulha, e/ou num substrato adjacente a uma microagulha, para criar um caudal por convecção que transporta espécies iónicas com cargas opostas e/ou moléculas neutras em direcção ao local de entrega.

Pode manipular-se o caudal de um agente por selecção do material que forma a superfície da microagulha. Por exemplo, pode utilizar-se uma ou mais ranhuras argas adjacentes à superfície da microagulha do dispositivo para dirigir a passagem do fármaco para RA. Em alternativa, os materiais formando a superfície nanoestruturada podem ser manipulados quer para promover, quer para inibir o transporte do material ao longo da superfície, tal como por controlo da hidrofiliicidade ou da hidrofobicidade.

Pode regular-se o caudal de um agente utilizando válvulas ou portadas, como se sabe na técnica. As válvulas podem ser repetidamente abertas e fechadas, ou podem

tratar-se de válvulas de utilização única. Por exemplo, uma barreira quebrável ou uma portada de um só sentido podem ser instaladas no dispositivo entre um reservatório e a superfície perfilada. Quando estiver pronta a ser utilizada, a barreira pode ser quebrada ou a portada aberta para permitir o caudal até à superfície da microagulha. Outras válvulas ou portadas utilizadas no dispositivo podem ser termicamente activadas, electroquimicamente activadas, mecanicamente activadas ou magneticamente activadas para, de um modo selectivo, iniciar, modular, ou parar o caudal através do dispositivo. Numa concretização, controla-se o caudal utilizando uma membrana limitadora da velocidade como uma "válvula".

Em geral, qualquer sistema de controlo de entrega de um agente, incluindo reservatórios, sistemas de controlo de caudal, sistemas sensores, e assim por diante tal como são conhecidos na técnica, podem ser incorporados nos dispositivos. A título de exemplo, as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 7.250.037, 7.315.758, 7.429.258, 7.582.069, e 7.611,481 descrevem os referidos reservatórios e sistemas de controlo.

Durante a utilização, a presença da superfície nanoestruturada das microagulhas na pele pode afectar a formação e a manutenção das junções entre células incluindo junções estreitas e desmossomas. Tal como se mencionou acima, verificou-se que as junções estreitas no estrato granuloso e a abertura das junções estreitas pode

proporcionar uma via paracelular para uma melhor entrega de fármacos para RA, em especial agentes com massa molecular elevada e/ou agentes que manifestem uma pequena lipofilicidade e que tenham anteriormente sido bloqueados e relação à entrega transdérmica.

Durante a utilização, o dispositivo pode interagir com uma ou mais componentes do tecido epitelial em contacto para aumentar a porosidade do tecido via mecanismos de transporte paracelular e/ou transcelular. O tecido epitelial é um dos principais tipos de tecido do corpo. O tecido epitelial que pode ser tornado mais poroso consoante a descrição presente pode incluir tanto epitélio simples como estratificado, incluindo tanto epitélio queratinizado como transicional. Adicionalmente, o tecido epitelial incluído neste documento pode incluir quaisquer tipos de células de uma camada epitelial, incluindo, sem limitação, queratinócitos, células escamosas, células colunares, células cuboidais e células pseudoestratificadas.

A interacção entre células individuais e estruturas da nanotopografia pode induzir a passagem de um agente através de uma barreira celular e encorajar o transporte transcelular. Por exemplo, a interacção com queratinócitos do estrato córneo pode encorajar a partição de um agente para os queratinócitos, seguida por uma difusão pelas células e através da bicamada lipídica mais

ma vez. Embora um agente possa atravessar uma barreira seguindo vias tanto paracelulares como transcelulares, a via transcelular pode predominar para moléculas muito hidrofílicas, embora, evidentemente, a via de transporte predominante possa variar dependendo da natureza do agente, sendo a hidrofilicidade uma característica importante.

A descrição presente pode ser mais bem entendida em relação aos Exemplos proporcionados adiante.

### **Exemplo 1**

Prepararam-se diversos moldes diferentes utilizando técnicas de fotolitografia semelhantes às empregues na concepção e no fabrico de circuitos eléctricos. Os passos individuais do processo são conhecidos em geral na técnica e foram descritos.

Inicialmente, prepararam-se substratos em silício limpando com acetona, metanol, e álcool isopropílico, e depois revestiram-se com uma camada com 258 nanómetros (nm) de dióxido de silício seguindo um processo de deposição química de vapor.

Formou-se então um perfil em cada substrato por um processo de perfilagem por litografia com feixe de electrões, tal como é conhecido na técnica, utilizando um

sistema EBL JEOL JBX-9300FS. As condições de processamento eram como se segue:

Corrente do feixe = 11 nA

Voltagem de aceleração = 100 kV

Inclinação do tiro = 14 nm

Dose = 260  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$

Resistência = ZEP520A, ~330 nm de espessura

Revelador = acetato de n-amilo

Resolução = dimensão de 2 minutos, seguida por uma enxaguação de 30 segundos com álcool isopropílico.

Contrastou-se então com dióxido de silício utilizando um *STS Advanced Oxide Etch* (AOE). O período de tempo de contrastação foi de 50 segundos utilizando 55 centímetros cúbicos padrão por minuto (sccm) de He, 22 sccm de  $\text{CF}_4$ , 20 sccm de  $\text{C}_4\text{F}_8$  a 4 mTorr, bobina de 400 W, RIE de 200 W e um Bias DC de 404 - 411 V.

Em seguida, levou-se a cabo uma contrastação com silício utilizando um *STS silicon oxide etch* (SOE). O período de tempo de contrastação foi de 2 minutos utilizando 20 sccm de  $\text{Cl}_2$  e 5 sccm de Ar a 5 mTorr, bobina de 600 W, RIE de 50 W e um Bias DC de 96 - 102 V. A profundidade da contrastação com silício foi de 500 nanómetros.

Utilizou-se um contrastador tamponizado de óxido (BOE) para a restante remoção de óxido que incluía uma imersão de três minutos em BOE seguida de uma enxaguação com água desionizada.

Utilizou-se uma nanoimpressora Obducat NIL-Eitre<sup>®6</sup> para formar nanoperfis numa série de substratos poliméricos. Utilizou-se água externa para arrefecimento. O módulo de UV utilizava uma lâmpada com um só pulso a um comprimento de onda de entre 200 e 1.000 nanómetros a 1,8 W/cm<sup>2</sup>. Utilizou-se um filtro de UV de 250 - 400 nanómetros. A área de exposição era de 6 polegadas com um máximo de temperatura de 200°C a 80 Bar. A nanoimpressora incluía uma unidade semi-automática de separação e uma desmoldagem automática controlada.

Para facilitar a libertação das películas nanoimpressas dos moldes, trataram-se os moldes com trideca-(1,1,2,2-tetrahidro)-octitriclorossilano (F<sub>13</sub>-TCS). Para tratar um molde, o molde em silício foi primeiro limpo com um pouco de acetona, metanol, e álcool isopropílico e seco com azoto gasoso. Colocou-se uma placa de Petri numa placa de aquecimento numa atmosfera de azoto e adicionou-se 1-5 mL do F<sub>13</sub>-TCS à placa de Petri. Colocou-se um molde em silício na placa de Petri e tapou-se durante 10-15 minutos para permitir que o vapor de F<sub>13</sub>-TCS molhasse o molde em silício antes da remoção do molde.

Utilizaram-se cinco polímeros diferentes listados na Tabela 1, adiante, para formar diversas concepções de nanotopografia.

**Tabela 1**

Polímero	Temperatura de Transição Vítrea, $T_g$ (K)	Módulo Tênsil (MPa)	Tensão Superficial (mN/m) @20°C
Polietileno	140-170	100-300	30
Polipropileno	280	1.389	21
PMMA	322	3.100	41
Poliestireno	373	3.300	40
Policarbonato	423	2.340	43

Formaram-se diversos perfis diferentes de nanotopografias, cujas representações esquemáticas estão ilustradas nas Figs. 24A-24D. O perfil de nanotopografia ilustrado na Figura 12E era uma superfície de um substrato plano adquirida junto da NTT Advanced Technology de Tóquio, Japão. Os perfis foram designados DN1 (Fig. 24A), DN2 (Fig. 24B), DN3 (Fig. 24C), DN4 (Fig. 24D) e NTTAT2 (Fig. 24E). Mostram-se imagens SEM dos moldes nas Figs. 24A, 24B, e 24C, e mostram-se imagens das películas nas Figs. 24D e 24E. A Fig. 8 ilustra uma película com um nanoperfil formado por utilização do molde da Fig. 24A (DN1). Nesta película específica, os aspectos do polímero foram concebidos por variação da temperatura tal como se descreveu anteriormente. A rugosidade da superfície no

perfil da Fig. 24E foi determinada como sendo de 34 nanómetros.

O perfil ilustrado nas Figs. 7C e 7D também foi formado por este processo de nanoimpressão. Este perfil incluía os pilares 72 e os pilares 62, como ilustrados. Formaram-se pilares maiores 72 com um diâmetro de 3,5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) e alturas de 30  $\mu\text{m}$  com distâncias de centro a centro de 6,8  $\mu\text{m}$ . Os pilares 62 tinham altura de 500 nanómetros e diâmetro de 200 e uma distância de centro a centro de 250 nanómetros.

As condições do processo de nanoimpressão utilizadas com películas em polipropileno estão proporcionadas adiante na Tabela 2.

**Tabela 2**

Tempo (s)	Temperatura (C)	Pressão (Bar)
10	50	10
10	75	20
10	100	30
420	160	40
180	100	40
180	50	40
180	25	40

**Exemplo 2**

Formaram-se películas tal como descrito acima no Exemplo 1 incluindo diversos perfis diferentes e formados quer em poliestireno (PS), quer em polipropileno (PP). O substrato subjacente variava de espessura. Os perfis utilizados eram quer DN2, DN3, ou DN4 utilizando processos de formação tal como descritos no Exemplo 1. Os moldes dos perfis variavam em relação à espessura do braço e ao espaçamento entre os aspectos para formar uma série de aspectos com diferentes dimensões, tendo os perfis designados. A amostra nº. 8 (designada BB1) foi formada utilizando um filtro de 0,6  $\mu\text{m}$  em policarbonato millipore como molde. Uma película de 25  $\mu\text{m}$  em polipropileno foi colocada sobre o topo do filtro e foi depois aquecida para fundir para que o polipropileno pudesse fluir pelos poros do filtro. Arrefeceu-se então o molde e dissolveu-se o molde em policarbonato utilizando cloreto de metileno como solvente.

Ilustram-se as SEM das películas formadas nas Figs. 25-33 e resumem-se as características das películas formadas na Tabela 3, adiante.

### **Tabela 3**

Amostra No.	Fig.	Perfil	Material	Espessura da Película (µm)	Aspecto do Perfil	Dimensão da Secção Transversa	Altura do aspecto	Razão de Aspecto	Rugosidade Superficial (nm)	Dimensão Fractal	Ângulo de Contacto com a Água
1	25	DN3	PS	75	A	1100 nm	520 nm	0,47	150	2,0	100°
					B	400 nm	560 nm	1,4			
					C	200 nm	680 nm	3,4			
2	26A, 26B	DN2	PP	5,0	n/a	200 nm	100 nm	0,5	16	2,15	91°
3	27	DN2	PS	75	n/a	200 nm	1,0 µm	5	64	2,2	110°
4	28	DN2	PP	25,4	n/a	200 nm	300 nm	1,5	38	1,94	118°
5	29	DN3	PS	75	A	1100 nm	570 nm	0,52	21,1	1,98	100°
					B	400 nm	635 nm	1,6			
					C	200 nm	-	-			
6	30	DN4	PS	75	n/a	200 nm	-	-	30,6	2,04	80°
7	31	DN4	PP	25,4	n/a	200 nm	-	-	21,4	2,07	112°
8	32	BB1	PP	25,4	n/a	600 nm	18µm	30	820	2,17	110°
9	33	DN3	PP	5	A	1100 nm	165 nm	0,15	50	2,13	-
					B	400 nm	80 nm	0,2			
					C	200 nm	34 nm	0,17			

<sup>1</sup>Os aspectos dos perfis são tal como constam das figuras.

<sup>2</sup> Os valores da dimensão da secção transversa são derivados do molde e equacionados como uma aproximação da dimensão máxima da estrutura, embora de deva entender que a dimensão actual de uma estrutura individual pode variar ligeiramente tal como é aparente nas figuras.

<sup>3</sup>As alturas dos aspectos são proporcionadas como médias de diversas alturas de aspectos individualmente determinadas.

Utilizou-se AFM para caracterizar a película em cada amostra. A caracterização incluía a formação de uma micrografia electrónica de varrimento (SEM), a determinação da rugosidade da superfície, a determinação de uma altura máxima medida de um aspecto, e a determinação da dimensão fractal.

A sonda de microscopia de força atômica (AFM) utilizada era uma sonda em silício da série 16 e cantiléver disponível junto da  $\mu$ Masch. O cantiléver tinha uma frequência de ressonância de 170 kHz, uma constante da mola de 40 N/m, um comprimento de  $230 \pm 5 \mu\text{m}$ , uma largura de  $40 \pm 3 \mu\text{m}$ , e uma espessura de  $7,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . A ponta da sonda era uma sonda em silício dopado com fósforo, de tipo n, sendo o valor típico do raio da ponta da sonda de 10 nanômetros, com um ângulo completo do cone na ponta de  $40^\circ$ , uma altura total do topo de 20-25  $\mu\text{m}$ , e uma resistividade a granel de 0,01-0,05 ohm-cm.

O valor da rugosidade da superfície constante da Tabela 3 é a altura média aritmética do parâmetro de rugosidade na área da superfície tal como definido na série ISO 25178.

Calculou-se a Dimensão Fractal para os diferentes ângulos analisando o espectro de amplitude de Fourier; para diferentes ângulos o perfil de amplitude de Fourier foi extraído e o logaritmo das coordenadas da frequência e da amplitude foi calculado. A dimensão fractal, D, para cada direcção é então calculada como

$$D = (6+s)/2,$$

em que  $s$  é o coeficiente angular (negativo) das curvas log - log. A dimensão fractal reportada é a média para todas as direcções.

Também pode avaliar-se a dimensão fractal dos espectros bidimensionais de Fourier por aplicação da função Log Log. Caso a superfície seja fractal o gráfico de Log Log deve ser fortemente linear, com um coeficiente angular negativo (veja-se, por exemplo, Fractal Superfícies, John C. Russ, Springer-Verlag New York, LLC, Julho, 2008).

### **Exemplo 3**

Cultivaram-se células epiteliais humanas HaCaT em DMEM, com 10 % de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C, sob 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a uma concentração de 25.000 células/cm<sup>2</sup> em placas de 6 poços. As placas tinham quer películas em polipropileno com nanoperfis formadas tal como descrito acima no Exemplo 1 e designadas DN1, DN2 (Amostra 4 da Tabela 3), DN3 ou superfície não tratada no fundo do poço. As películas nanoperfiladas foram coladas com cianoacrilato.

