



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 689 29 508 T2** 2004.09.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 121 896 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 29 508.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 110 555.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.01.1989**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **17.12.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.09.2004**

(51) Int Cl.7: **A61B 5/00**
A61N 1/30

(30) Unionspriorität:

150159	29.01.1988	US
299397	24.01.1989	US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of California,
Berkeley, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Schneiders & Behrendt Rechts- und
Patentanwälte, 44787 Bochum**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

**Glikfeld, Peretz, Ness-Ziona 70400, IL; Cullander,
Christopher, Berkley, California 94704, US; Hinz,
Robert S., Mill Valley, California 94941, US; Guy,
Richard H., 74166 Archamps, FR**

(54) Bezeichnung: **Device zum kontinuierlichen Nachweis des Gehaltes eines bioaktiven Materials**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Entnahme Glucose durch die intakte Haut eines lebenden Säugetiers.

BESCHREIBUNG DES VERWANDTEN STANDES DER TECHNIK

In-vitro Probenentnahme

[0002] C. C. Peck et al., Pharmacology Skin, Bd. 1, S. 201–208, herausgegeben bei Karger, Basel, Schweiz 1987, beschreiben ein Verfahren zur in-vitro Bestimmung der transdermalen Wanderung von Theophyllin nach außen, unter Anwendung eines passiven transdermalen Sammelsystems (TCS). Die Anwendung elektrischer Verstärkung für die Wanderung ist nicht angegeben.

[0003] R. R. Bumette et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Bd. 75, Nr. 8, S. 738–743, veröffentlicht im August 1986, beschreiben unter Anwendung der Standard-Diffusionszelle, einen Vergleich zwischen dem iontophoretischen und passiven in-vitro Transport von Thyrotropin-Releasing-Hormone (TRH) über die ausgeschnittene nackte Mäusehaut. Die Ergebnisse zeigen, daß die TRH-Ströme sowohl mit als auch ohne Ladung über das ausgeschnittene Gewebe stärker waren, als die durch passive Diffusion allein erzielten.

[0004] Bei der Standard-Anordnung (Stand der Technik) für in-vitro iontophoretische Untersuchungen (s. **Fig. 6**) sind die beiden Hälften einer Diffusionszelle horizontal Seite-an-Seite angeordnet, so daß die Haut sich senkrecht dazwischen befindet, wobei die Epidermis-Seite einer Hälfte gegenüber liegt und die innere Seite der anderen. Die biologisch aktive Zubereitung und die aktive Elektrode werden in der "epidermalen" Hälfte der Zelle angeordnet und die andere Hälfte der Zelle enthält die passive Elektrode in einer leitenden Flüssigkeit.

[0005] Diese Seite-an-Seite-Anordnung besitzt verschiedene Nachteile und Beschränkungen. Da die passive Elektrode sich in der Wirkung "im Inneren" der Haut befindet, ist diese Anordnung kein gutes Modell für den in-vivo Fall. Die Faktoren, die eine solche nicht-physiologische Situation beeinflussen, sind nicht so, daß sie im klinischen Fall von Bedeutung sind. Außerdem treten Fragen auf, die mit einer Seite-an-Seite-Konfiguration nicht untersucht werden können, wie die Möglichkeit des horizontalen Transports (d. h. innerhalb der Hautschichten und nicht senkrecht durch die Haut) und ob ein iontophoretisch "getriebenes" Arzneimittel durch die passive Elektrode aus der Haut "zurückgezogen" wird.

[0006] Eine bekannte iontophoretische Abgabevorrichtung für Arzneimittel, der Phoresor, wird verkauft von Motion Control Inc., 1290 West 2320 South, Suite A, Salt Lake City, Utah 84119.