Separaram-se as células das superfícies com 1 mL de tripsina por poço durante 10 minutos, terminando-se com 1 mL de meio de crescimento (tal como acima), depois transferiram-se para um tubo de microfuga e obtiveram-se pastilhas a 1.200 rpm durante 7 minutos.

Isolou-se ARN das pastilhas de células utilizando o estojo RNeasy miniprep da Qiagen e seguindo o protocolo do fabricante. Em suma, lisaram-se as células, misturou-se com etanol e passou-se através de uma coluna. Lavaram-se então os lisados 3 vezes, tratou-se com DNase e eluiu-se em volumes de 40  $\mu$ L.

Criou-se cADN a partir do ARN isolado utilizando o estojo da primeira cadeia RT de SA Biosciences. Em suma, tratou-se o ARN mais uma vez com DNase a 42°C durante 5 minutos. Adicionaram-se então iniciadores aleatórios e enzima transcriptase reversa e incubou-se a 42°C durante 15 minutos, depois incubou-se a 95°C durante 5 minutos para parar a reacção.

Levou-se então a cabo uma qPCR sobre as amostras de cADN utilizando o perfilhante RT para PCR matricial da SA Biosciences com iniciadores para IL1- $\beta$ , IL6, IL8, IL10, IL1R1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, PDGFA, GAPDH, HDGC, RTC e PPC. Em suma, misturou-se cADN com verde de SYBR e água, e depois adicionou-se a uma placa de PCR previamente fixada com o par de iniciadores correcto de sentido directo e de sentido reverso para o produto com interesse. Correu-se então a placa numa máquina de PCR *ABI StepOnePlus* aquecida a 95°C durante 10 minutos, e em seguida com 45 ciclos de: 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Levou-se a cabo uma análise delta delta  $C_T$  utilizando GAPDH como controlo interno. Utilizaram-se os teores em HDGC, RTC e PPC como controlos internos adicionais para a actividade e a contaminação genómica do ADN.

Utilizaram-se então ANOVA num sentido e teste de Tukey de 2 pontos para determinara significância estatística das diferenças entre superfícies.

A Tabela 4, adiante, apresenta as expressões proteicas obtidas como alteração do número de vezes na expressão em estruturas nanoimpressas produzidas em película de polipropileno, em relação à expressão numa película não estruturada.

**Tabela 4**

Molde	IL1- $\beta$	IL6	IL8	IL10	IL1R1	TNF $\alpha$	TGF $\beta$ 1	PDGFA
DN1	2,24	3,33	0,36	1,17	0,6	0,57	0,37	1,37
DN2	3,18	3,2	0,46	0,43	0,36	0,57	0,42	1,23
DN3	3,36	2,7	0,47	5,83	1,6	0,37	0,35	0,64

**Exemplo 4**

Utilizaram-se métodos tal como descritos no Exemplo 3 para examinar o teor de expressão para diversas citocinas diferentes de células epiteliais humanas HaCaT

quando se permitia que estas células se desenvolvessem numa série de películas diferentes em polipropileno (PP) ou em poliestireno (PS), formadas e perfiladas tal como descrito acima. Comparou-se o teor de expressão para cada citocina com o do mesmo tipo de célula em cultura sobre um padrão de poliestireno para cultura de tecidos (TCPS) e induzida com lipopolissacárido (LPS). Listam-se os resultados na Tabela 5, adiante.

Verificou-se que as células desenvolvidas numa película de polipropileno com um nanoperfil DN2, como descritas acima (Amostra 4 da Tabela 3), regulavam em alta a expressão de IL-1 $\beta$ , IL-1 ra, IL-10, e MIP-1 $\beta$  e regulavam em baixa a expressão de IL-4, IL-13, MIG, KC, IL-2, MIP-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-16, e IL-1 $\alpha$ , em comparação com TCPS.

Examinaram-se diversas outras películas quanto ao seu efeito na expressão celular de diferentes citocinas. As películas foram designadas como se segue:

- 1 - DN2 perfil numa película de 75  $\mu$ m em poliestireno (Amostra 3 da Tabela 3)
- 2 - DN3 perfil numa película de 75  $\mu$ m em poliestireno (Amostra 1 da Tabela 3)
- 3 - DN4 perfil numa película de 75  $\mu$ m em poliestireno (Amostra 6 da Tabela 3)
- 4 - película não impressa de 75  $\mu$ m em poliestireno

- 5 - DN2 perfil numa película de 25,4 µm em polipropileno (Amostra 4 da Tabela 3)
- 6 - DN4 perfil numa película de 25,4 µm em polipropileno (Amostra 7 da Tabela 3)
- 7 - DN2 perfil numa película de 5 µm em polipropileno (Amostra 2 da Tabela 3)
- 8 - BB1 película em polipropileno (Amostra 8 da Tabela 3)
- 9 - película não impressa de 25,4 µm em polipropileno
- 10 - película não impressa de 5 µm em polipropileno

Ilustram-se os resultados na Tabela 5, adiante.  
Proporcionam-se os resultados como se segue:

- o teor de expressão foi inferior ao do limiar do teste
- o teor de expressão foi inferior ao para TCPS
- = o teor de expressão foi semelhante ao para TCPS
- + o teor de expressão foi superior ao para TCPS, mas inferior ao induzido com LPS
- ++ o teor de expressão foi semelhante ao obtido por indução com LPS
- +++ o teor de expressão foi superior ao obtido por indução com LPS

**Tabela 5**

Película	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IL-1 $\alpha$	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IL-1 $\beta$	++	--	--	++	--	--	--	--	--	--
IL-12	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
TNF- $\alpha$	==+	=	=	=	=	=	=	=	==+	=
MCP-1	==+	=	=	=	=	=	=	=	==+	=
IL-2	=	==	==+	=	=	=	=	=	--	=
KC	--	--	=	=	=	=	=	=	-	-
MIP-1 $\alpha$	--	--	--	+++	-	-	+	--	+++	+++
MIP-1b	++	+	=	=	=	+	=	=	=	=
MIG	=	--	=	+	-	-	--	-	-	=
GM-CSF	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IL-4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IL-13	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--
IL-10	-	-	=	=	=	=	=	=	=	=

**Exemplo 5**

Cultivaram-se células epiteliais de pele humana HaCaT em DMEM, com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C, sob 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas a uma concentração de 25.000 células/cm<sup>2</sup> em placas de 6 poços. As placas tinham quer uma película em polipropileno formada como descrito acima no Exemplo 1 com

a designação DN1, DN2 (Amostra 4 da Tabela 3), DN3 ou uma superfície não tratada no fundo do poço. Colaram-se as películas com cianoacrilato.

Recolheram-se amostras de meio de cada poço e analisou-se a produção de citoquina com um estojo Milliplex Map da Millipore. Utilizaram-se pérolas para detectar IL1- $\beta$ , IL1RA, IL6, IL8, IL10, PDGF-AA, PGGF-AB/BB e TNF- $\alpha$ . As leituras foram feitas numa máquina BioPlex da BioRad. Em suma, colocou-se meio em poços de microplacas com filtros. Adicionaram-se as pérolas principais e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora sob agitação. Lavaram-se então as placas e incubaram-se com anticorpos para detecção durante 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Adicionou-se então estreptavidina-ficoeritrina e incubou-se à temperatura ambiente durante mais 30 minutos. Lavaram-se então as placas, voltaram a suspender-se as pérolas em tampão de ensaio e analisou-se a intensidade mediana fluorescente no BioPlex.

### **Exemplo 6**

Determinaram-se os efeitos da permeabilidade das películas perfiladas como descritas neste documento numa monocamada de células Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorrectal humano).

Utilizaram-se películas formadas tal como descritas acima no Exemplo 1 incluindo películas formadas com perfis designados DN2, DN3, e DN4. Uma quarta película, designada BB1 (descrita no Exemplo 2, acima) também foi utilizada. O protocolo foi corrido com múltiplos exemplos de cada tipo de película.

O protocolo geral seguido para cada película foi como se segue:

### **Materiais**

Inserções de cultura de células com membrana HDPET com poros de 0,4  $\mu\text{m}$  de tamanho (BD Falcon)

Placa de 24 poços (BD Falcon)

Meios para Caco-2

Membranas nanoestruturadas como descritas acima

IgG-FITC (Sigma Aldrich)

BSA-FITC (Sigma Aldrich)

Meio Essencial Mínimo sem vermelho de fenol (Invitrogen)

Voltímetro TEER

PBS aquecido

Placa negra com 96 poços

Folha de alumínio

### **Protocolo**

1. Semeiam-se células Caco-2 em inserções de poços revestidos a colagénio 2 semanas antes de se levar a cabo o ensaio de permeabilidade. As placas revestidas a colagénio são feitas preparando um volume a 1:1 de etanol a 100% e colagénio. As superfícies secas mantiveram-se em sangue estéril de um dia para o outro até secarem.
2. Prepara-se uma solução a 0,1 mg/mL de molécula de FITC-conjugada (BSA, IgG, etc.) com interesse em meio Alpha MEM isento de vermelho de fenol. Embrulha-se em folha de alumínio para proteger da luz.
3. Controla-se a confluência das células Caco-2 medindo a resistência. A resistência deve ser maior do que ~600 Ohms à confluência.
4. Aspiram-se meios antigos das inserções de meios de cultura nos lados apical e basolateral. Enxagua-se com PBS para remover qualquer corante vermelho de fenol residual.
5. Adicionam-se 0,5 mL de solução FITC-conjugada do lado apical de cada inserção.
6. Noutra placa de 24 poços com inserções de culturas de células, adicionar 0,5 mL de PBS aquecido a cada poço.

7. Transferir as inserções para a placa com PBS. Colocar o fundo da inserção num pano de Kim para remover o vermelho de fenol residual.
8. ponto de tempo  $t=0$ : Amostram-se 75  $\mu\text{L}$  do lado basolateral da inserção e transferem-se para uma placa de 96 poços com fundo negro. Substitui-se o volume com 75  $\mu\text{L}$  de PBS aquecido. Regista-se a resistência de cada poço utilizando os eléctrodos "chopstick".
9. Cuidadosamente adiciona-se a membrana ao poço adequadamente marcado. Os controlos são as membranas não impressas e as células sós. Monitoriza-se sob um microscópio que as membranas estão directamente em contacto com as células. Deve ser possível ver um círculo bem marcado, indicando contacto com as células.
10. ponto de tempo  $t=0$ : repetir o passo 7 e depois colocar na incubadora durante 1 hora
11. ponto de tempo  $t=1$ : repetir o passo 7 e depois colocar na incubadora durante 1 hora
12. ponto de tempo  $t=2$ : repetir o passo 7
13. Medir o sinal de fluorescência utilizando um leitor de espectrofluorometria de placas. FITC (excitação= 490 nm, emissão= 520 nm)

## **Resultados**

Resumem-se as películas utilizadas e os resultados obtidos na Tabela 6, adiante.

**Tabela 6**

<b>Amostra no, (veja-se a Tabela 3)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Perfil	DN2	DN2	DN2	DN3	DN4	DN4	BB1
Material	PP	PS	PP	PS	PS	PP	PP
Módulo de Compressão Efectivo (MPa)	5,3	16,3	0,29	10,4	32,3	4,8	7,8
Módulo de Corte Efectivo (MPa)	5,32	58,9	218	319	77,8	4,4	26,7
Área Superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	-	0,11	-	0,44	-	4,15	-
Aumento de permeabilidade a BSA aos 120 min, (MW 66 kDa)	-	2	1,9	3,3	2	1,4	1
Aumento de permeabilidade a IgG aos 120 min, (MW 150 kDa)	-	1	-	1	3,5	-	-

Determinaram-se módulos segundo os métodos padrão tal como são conhecidos na técnica e estão descritos por Schubert, *et al.* (Sliding induced adhesion of stiff polymer microfiber arrays: 2. Microscale behaviour, Journal Royal Society, Interface, Janeiro 22, 2008. 10.1098/rsif.2007.1309)

Os ângulos de contacto foram medidos colocando uma gota de água na superfície consoante a prática habitual. (Veja-se, por exemplo, Woodward, First Ten Angstroms, Portsmouth, VA).

A Fig. 34 ilustra graficamente os efeitos sobre a permeabilidade a albumina de soro de bovino (BSA) numa

monocamada de células em películas em poliestireno perfiladas com nanoporfis como descrito neste documento. Os perfis de películas incluíam um perfil DN2 (Amostra no. 3), um perfil DN3 (Amostra no. 5), e um perfil DN4 (Amostra no. 6), como indicado. Também se mostram resultados para uma película sem perfis (marcada como PSUI na Fig. 34) e uma camada de células sem película adjacente (marcada 'células' na Fig. 21).

As Figs. 35A e 35B ilustram graficamente os efeitos sobre a permeabilidade à imunoglobulina-G (IgG) numa monocamada de células em películas de poliestireno perfiladas com nanoporfis como descritos neste documento. Os perfis das películas incluíam um perfil DN2 (Amostra no. 3), um perfil DN3 (Amostra no. 5), e um perfil DN4 (Amostra no. 6), como indicado. Também se conhecem os resultados de uma película sem perfis (marcada PSUI nas Figs. 35A e 35B) e de uma camada de células sem película adjacente (marcada 'células' nas Figs. 35A e 35B). Os resultados estão ilustrados como número de vezes de aumento da permeabilidade em função do tempo medido em horas. O sinal de BSA foi lido num fluorómetro e o sinal de IgG foi lido num espectrofotómetro.

As Figs. 36A e 36B são imagens de contrastação com fluoresceína 3D vivas/mortas mostrando o transporte paracelular e transcelular de IgG através de uma monocamada

de células numa película em poliestireno com perfil DN4 (Amostra no. 6).

A Fig. 37 ilustra graficamente os efeitos sobre a permeabilidade a BSA numa monocamada de células sobre películas de polipropileno perfiladas com nanoperfis como descritos neste documento. Os perfis incluíam BB1 (Amostra no. 8), DN2 (Amostra no. 4), e DN4 (Amostra no. 7), como indicado. Também se mostram resultados para uma película não perfilada (marcada PSUI na Fig. 37) e para uma camada de células sem película adjacente (marcada 'células' na Fig. 37).

A Fig. 38 ilustra graficamente os efeitos sobre a permeabilidade a IgG numa monocamada de células sobre películas de polipropileno perfiladas com nanoperfis como descritos neste documento. Os perfis incluíam BB1 (Amostra no. 8), DN2 (Amostra no. 4), e DN4 (Amostra no. 7), como indicado. Também se mostram resultados para uma película não perfilada (marcada PSUI na Fig. 38 e para uma camada de células sem película adjacente (marcada 'células' na Fig. 38).

As Figs. 39A e 39B são imagens de contrastação com fluoresceína 3D vivas/mortas mostrando o transporte paracelular e transcelular de IgG através de uma monocamada de células numa película em poliestireno com perfil DN2 (Amostra no. 4).

As Figs. 40A-40F são imagens por microscopia electrónica de varrimento (SEM) de células Caco-2 em cultura em superfícies nanoperfiladas. Especificamente, as Figs. 40A e 40B ilustram células Caco-2 numa película plana em poliestireno de controlo. As Figs. 40C e 40D ilustram células Caco-2 numa película em poliestireno perfilada com um perfil DN2 (Amostra no. 3) como descrita acima, e as Figs. 40E e 40F ilustram células Caco-2 numa película em poliestireno perfilada com um perfil DN3 (Amostra no. 5) como descrito acima.

### **Exemplo 7**

Utilizou-se um método como descrito no Exemplo 6 para examinar a permeabilidade de uma monocamada de células Caco-2 à proteína de fusão terapêutica etanercept (comercializada sob a marca Enbrel®). A Fig. 41 ilustra graficamente os resultados para camadas de células crescidas em diferentes substratos perfilados incluindo tanto em polipropileno (DN2 PP - Amostra 4 da Tabela 3) e em poliestireno (DN2 PS - Amostra 3 da Tabela 3 e DN3 PS - Amostra 1 da Tabela 3) bem como numa membrana em poliestireno não impressa (PSUI) e numa camada de células sem membrana (células). Mostram-se os resultados como o número de vezes da alteração da permeabilidade inicial ao longo do tempo. A Fig. 42 ilustra o número de vezes do aumento a partir do inicial  $t=0$  às duas horas ( $t=2$ ) após

adição da membrana ao poço para os substratos e camada celular da Fig. 41.

### **Exemplo 8**

Formou-se um conjunto de microagulhas incluindo uma superfície nanoperfilada. Inicialmente, formou-se um conjunto de microagulhas como ilustrado na Fig. 2 numa placa de silício por um processo de fotolitografia. Cada agulha incluía dois canais laterais colocados opostamente, alinhados com um buraco que atravessava a partir da base da agulha (não visível na Fig. 2).

Formaram-se microagulhas de acordo com um processo típico de microfabricação numa placa baseada em silício. As placas foram revestidas com camadas de resistência e/ou óxido e em seguida foram selectivamente contrastadas (contrastação de óxido, contrastação de DRIE, isocontrastação), retirando-se resistência, retirando-se óxido, e por técnicas de litografia (por exemplo, isolitografia, litografia de buracos, litografia de ranhuras) seguindo métodos padrão para se formar o conjunto de microagulhas.

Depois da formação do conjunto de microagulhas, formou-se sobre ele uma película com 5  $\mu\text{m}$  em polipropileno incluindo um perfil DN2 formado sobre ela como descrito acima no Exemplo 1, cujas características estão descritas

na Amostra 2 da Tabela 3, sobre o conjunto de microagulhas. Manteve-se a estrutura da placa/película numa estufa de vazio (3 polegadas de H<sub>2</sub>O de vazio) a uma temperatura elevada (130°C) durante um período de uma hora para puxar suavemente a película sobre a superfície das microagulhas enquanto se mantinha a superfície nanoperfilada da película.

A Fig. 43 ilustra a película sobre o topo do conjunto de microagulhas, e a Fig. 44 é uma vista mais de perto de uma única agulha do conjunto, incluindo a película nanoperfilada sobre o topo da agulha.

### **Exemplo 9**

Formaram-se pachos transdérmicos incluindo matrizes de microagulhas como descrito no Exemplo 8. Formaram-se os pachos quer com um perfil DN2 quer com um perfil DN3 para a matriz de microagulhas. As películas definindo os perfis que se aplicaram às microagulhas estão descritas na Tabela 7, adiante. A película 1 é equivalente à Amostra no. 2 da Tabela 3 e a Película 2 é equivalente à Amostra no. 9 da Tabela 3.

**Tabela 7**

<b>Propriedade</b>	<b>Película 1</b>	<b>Película 2</b>
Perfil	DN2	DN3

<b>Propriedade</b>	<b>Película 1</b>	<b>Película 2</b>
Material	polipropileno	polipropileno
Espessura da película	5 micrómetros	5 micrómetros
Altura das estruturas	100 nm	165 nm, 80 nm, 34 nm
Razão de aspecto das estruturas	0,5	0,18
Rugosidade Superficial Média $R_A$	16 nm	50 nm
Dimensão Fractal	2,15	2,13

Também se formaram pachos de controlo que não tinham nenhum perfil formado na película que se aplicou subsequentemente à matriz de microagulhas. Prepararam-se formulações transdérmicas e subcutâneas de etanercept (Enbrel<sup>®</sup>) seguindo as instruções do fornecedor do fármaco. A formulação da dose subcutânea (para o controlo positivo) foi preparada para facilitar uma dose subcutânea de 4 mg/kg de fármaco. A concentração em Enbrel<sup>®</sup> para entrega transdérmica foi ajustada de tal modo que se conseguisse um doseamento pretendido de 200 mg/kg ao longo de um período de 24 h.

Utilizou-se no estudo um total de 10 murganhos BALB/C (com designações atribuídas #1 - #10), sendo 8 doseados transdermicamente com Enbrel<sup>®</sup> (grupo 1) e 2

doseados subcutaneamente com Enbrel® (grupo 2) como descrito na Tabela 8, adiante. Os pachos transdérmicos foram aplicados a áreas da pele barbeada e em buracos formados perto das pontas das microagulhas quando se aplicava o pacho na pele.

**Tabela 8**

Grupo No.	Artigo em Teste	Fármaco	Via da Dose	Teor da Dose	Volume da dose	Pontos de tempo para recolha de sangue	úmero do Animal
1	Pacho Transdérmico	Enbrel®	Transdérmica	5 mg /sujeito	0,2 mL	Pré-pacho	#1, #5
						0,5 h	#2, #6
						2 h	#3, #7
						6 h	#4, #8
						24 h	#2, #6
						72 h	#3, #7
2	entrega subcutânea	Enbrel®	Subcutânea	4mg/kg	0,1 mL	24 h	#9, #10

Os pachos transdérmicos utilizados incluíam tanto os definindo uma nanotopografia na superfície (perfis DN2 e DN3, como descrito acima), como os pachos sem perfil de nanotopografia.

Recolheram-se amostras de sangue inteiro nos pontos de tempo indicados na Tabela 8. Obteve-se cerca de 100 a 200 µL de sangue por hemorragia mandibular e centrifugou-se a cerca de 1.300 rpm durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada (operada a 4°C). Aspirou-se o soro resultante e transferiu-se antes de 30 minutos da

colheita/centrifugação do sangue, para tubos adequadamente rotulados. Congelaram-se os tubos e armazenaram-se às escuras a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  até serem analisados os teores de Enbrel® utilizando um estojo ELISA de receptor sTNF Humano (R&D Systems cat# DRT200). Duas amostras do mesmo sujeito foram feitas a 24 h de intervalo, para evitar tensão desnecessária para o sujeito.

A Fig. 45 ilustra graficamente a média do perfil PK dos patchos transdérmicos que definem uma nanotopografia sobre eles. Uma média dos resultados para todas os patchos incluindo nanotopografias foi utilizada para representar o efeito global de se incorporar uma nanotopografia em conjunto com umas microagulhas no patcho transdérmico. Como se pode ver, o teor no soro do sangue aumentou rapidamente até mais de 800 ng/mL/cm<sup>2</sup> de área do patcho ao longo das duas primeiras horas de ligação. Em seguida, o teor no soro de sangue diminuiu gradualmente até se tornar desprezável adentro das 24 horas de ligação. Os dados utilizados para criar a FIG. 45 estão proporcionados adiante na Tabela 9.

**Tabela 9**

<b>Temo (h)</b>	<b>Concentração no soro de sangue (ng/mL)</b>
0	0
0,5	192,1
2	249,25

<b>Temo (h)</b>	<b>Concentração no soro de sangue (ng/mL)</b>
6	24,4
24	7,2
65	4,0875

As Figs. 46A e 46B ilustram vistas da secção transversa por microscopia electrónica, da pele que foi mantida em contacto com os pachos. As imagens foram obtidas depois dos pachos serem removidos (72 horas depois de ligados). A Amostra da Fig. 46A foi mantida em contacto com um pacho incluindo uma nanotopografia à superfície. Especificamente, formou-se um perfil DN2 como descrito acima, à superfície do pacho. A Amostra da Fig. 46B foi mantida em contacto com um pacho transdérmico que não definia nenhum perfil de nanotopografia à superfície. Como se pode ver, a Amostra da Fig. 46B mostra sinais de inflamação e uma densidade elevada de presença de macrófagos.

### **Exemplo 10**

Formaram-se pachos transdérmicos incluindo matrizes de microagulha como descritos no Exemplo 8. Formaram-se os pachos com um perfil DN2 ou um perfil DN3 na matriz de microagulhas como descrito na Tabela 7 do Exemplo 9. Também se formaram pachos de controlo que não tinham nenhum perfil formado na película subsequentemente aplicada

sobre a matriz de microagulhas. Prepararam-se formulações transdérmicas e subcutâneas de etanercept (Enbrel®) seguindo as instruções do fornecedor do fármaco.

Os sujeitos em teste (coelhos) foram doseados transdermicamente com Enbrel® ou foram doseados subcutaneamente (SubQ) com Enbrel®. Ilustram-se os resultados graficamente na Fig. 35, que proporciona a concentração no sor do sangue em pg/mL em função do tempo. Os dados utilizados para produzir a Fig. 47 estão proporcionados na Tabela 10, adiante.

**Tabela 10**

<b>Tempo</b>	<b>Microagulha sem estrutura</b>	<b>Subcutânea DN2</b>	<b>Subcutânea DN3</b>		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,00	157,49	0,00	1611,21	0,00
2	0,00	3029,07	0,00	3504,92	497,17
6	0,00	3545,14	338,23	3699,24	796,64
12	0,00	3577,13	731,22	3571,80	1080,60
24	116,78	3778,71	785,49	3464,70	1924,24
48	134,23	3416,73	638,18	3885,31	1006,95
72	88,68	3356,64	572,77	3803,42	1172,67

Lisboa, 21 de Agosto de 2017.

## REIVINDICAÇÕES

1. Um dispositivo (10) para entrega de um fármaco para a artrite reumatóide através de uma barreira dérmica, compreendendo este dispositivo:

uma matriz de microagulhas (116) e uma pluralidade de nanoestruturas (104) fabricadas numa superfície de pelo menos uma das microagulhas (12;22;120;330;230), estando as nanoestruturas (104) dispostas segundo um perfil previamente determinado; e

**caracterizada por** compreender adicionalmente: um reservatório (112;206;306) que esteja em comunicação por fluido com a matriz de microagulhas (116); e

o fármaco para a artrite reumatóide mantido no reservatório (112;206;306).

2. O dispositivo da reivindicação 1, em que o perfil incluía adicionalmente microestruturas (100), em que as nanoestruturas (104) tenham uma dimensão da secção transversa inferior à das microestruturas (100).

3. O dispositivo da reivindicação 2, compreendendo adicionalmente segundas nanoestruturas (102)

tendo uma dimensão da secção transversa inferior à dimensão da secção transversa das microestruturas (100) e maior do que a dimensão da secção transversa das primeiras nanoestruturas (104).

4. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que pelo menos uma porção das nanoestruturas (102, 104) tenham uma dimensão da secção transversa inferior a 500 nanómetros e superior a 5 nanómetros; e/ou em que pelo menos uma porção das nanoestruturas (102, 104) apresentem uma distância centro a centro de entre 50 nanómetros e 1 micrómetro.

5. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que pelo menos uma porção das nanoestruturas (102, 104) tenham uma altura de entre 10 nanómetros e 20 micrómetros.

6. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que pelo menos uma porção das nanoestruturas (102, 104) tenham uma razão de aspecto de entre 0,15 e 30.

7. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em o fármaco para a artrite reumatóide seja um fármaco anti-reumático que modifica a doença.

8. O dispositivo da reivindicação 7, em que o fármaco para a artrite reumatóide seja uma terapêutica proteica.

9. O dispositivo da reivindicação 8, em que o fármaco para a artrite reumatóide seja um bloqueador de TNF- $\alpha$  ou um bloqueador de IL-1.

10. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o fármaco para a artrite reumatóide seja um fármaco anti-inflamatório.

11. O dispositivo de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o fármaco para a artrite reumatóide seja um analgésico.

12. Um método para formar um dispositivo (10) para a entrega de um fármaco contra a artrite reumatóide através de uma barreira dérmica, compreendendo o método:

fabricar-se uma matriz de microagulhas (116);

fabricar-se um perfil de nanoestruturas (104) numa superfície de pelo menos uma das microagulhas (12;22;120;330;230); **caracterizado por**

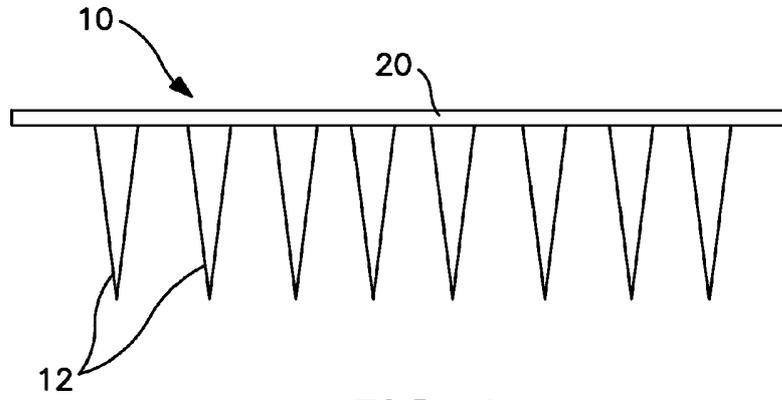
se associar um fármaco para a artrite reumatóide às microagulhas

(12;22;120;330;230) de tal modo que o fármaco para a artrite reumatóide esteja em comunicação por fluido com as microagulhas (12;22;120;330;230), e pela manutenção do fármaco para a artrite reumatóide dentro de um reservatório (112;206;306) que se encontre em comunicação por fluido com a matriz de microagulhas (116).

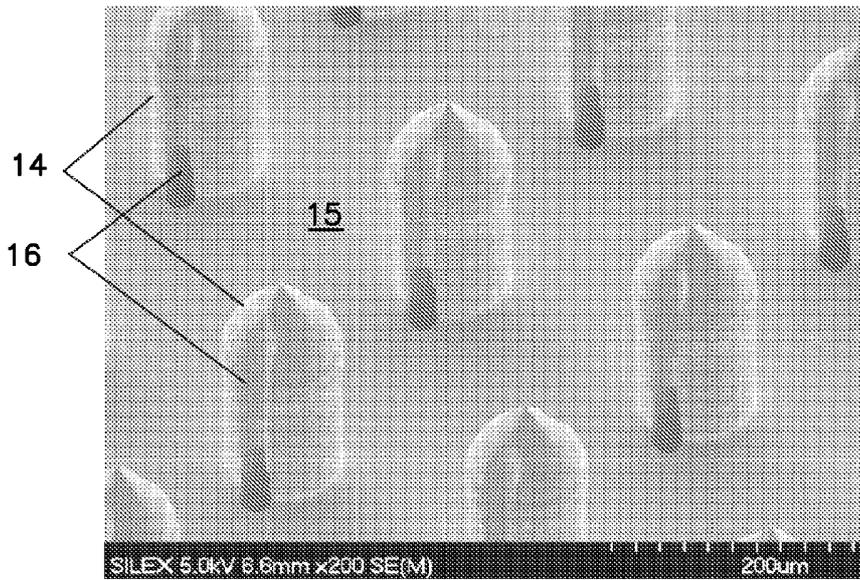
13. O dispositivo ou o método consoante qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o reservatório (112;206;306) esteja ligado a um substrato (20) no qual se localize a matriz de microagulhas (16).