In-vitro-Abgabe

[0007] In Modellstudien ist die Iontophorese geeignet, den chemischen Transport geladener Materialien durch eine Membran, etwa eine entnommene Hautprobe, zu untersuchen. Beispielsweise beschreiben N. H. Belantone et al. in International Journal of Pharmaceutics, Vol. 30, pp 63 bis 72, veröffentlicht 1986, eine Diffusionszellenanordnung und Elektrodenkonfiguration Seite an Seite nach dem Stand der Technik für verschiedene Systeme, die für die Iontophorese von Benzoesäure (als Modellverbindung) verwandt wird (siehe **Fig. 6**). Bei der Zellanordnung Seite an Seite bestehen einer Reihe von Limitierungen, wie sie hier näher diskutiert werden.

In-vivo Abgabe

[0008] Iontophorese ist der elektrisch verstärkte Transport von geladenen Substanzen, üblicherweise biologisch aktiven Materialien. Das Verfahren ist ein bekanntes Mittel zur transdermalen Abgabe von Arzneimitteln. Zum Beispiel beschreibt die US 4 141 359 von S. C. Jacobsen et al. eine verbesserte Iontophorese-Vorrichtung zur topischen Verabreichung von ionischen Arzneimitteln oder Chemikalien durch das Epidermis-Gewebe ohne mechanisches Eindringen. Diese Vorrichtung weist positive und negative Elektroden auf, die an getrennten Stellen an der Haut angelegt sind. Die ionische Form des Arzneimittels wird zu der entsprechenden Elektrode zugegeben und in und durch das Epidermis-Gewebe geleitet durch Gleichstrom von einer Energiezufuhr. Eine Anzahl von Problemen tritt bei dieser Art der Verabreichung auf, bei der die Elektroden getrennt sind.

In-vivo Entnahme

[0009] Es besteht ein anerkannter und bedeutender Bedarf, biologisch aktive Substanzen in dem Körper (typischerweise im Blut) zu sammeln bzw. zu entnehmen und quantitativ zu bestimmen. Z. B. kann es entschei-

dend sein, das Vorhandensein einer endogenen biochemischen Schlüsselsubstanz zur Diagnose einer Krankheit zu überwachen, oder es kann wichtig sein, den Blutgehalt an einem verabreichten Arzneimittel bei einer chemotherapeutischen Behandlung zu verfolgen und dadurch zu optimieren. Üblicherweise wird die erwünschte Bestimmung erreicht durch Analyse einer Blutprobe, die invasiv über eine eingeführte Nadel in ein Probenröhrchen abgezogen worden ist.

[0010] Die passive transdermale Entnahme von Theobromin in-vivo ist auch angegeben von C. C. Peck et al., 1987, s. o. Es ist jedoch keine Verstärkung der Wanderung durch elektrischen Strom angegeben.

[0011] Es wurde keine Literatur gefunden, die ein im wesentlichen nicht-invasives Verfahren zur Entnahme von biologischem Material aus dem systemischen Kreislauf beschreibt. Es erfordert die einzigartige Anwendung von Iontophorese, um systemisch umlaufende Moleküle in eine Sammelvorrichtung, die sich auf der Oberfläche der Haut befindet, zu "extrahieren". Die vorliegende Erfindung umfaßt kein Einstechen in die Haut oder irgendein Blutgefäß.

Biosensorische in-vivo Untersuchung

[0012] Es besteht Bedarf, bestimmte biochemische Schlüsselp Parameter bei klinischen Patienten kontinuierlich oder nicht-kontinuierlich zu überwachen, sowie an neuen medizinischen Vorrichtungen, um quantitative Werte in Echtzeit online zu erhalten. Ein Biosensor ist eine mikroelektronische Vorrichtung, bei der biologisch aktive Moleküle als "abtastende", signalüberleitende Elemente verwendet werden.