14. O dispositivo ou o método consoante qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o reservatório (112;206;306) seja ligável de um modo capaz de remoção à matriz de microagulhas (16).

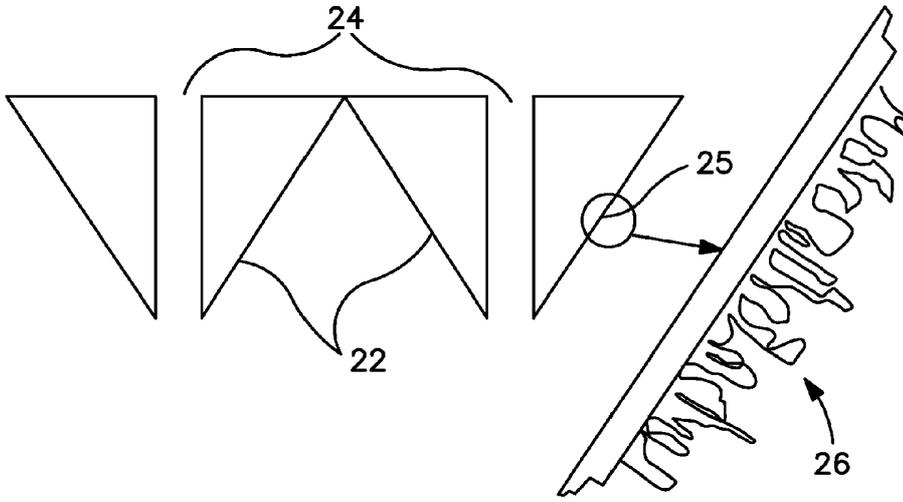
Lisboa, 21 de Agosto de 2017.