[0013] K. W. Hunter Jr., Archives of Pathological Laboratory Medicine, Bd. III, S. 633–636, veröffentlicht Juli 1987, beschreibt in allgemeiner Form den Bereich an Vorrichtungen und die physikalischen Eigenschaften, die untersucht werden. Hunter gibt auch ein allgemeines Diagramm für ein transdermales Dosimeter an. Diese Veröffentlichung gibt nicht die erforderlichen zusätzlichen speziellen Informationen, um ein funktionierendes biologisch-abtastendes Feedback-Arzneimittel-Abgabesystem zu entwickeln.

[0014] C. C. Peck et al., Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Bd. 9, Nr. 1, S. 41–58, veröffentlicht 1981, diskutieren die Anwendung einer kontinuierlichen transdermalen Probenentnahme (CTDC) zur Abschätzung der Aufnahme von Arzneimitteln und der Pharmakokinetik. Es wurde gefolgert, daß, wenn der Rücktransfer minimal gehalten wird, CTDC ein geeignetes Werkzeug sein kann, um die Arzneimittel-Exposition usw. abzuschätzen, aber nur geringe Vorteile bietet gegenüber der getrennten Sammlung bzw. Entnahme anderer Körperflüssigkeiten bei der Untersuchung anderer Aspekte der Kinetik der Arzneimittel-Disposition.

[0015] US-Patentschriften von Interesse umfassen die 4 329 999, 4 585 652, 4 708 716, 4 689 039, 4 702 732, 4 693 711, 4 717 378, 4 756 314, 4 699 146, 4 700 710, 4 706 680, 4 713 050, 4 721 111, 4 602 909, 4 595 011, 4 722 354, 4 722 726, 4 727 881, 4 731 049, 4 744 787, 4 747 819, 4 767 401.

[0016] Y. B. Bannon, EP-Anmeldung 252 732 (13. Januar 1988), betreffend ein transdermales Arzneimittel-Abgabesystem, ist von allgemeinem Interesse.

[0017] Druckschriften von Interesse umfassen:

[0018] W. Scharaman et al., "The Commercialization of Biosensors", MD&GI, S. 52–57, veröffentlicht November 1987.

[0019] A. F. Turner et al., "Diabetes Mellitus: Biosensors for Research and Management", Biosensors, Bd. 1 S. 85–115, Hrsg. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., England, 1985.

[0020] Y. Ikarlyaman et al., Proc. Electrochem. Soc., 1987, 87–89 (Proc. Symp. Chem. Sens.) 378. CA 107(22); 207350n.

[0021] P. H. S. Tso et al., Anal. Chem. 1987, 59 (19), 2339, CA 107(14); 1262448.

[0022] H. Wollenberger et al., K. Anal. Lett., 1987, 20(5), 857, CA 107(9); 73551.

[0023] P. J. Conway et al., D. A. Sens. Actuators, 1987, II(4), 305, CA 107(5); 36151.

[0024] M. Mascini et al., Clin. Chem., (Winstom-Salem, NC) 1987, 33 (4), 591 CA 107 (5); 35851 h.

[0025] I. Hanning et al., Anal. Lett., 1988 19(3–4) 461, CA 105(6); 48993q.

[0026] M. Shirchir et al., Diabetes Care, 1986, 9(3), 298, CA 105(5); 38426t.

[0027] S. J. Churchouse et al., Anal. Proc. (London) 1986, 2395, 146 CA 105(3); 21117v.

[0028] D. A. Gough et al., Anal. Chem., 1985, 67(12), 2351, CA 103(15); 11925a.

[0029] C. Loo et al., Chem. Eng. Sci., 1985, 40(5), 873 CA 103(5); 34337a.

[0030] US 3 794 910 offenbart ein Iontophorese-Gerät zum Transport von Pinocarpin in einen Patienten, um örtlich begrenztes Schwitzen hervorzurufen. Zwei einzelne Elektroden werden an den Arm des Patienten geschnallt. Eine Elektrode ist mit einer Pilocarpin-Nitrat-Lösung gefüllt, welche von einer angelegten Gleichspannung in den Patienten gezwungen wird.