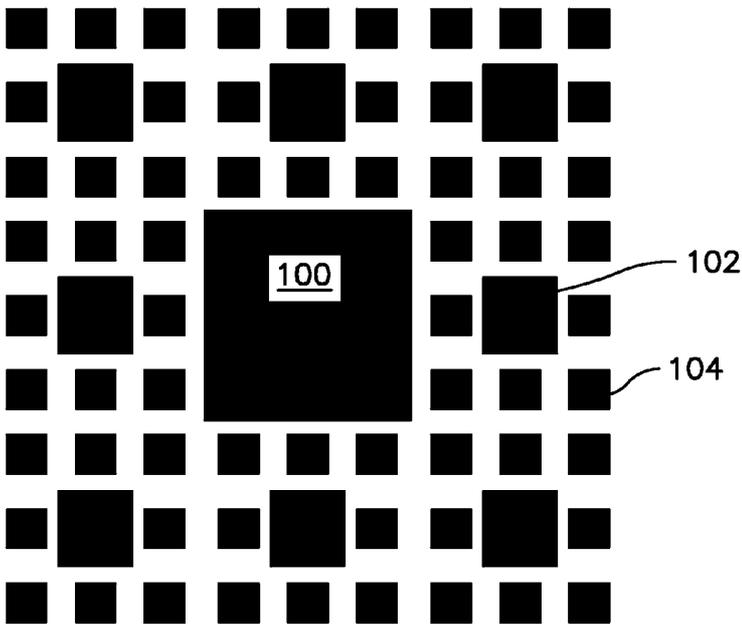
**FIG. 1**



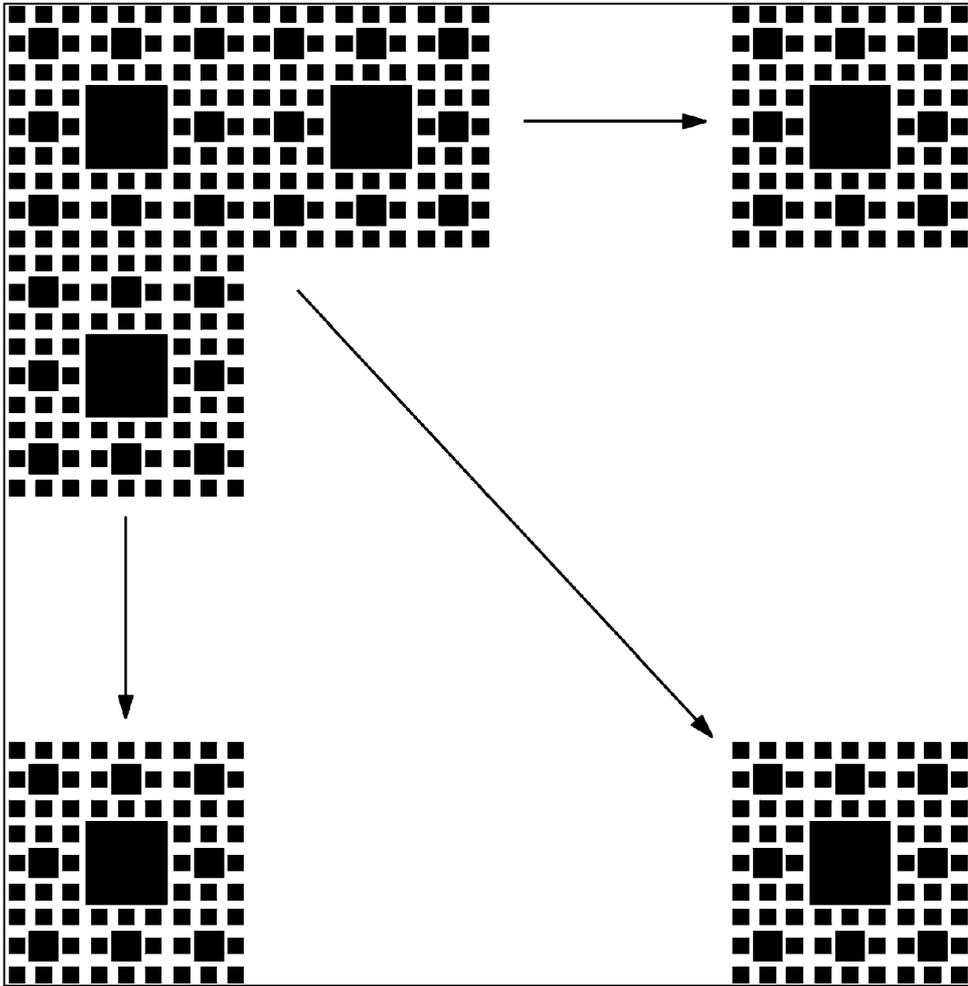
**FIG. 2**



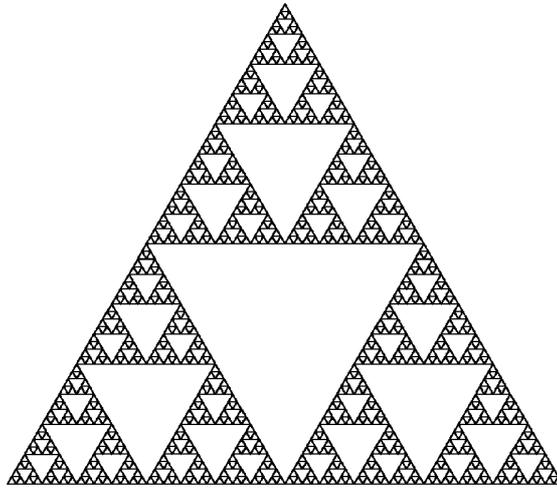
**FIG. 3**



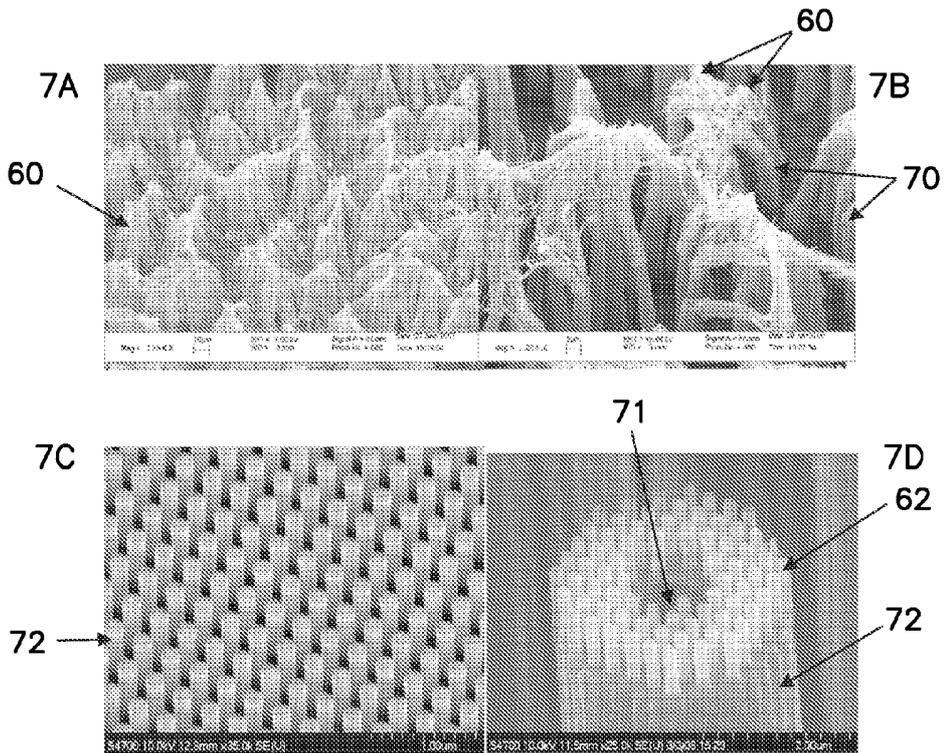
**FIG. 4**



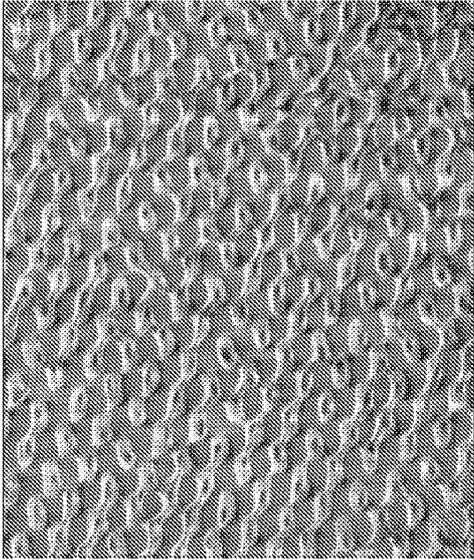
**FIG. 5**



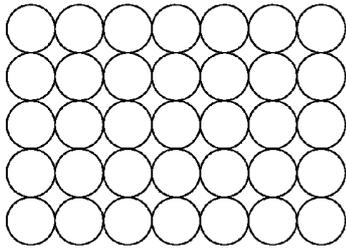
**FIG. 6**



**FIG. 7**

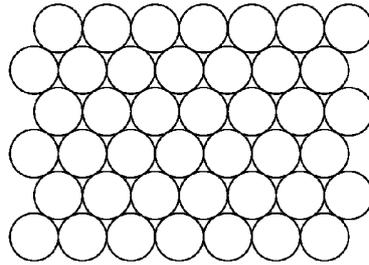


**FIG. 8**



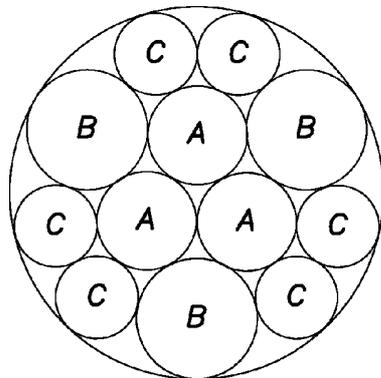
*empacotamento quadrado*

**FIG. 9A**

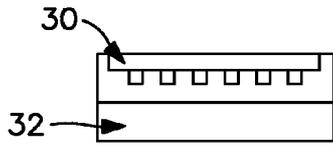


*empacotamento hexagonal*

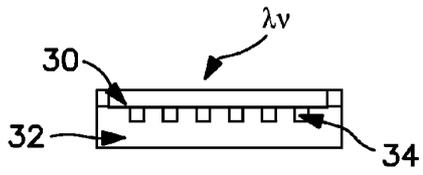
**FIG. 9B**



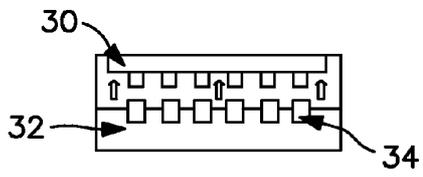
**FIG. 9C**



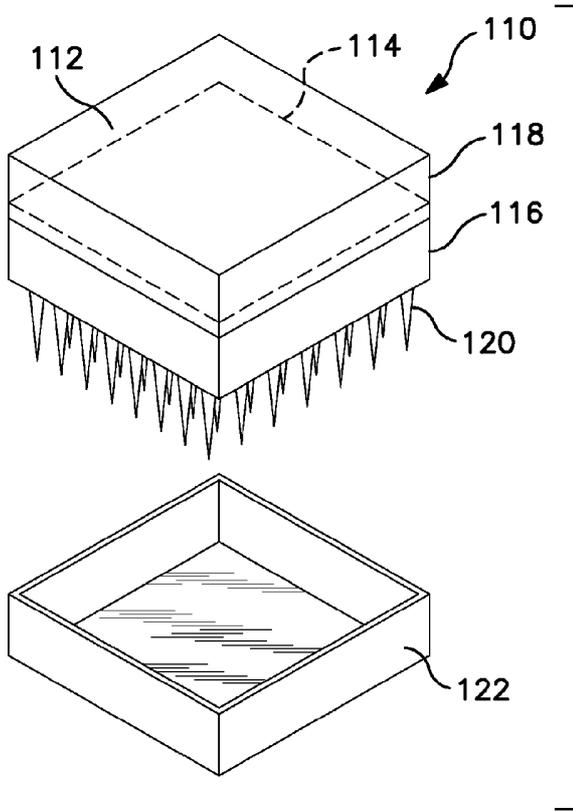
**FIG. 10A**



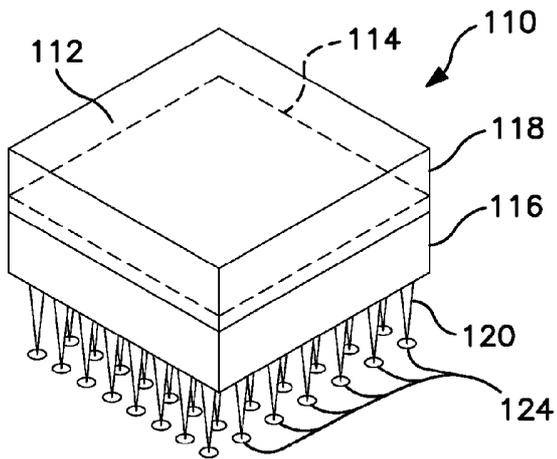
**FIG. 10B**



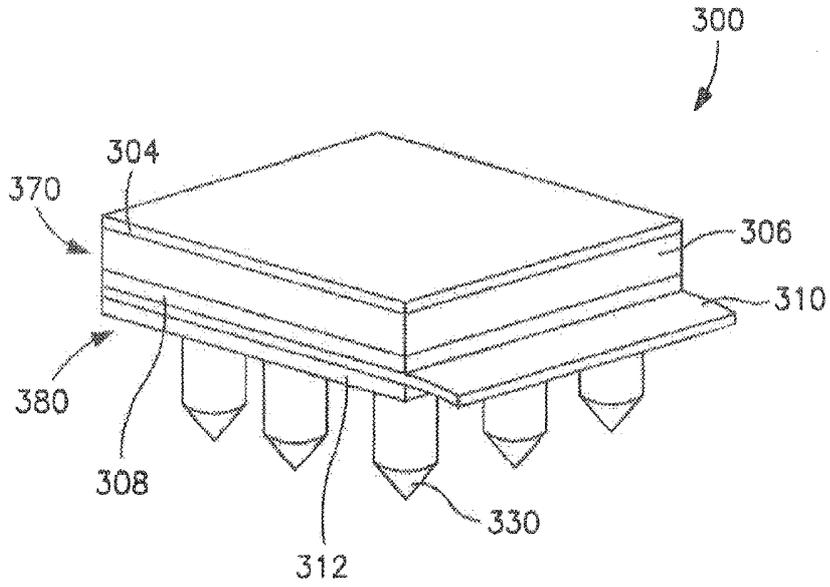
**FIG. 10C**



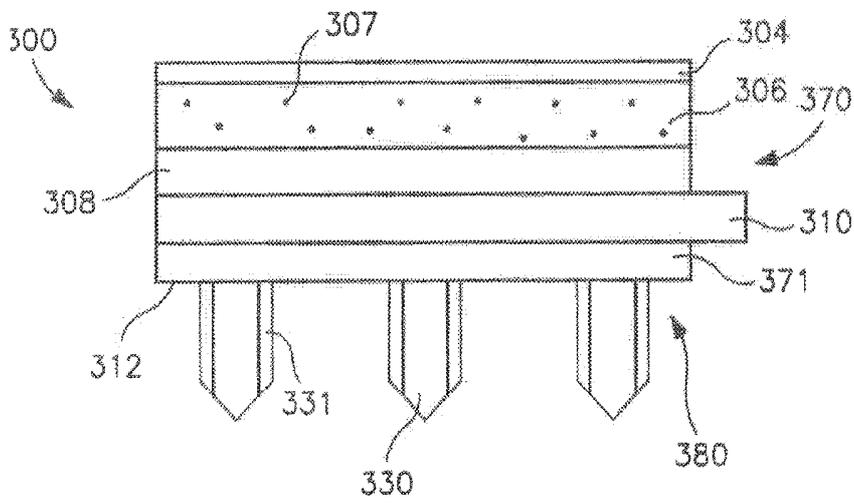
**FIG. 11A**



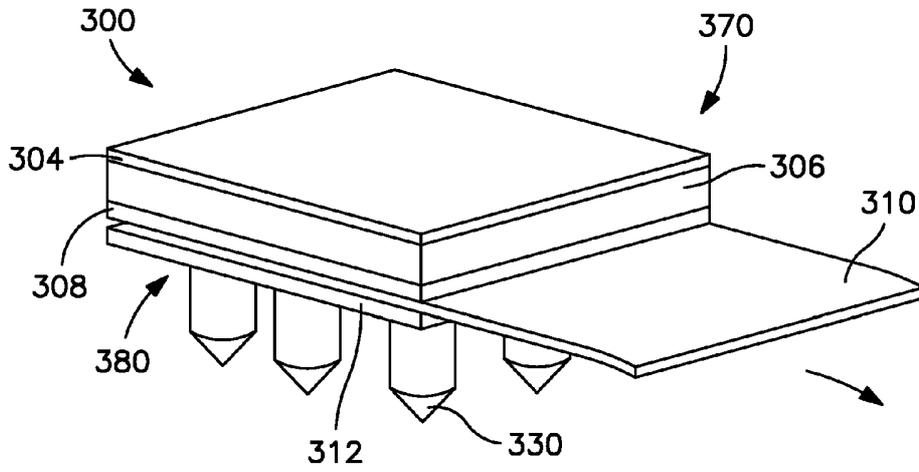
**FIG. 11B**



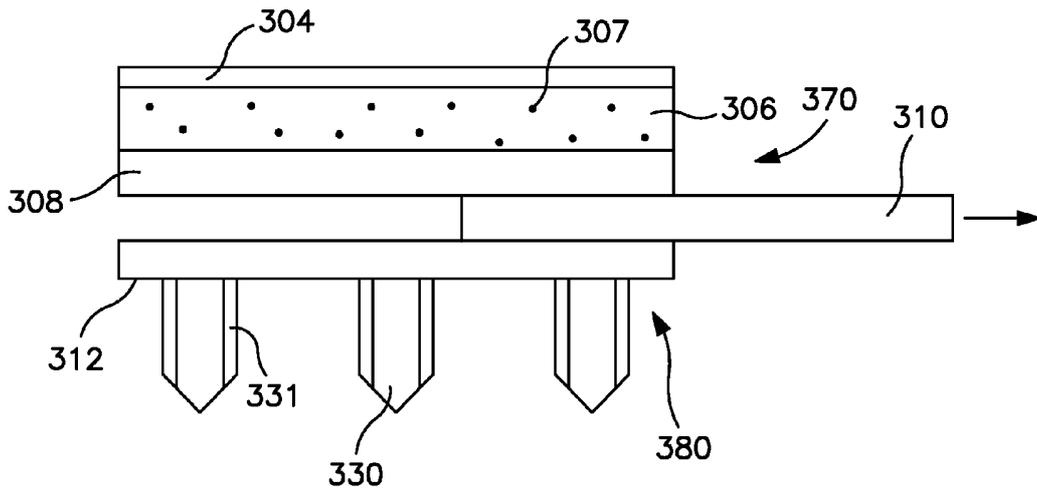
**FIG. 12**



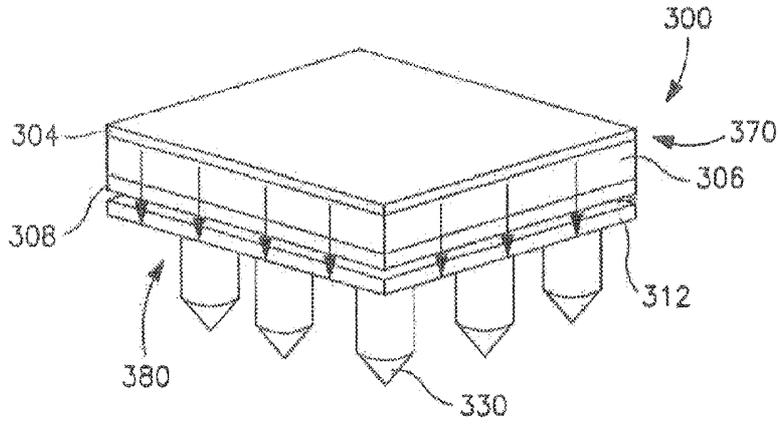
**FIG. 13**



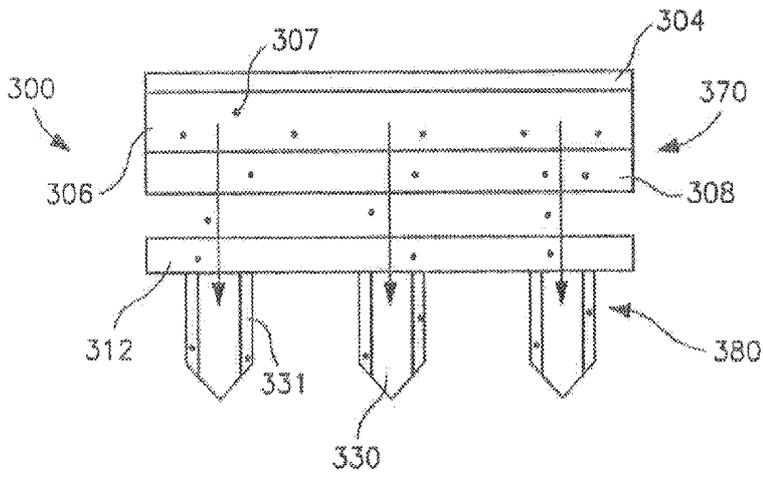
**FIG. 14**



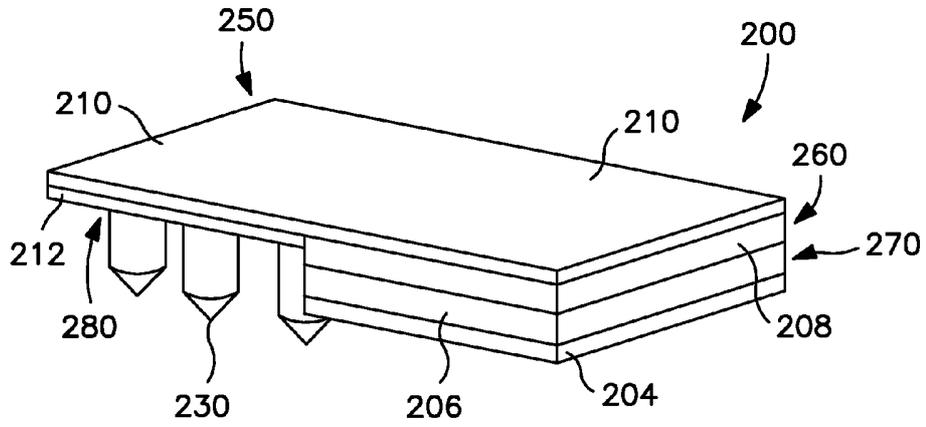
**FIG. 15**



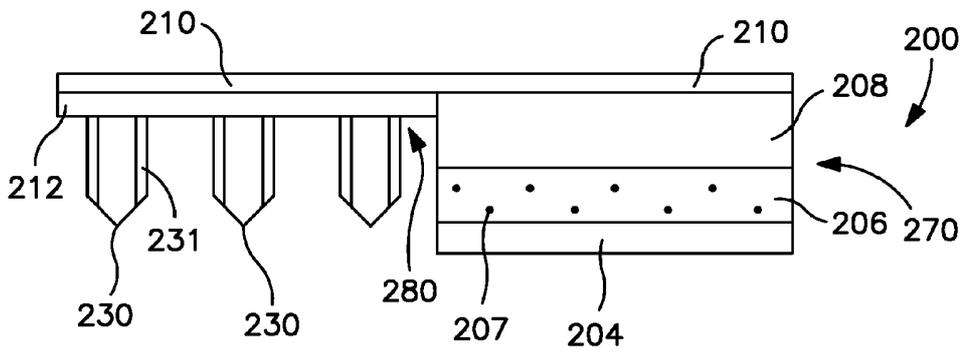
**FIG. 16**



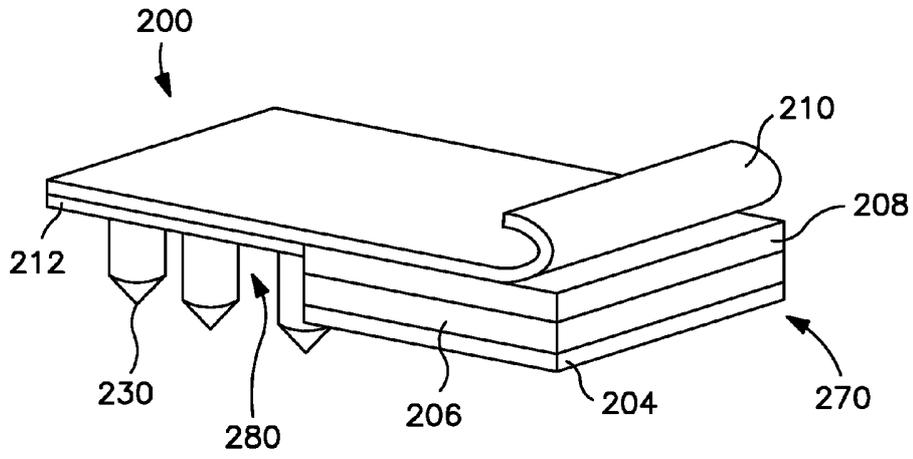
**FIG. 17**



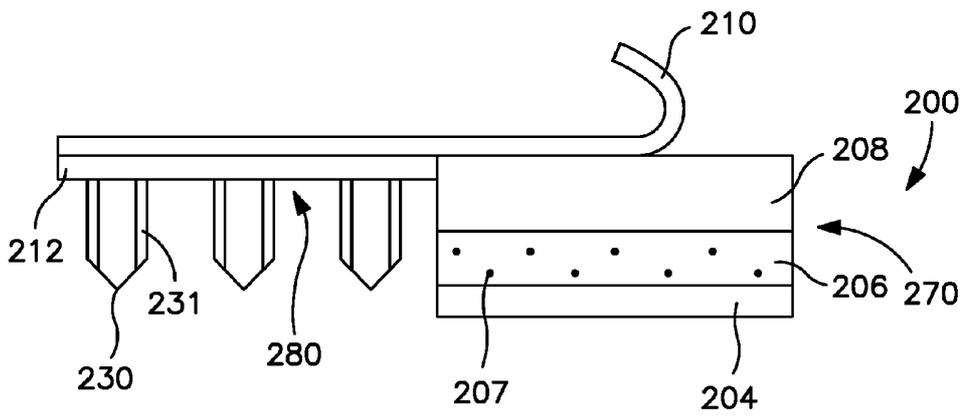
**FIG. 18**



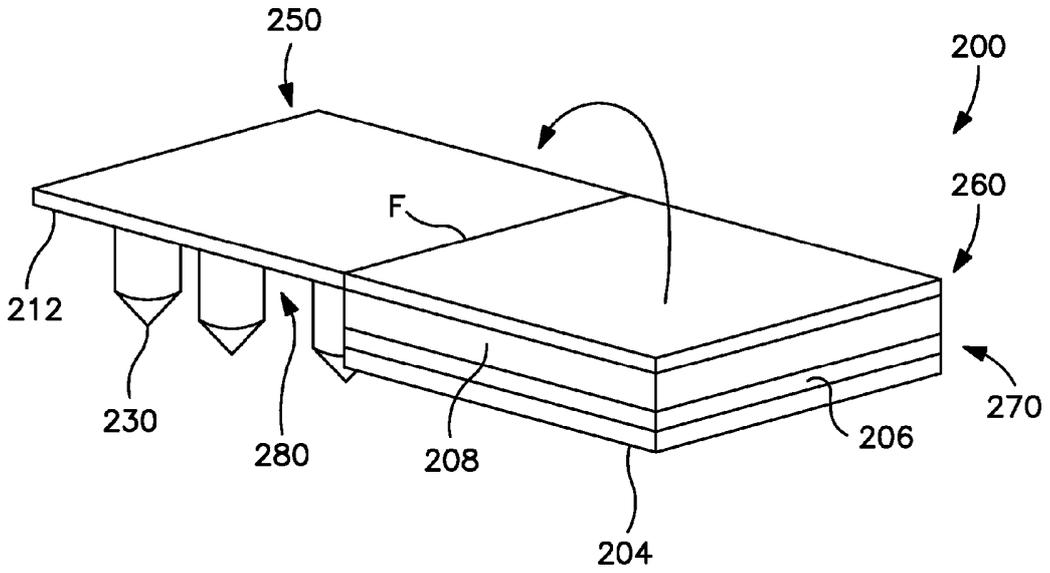
**FIG. 19**



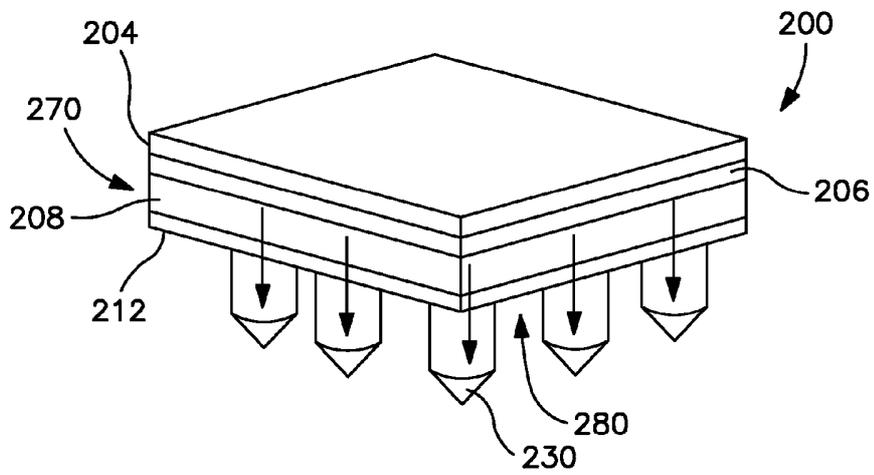
**FIG. 20**



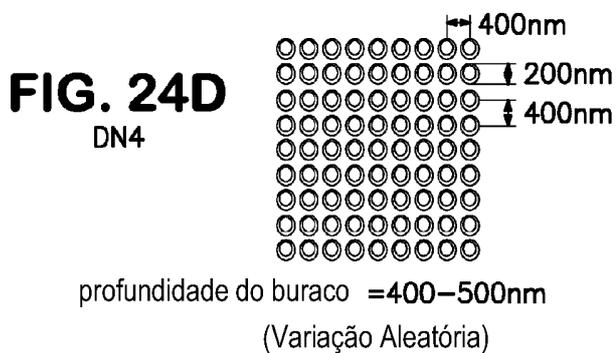
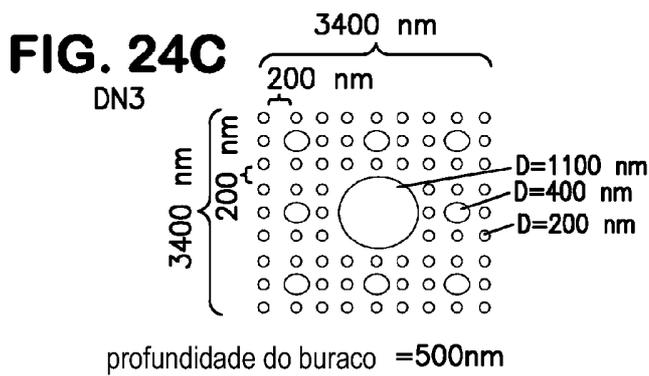
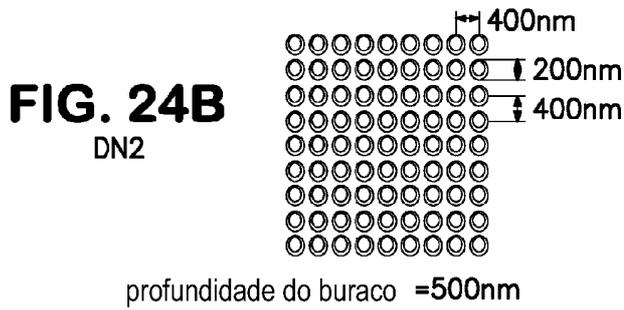
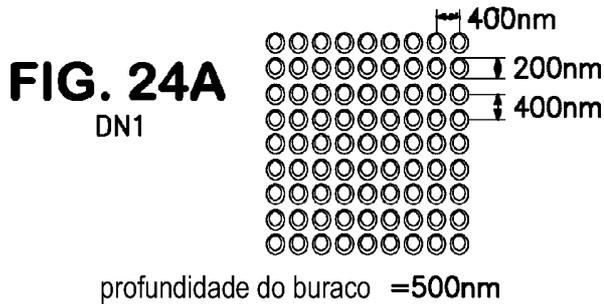
**FIG. 21**



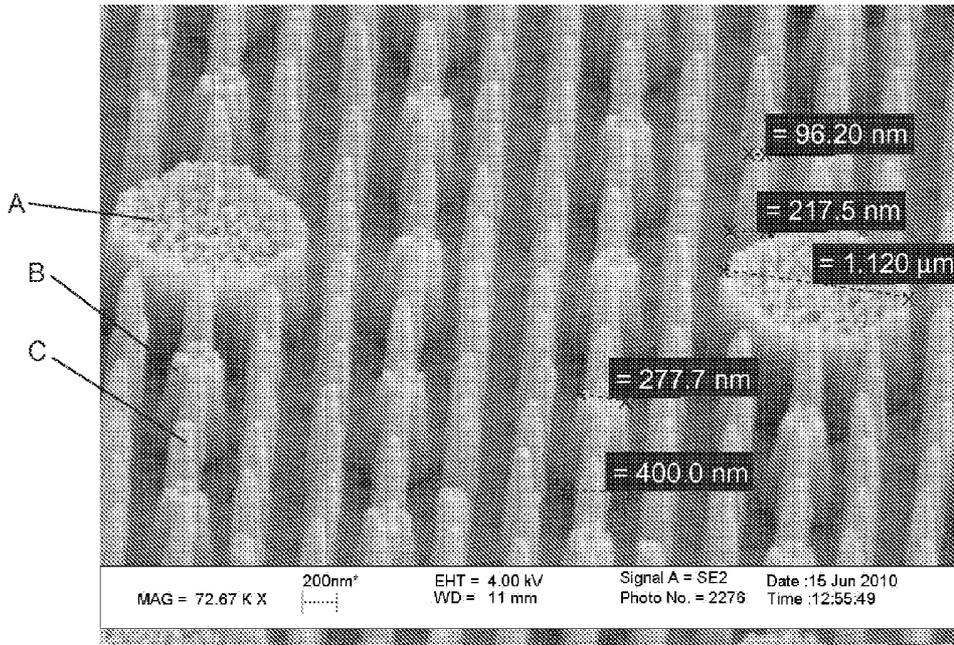
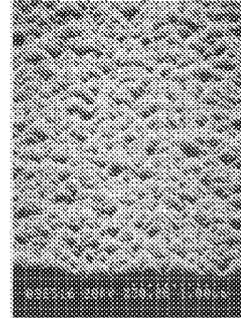
**FIG. 22**