[0031] EP 00 604 51 offenbart eine Iontophoresische Elektrode zum Transport von beispielsweise Pilocarpin in einen Körper. Die Elektrode umfaßt ein adhäsives Material, mit welchem die zu transportierende Substanz vermengt ist und mit dem die Kontaktfläche der Elektrode beschichtet ist.

[0032] Es ist erstrebenswert, eine Methode zur Verfügung zu haben, mit welcher Substanzen (geladen oder neutral) aus der Haut oder Substanzen (geladen oder neutral) aus der intakten Haut eines Säugetiers entom-

men werden können. Die vorliegende Erfindung schafft eine solche Methode.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0033] Die Erfindung schafft eine Probenvorrichtung gemäß Anspruch 1.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0034] **Fig. 1** zeigt eine isometrische Ansicht der in-vitro Diffusions-Zellen-Konfiguration als Modell für die iontophoretische Entnahme einer geladenen oder neutralen Substanz.

[0035] **Fig. 2** zeigt einen Schnitt durch die Modell-Diffusionszelle der **Fig. 1** entlang der Linie 2-2.

[0036] **Fig. 3** zeigt einen auseinandergezogenen Schnitt durch die Diffusionszelle der **Fig. 2**.

[0037] **Fig. 4** zeigt einen auseinandergezogenen Schnitt durch die Zelle der **Fig. 2**, bei der festes Glas der Isolator in dem unteren Reservoir ist, der die Elektroden trennt. **Fig. 4** zeigt auch das zirkulierende System für die Rezeptor-Flüssigkeit.

[0038] **Fig. 5A bis 5H** zeigen einen Schnitt durch eine Anzahl von Konfigurationen für die positive Elektrode, die negative Elektrode und Isolierungen dazwischen, entlang der Linie 5A-5A der **Fig. 1** am Boden des oberen Teils der Diffusionszelle.

[0039] **Fig. 6** zeigt eine isometrische Ansicht der bekannten Seite-an-Seite-Iontophorese-Zelle.

[0040] **Fig. 7** zeigt eine isometrische Ansicht einer Iontophorese-Zelle, wie sie zur in-vivo-Probenentnahme eines biologisch aktiven Moleküls aus einem menschlichen Patienten angewandt wird.

[0041] **Fig. 8** zeigt einen Schnitt durch die Diffusionszelle der **Fig. 7** entlang der Linie 8-8.

[0042] **Fig. 9A und 9B** zeigen eine Iontophorese-Diffusionszelle der **Fig. 7** oder **8** in einer Ansicht von oben und von unten.

[0043] **Fig. 10** zeigt einen Schnitt eines Iontophorese-Versuchs, wobei die Elektroden voneinander getrennt sind.

[0044] **Fig. 11** zeigt die iontophoretische in-vitro-Entnahme von Clonidin unter Anwendung einer Diffusionszelle der **Fig. 1, 2** oder **3**.

[0045] **Fig. 12** zeigt die iontophoretische in-vitro-Entnahme von Theophyllin unter Anwendung einer Diffusionszelle der **Fig. 1, 2** oder **3**.

[0046] **Fig. 13** zeigt ein Meerschweinchen, an dem die einzelnen Elektroden angeschlossen sind, um eine Probe einer geladenen oder neutralen Substanz zu entnehmen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG UND IHRER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Begriffsbestimmung

[0047] Hier wird verwendet:

[0048] "Diffusionszelle" benennt ein elektrisches System zur Iontophorese. Das System kann eine positive Elektrode, eine negative Elektrode und eine elektrische Isolation dazwischen umfassen. Das System kann auch eine positive Leitung, eine elektrische Isolierung und eine Erdung sein.

[0049] "Säugetier" bezeichnet die üblichen Labortiere, die für Versuche verwendet werden, wie Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Affen u. ä. Der Ausdruck kann auch Hunde, Katzen, Rinder, Schafe, Pferde u. ä. umfassen. Ein bevorzugtes Säugetier ist ein Mensch.