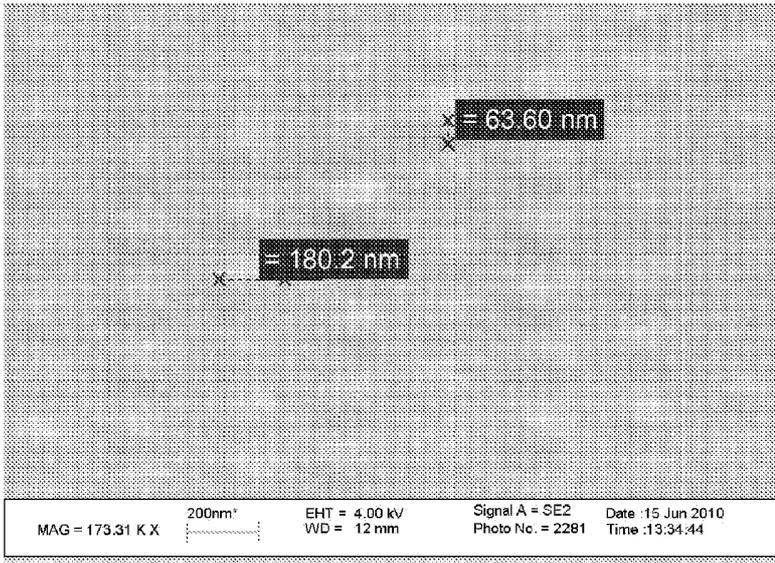
**FIG. 23**



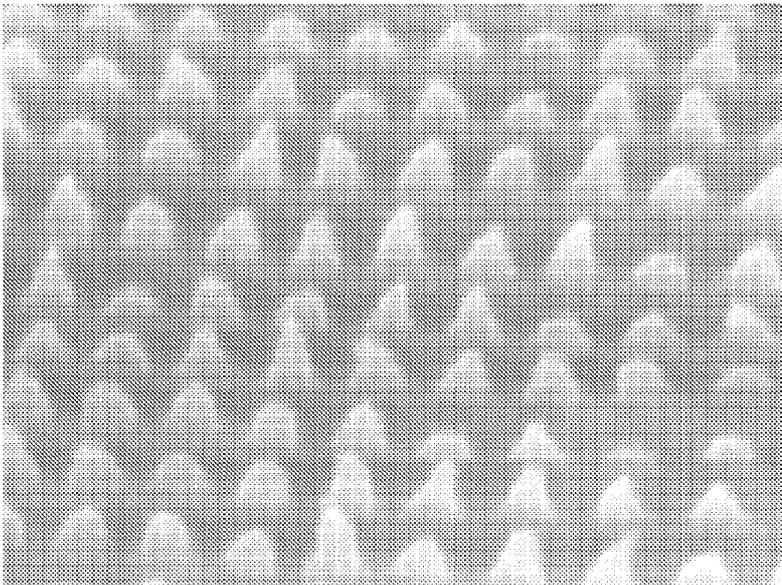
**FIG. 24E**  
NTTAT2



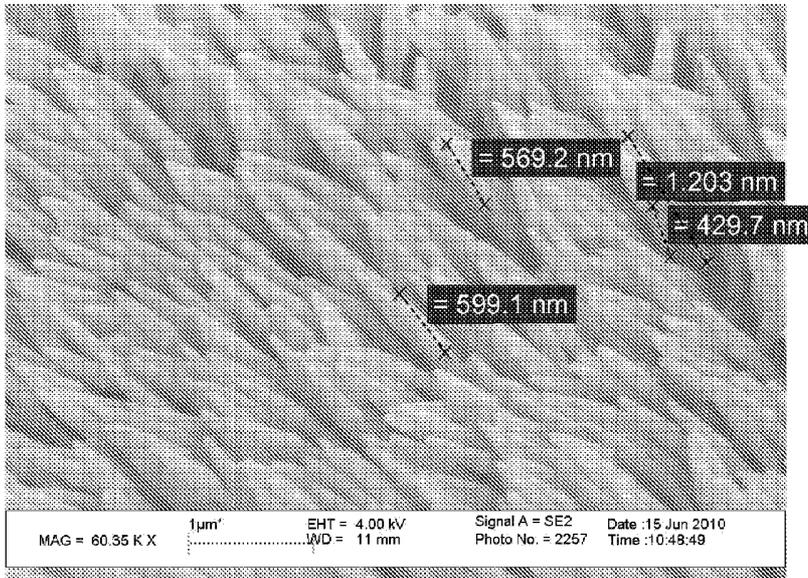
**FIG. 25**



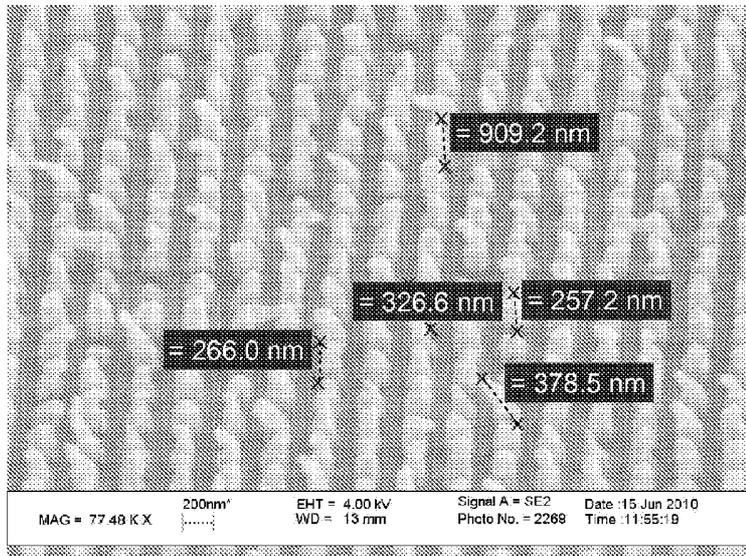
**FIG. 26A**



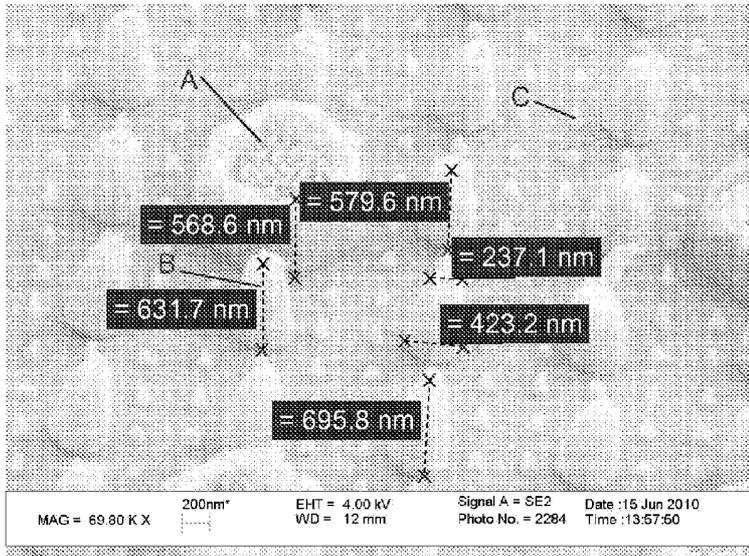
**FIG. 26B**



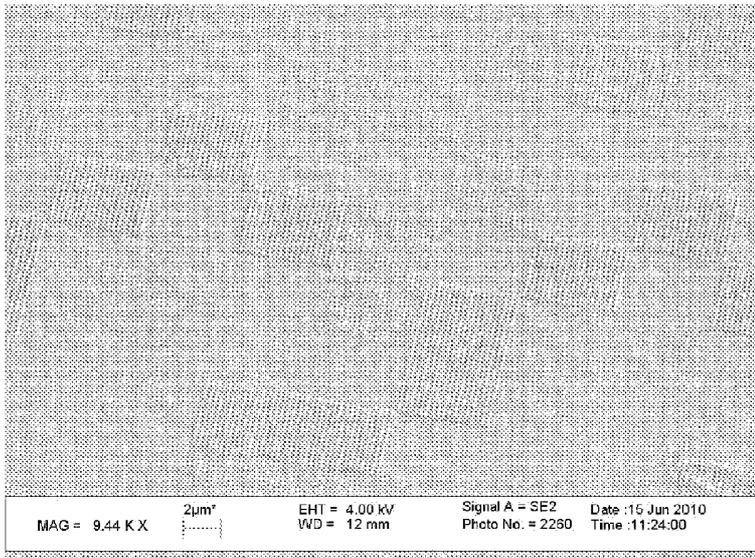
**FIG. 27**



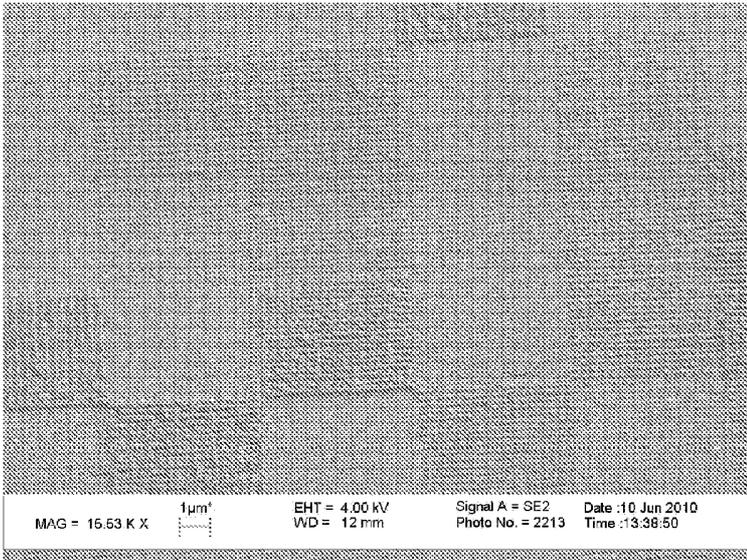
**FIG. 28**



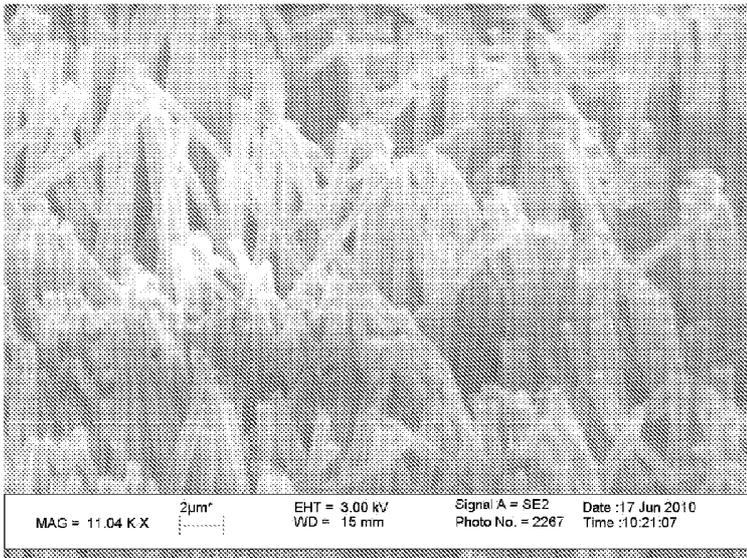
**FIG. 29**



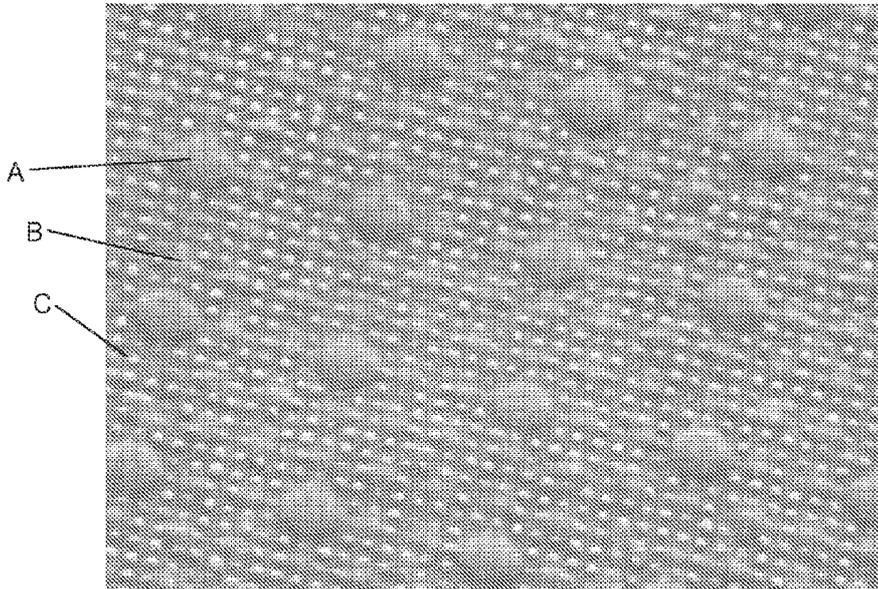
**FIG. 30**



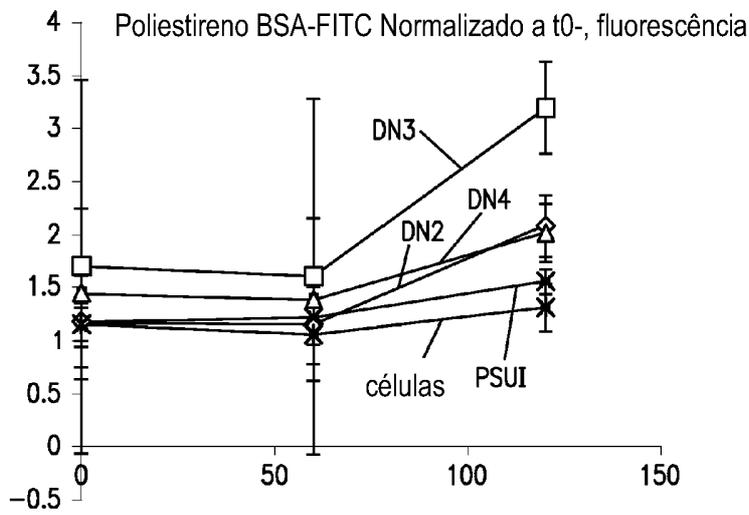
**FIG. 31**



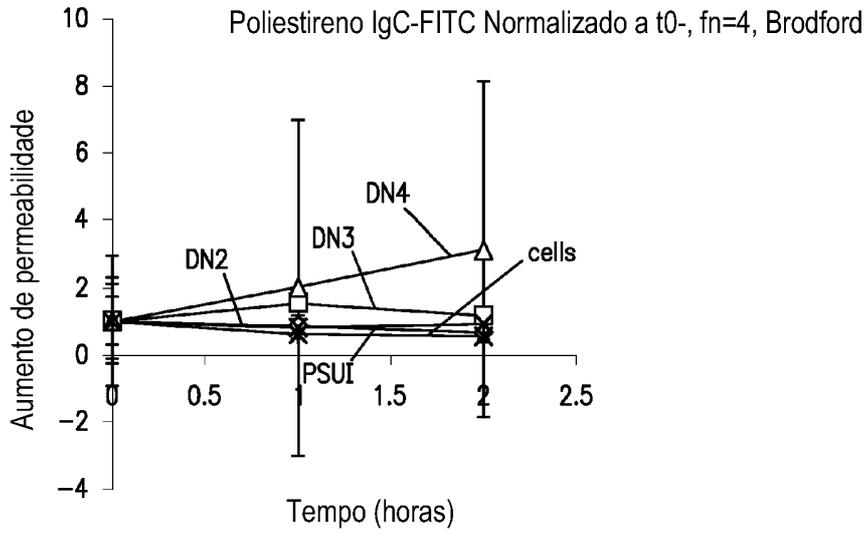
**FIG. 32**



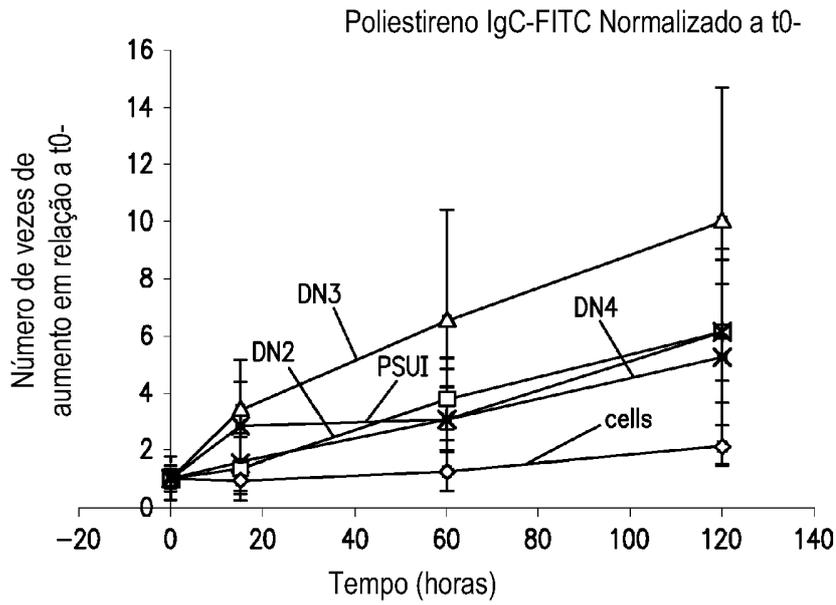
**FIG. 33**



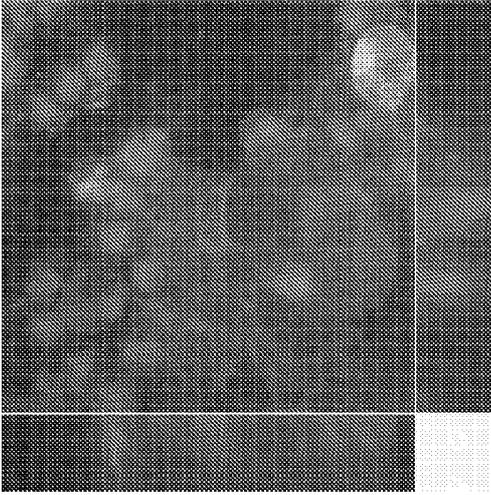
**FIG. 34**



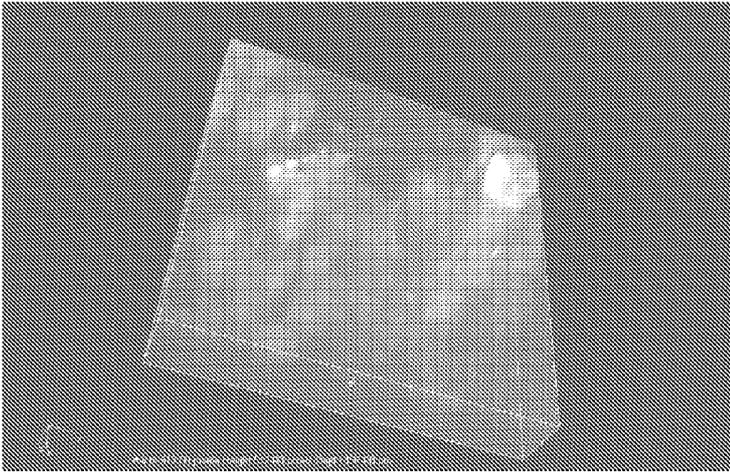
**FIG. 35A**



**FIG. 35B**

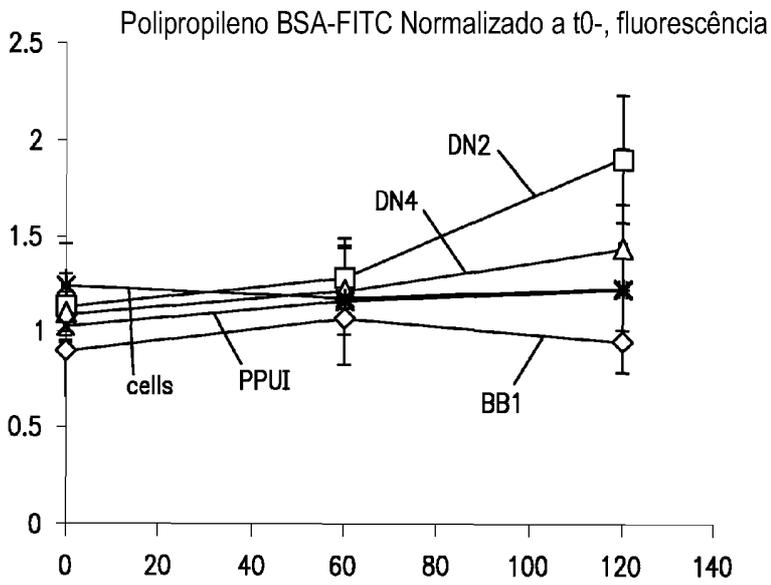


36A

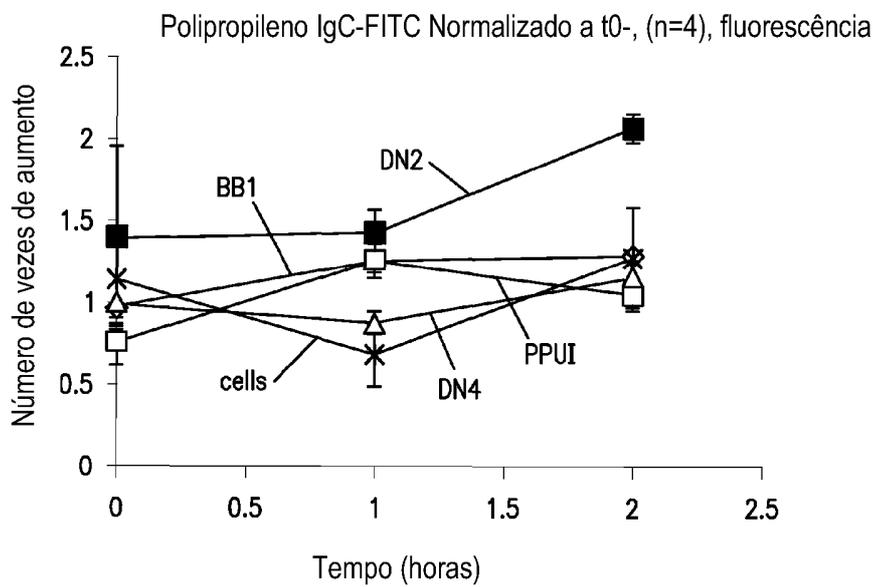


36B

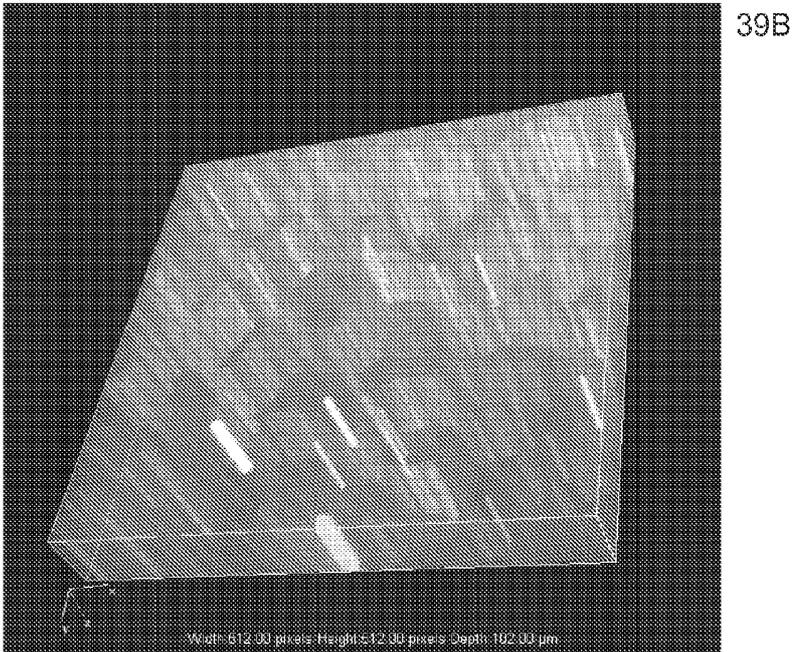
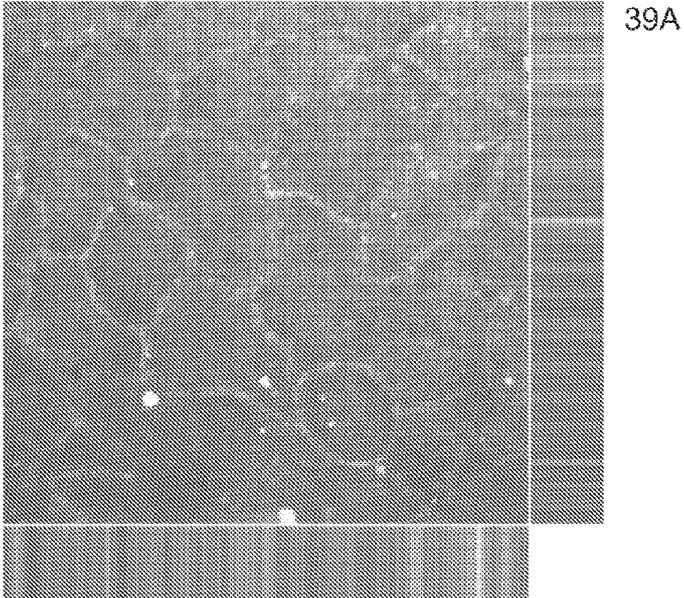
**FIG. 36**



**FIG. 37**

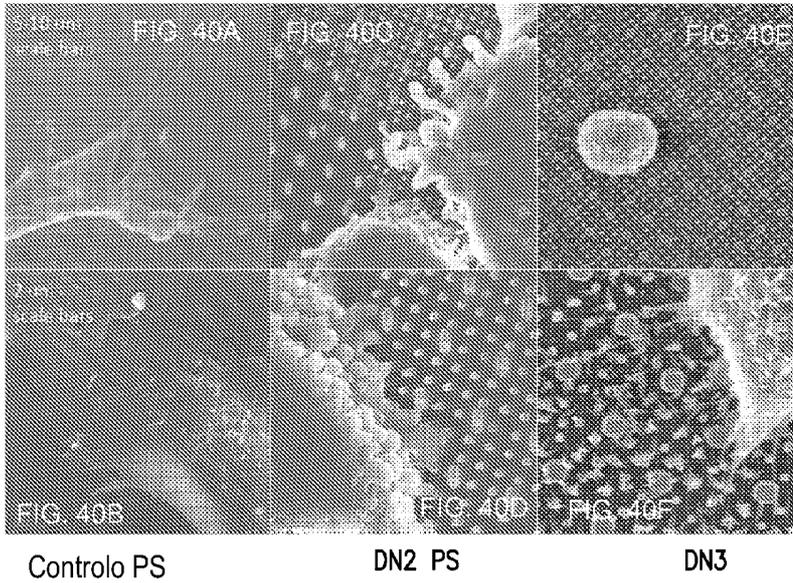


**FIG. 38**

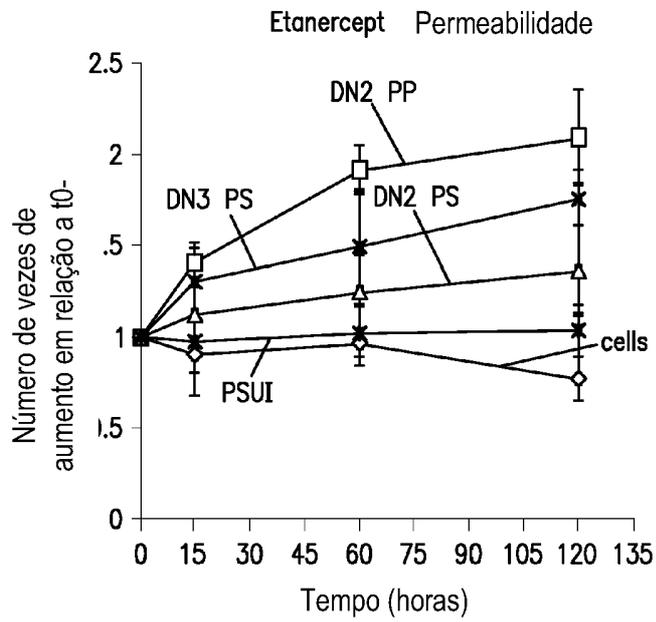


**FIG. 39**

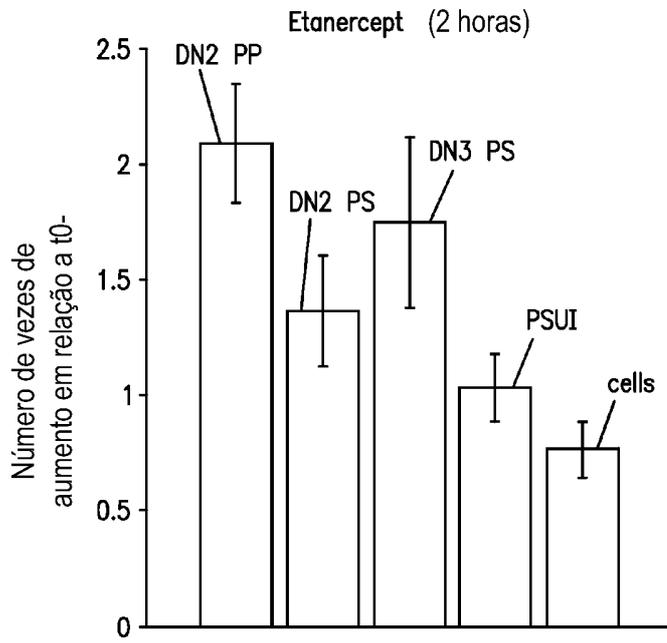
Microscopia Electrónica de Varrimento



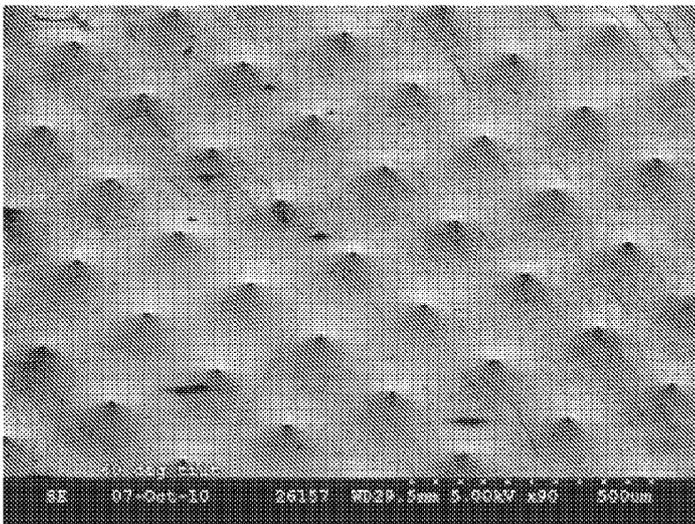
**FIG. 40**



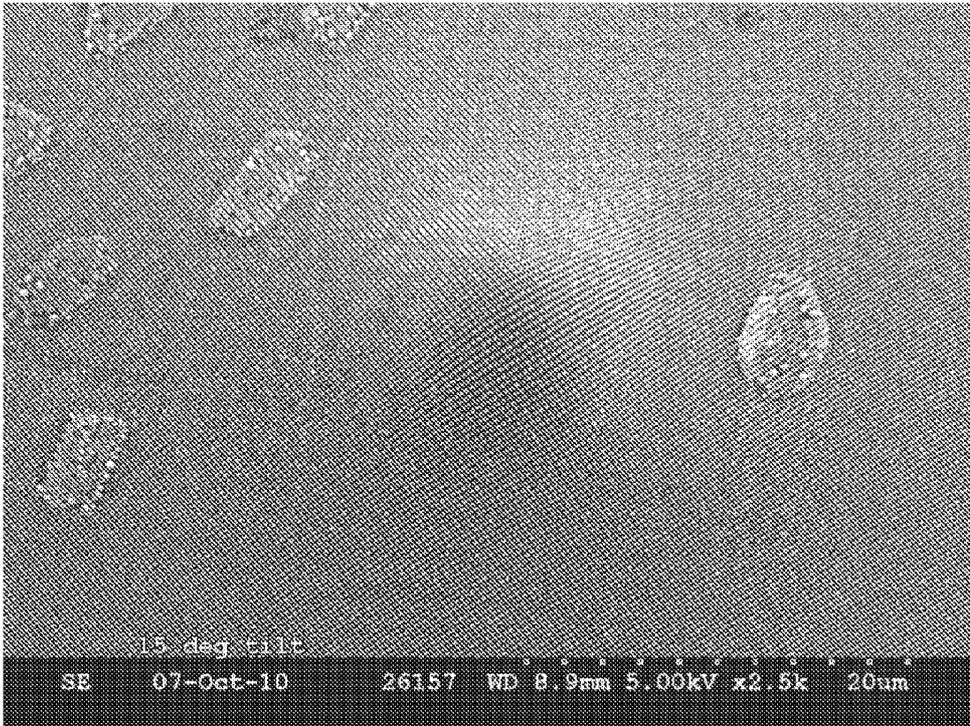
**FIG. 41**



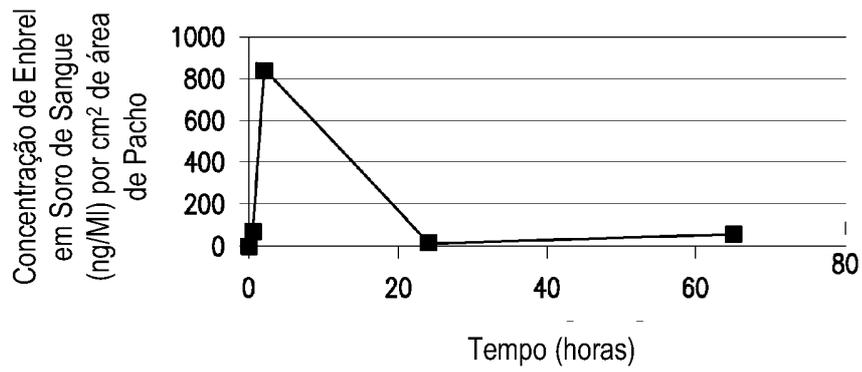
**FIG. 42**



**FIG. 43**



**FIG. 44**



**FIG. 45**

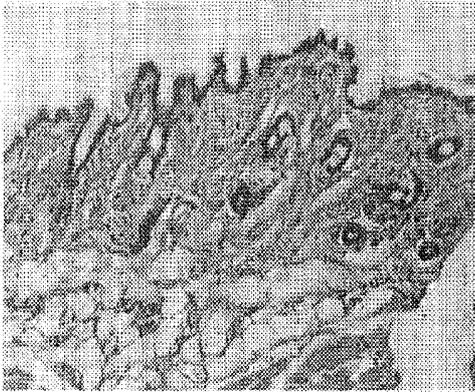


FIG. 46A

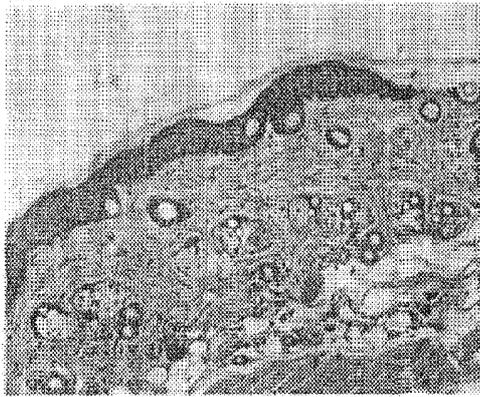


FIG. 46B

Perfil de Concentração vs. Tempo num Coelho Individual

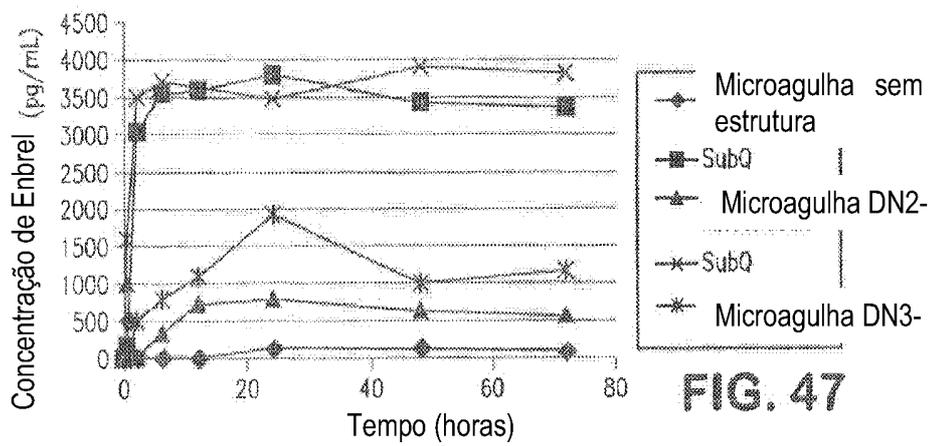


FIG. 47