[0050] "Membranoberfläche" bezeichnet entweder eine dünne Membran wie ausgeschnittene Haut, synthetische Membranen, Schleimhautmembranen oder die Oberfläche der intakten Haut eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen.

[0051] Eine bevorzugte Ausführungsform der Elektroden umfaßt einen Metalldraht in Kombination mit einem Gel, das mit der Membranoberfläche in Kontakt steht.

Allgemeine Materialien und Methoden zur Probenentnahme

[0052] Biologisches Material oder biologische Materialien, die entnommen werden, umfassen irgend etwas, was sich in dem System eines lebenden Säugetiers findet, wie Abbauprodukte, Metallionen, Peptide, Hormone, Toxine und ähnliches. Es umfaßt sowohl neutrale Arten als auch solche, die eine Ladung tragen, oder zum Tragen einer Ladung gebracht werden können.

[0053] Bei der Entnahme-Elektrode ist das elektrisch leitende Gel KENZGELELC, erhältlich von NITTO Electric Industrial Co., Osaka, Japan.

[0054] Die Entnahme-Spannung liegt normalerweise zwischen etwa 0.1 und 15 Volt, vorzugsweise zwischen

etwa 1 und etwa 10 Volt und insbesondere bei etwa 5 Volt.

In-vitro-Entnahme

[0055] Beschreibung der Modellzelle: Es wird auf die **Fig. 1, 2, 3 und 4** Bezug genommen. Die iontophoretische Diffusionszelle **10**, als Modell zur in-vitro Entnahme ist so aufgebaut, daß sich eine Hälfte der Zelle **11** oberhalb der anderen Hälfte **12** befindet. Die ausgeschnittene Haut **13** liegt horizontal dazwischen, mit der Epidermis-Seite **14** der oberen Hälfte der Zelle gegenüber (s. **Fig. 1, 2 oder 3**). Die obere Hälfte der Zelle **11** ist durch zwei senkrechte Wände **15A** und **15B** in drei Kammern **16A, 16B** und **16C** unterteilt. Die beiden äußeren Kammern sind daher durch einen dazwischen liegenden Raum **16B** (die dritte Kammer) voneinander getrennt.

[0056] Die untere Hälfte der Zelle **12** enthält die Rezeptorflüssigkeit. Die Wände **15A** und **15B**, die die mittlere Kammer **16B** in der oberen Hälfte **11** bilden, setzen sich als Wände **15C** und **15D** in der unteren Hälfte der Zelle **12** fort, sind aber dann miteinander verbunden unter Bildung eines Durchgangs **18**, der einen Kanal **19** bildet, der den oberen Teil der unteren Hälfte der Zelle **12** durchzieht. Der Kanal **19** kann Entnahmeöffnungen besitzen zur Entfernung von Flüssigkeit.

[0057] Die Kammern **16A** und **16C** enthalten jeweils unabhängig ein elektrisch leitendes Mittel oder Medium **25A** (oder **25B**), ausgewählt aus Gel, Flüssigkeit, Paste, Schwamm, Schaumstoff, Emulsion, durchlässigem Metall, durchlässiger Keramik oder Kombinationen davon. Um den elektrischen Stromkreis zu schließen, sind üblicherweise Metalldrähte oder Elektroden **26A** und **26B** in dem elektrisch leitenden Medium angebracht, wie in **Fig. 3** gezeigt. Die anderen ähnlichen Figuren, z. B. 1, 2, 3 oder 4, können auf die selbe Weise interpretiert werden.

[0058] Wenn die obere Hälfte der Zelle **11** sich über der unteren Hälfte **12** befindet, so daß die oberen Wände **15A** und **15B** und die unteren Wände **15C** und **15D** Übereinstimmen, ist der Hautstreifen **13** zwischen den Wänden dicht abgeschlossen von der Haut in den Elektrodenkammern, sowohl auf der oberen als auch auf der unteren Seite (s. **Fig. 2**). Die Anteile der Haut in den Elektrodenkammern **16A** und **16C** sind so physikalisch und elektrisch isoliert voneinander, so daß der elektrische Strom und der Fluß von biologischem Material durch die Haut und innerhalb der Haut untersucht werden kann. Die Öffnungen **20A** und **20B** in der unteren Hälfte der Zelle **12** ermöglichen es, daß Rezeptorflüssigkeit **17** kontinuierlich hindurchgeht. Die Öffnungen **21A** und **21B** ermöglichen es, die Temperatur in dem Wassermantel **21C** konstant zu halten. Während des Versuchs ist der Kanal **19** am oberen Ende der unteren Hälfte der Zelle **12** mit Rezeptorflüssigkeit **17** gefüllt, so daß die Unterseite der Haut **13** feucht bleibt. Die Wände **15C** und **15D** des Kanals bilden auch eine mechanische Stütze für die Membran (Haut).

[0059] Die obere Hälfte **11** und die untere Hälfte **12** sind an ihren Übereinstimmenden einzelnen flachen Seiten, mit der Probe **13** dazwischen, mit Hilfe von Klammern **22A** und **22B** oder anderen Befestigungsmitteln zusammengefügt, um die obere Hälfte **11** und die untere Hälfte **12** der Zelle dicht miteinander zu verbinden. In **Fig. 4** besteht eine Barriere **18A** aus Glas, um die Kammern **16A** und **16C** elektrisch zu isolieren. **Fig. 4** zeigt auch die Rezeptorflüssigkeit **17**, die sich durch die Leitung **20B** zu einem Behälter **29A** hin bewegt. Die Flüssigkeit **29B** wird dann mit Hilfe einer Pumpe **29** wieder in das Reservoir gepumpt (oder umgekehrt). Irgendeine geeignete Flüssigkeit, Salzlösung, Blut usw. kann angewandt werden für Entnahme-Versuche von Substanzen.

[0060] In **Fig. 5A bis 5H** sind verschiedene Ausführungsformen der räumlichen Konfiguration der Diffusionszelle **10** der vorliegenden Erfindung entlang der Linie 5A-SA der **Fig. 1** angegeben. **Fig. 5A** ist ein Schnitt des Bodens. der oberen Hälfte der **Fig. 1** entlang der Linie SA-5A. Die Kammern **16A, 16B** und **16C** und die elektrischen Isolierungsmaterialien **15A** und **15B** (z. B. Glaswände) sind angegeben. **Fig. 5B** ist ein Schnitt entlang der Linie 5A-SA mit der Kammer **16A** und **16C** und einer einzigen Glaswand **15E**. Der Schnitt **5C** zeigt quadratische Kammern **16A, 16B** und **16C** mit elektrisch isolierenden Wänden **15A** und **15B**. Der Schnitt der **Fig. 5D** zeigt quadratische Kammern **16A** und **16C** und eine einzige Glaswand **15F**. Der Querschnitt der **Fig. 5E** zeigt eine konzentrische koaxiale Konfiguration. Die Kammern **16AA(+)**, **16BB** (isolierend) und **16CC(-)** sind angegeben mit isolierenden Glaswänden **15AA, 15BB** und **15EE**. Der Schnitt der **Fig. 5F** zeigt ebenfalls eine konzentrische Zelle mit Kammern **16AA(+)** und **16CC(-)** und isolierenden Wänden **15CC** und **15FF**. **Fig. 5G** ist ein Schnitt durch Elektroden und Isolierungen mit zwei kreisförmigen Elektroden (Kammern **16A** und **16C**) und Glas-Isolierwänden **15G** und **15H**. **Fig. 5H** ist ein Schnitt einer Art konzentrischer Zelle entlang der Linie 5A-5A mit Kammern **16A** und **16C** und einer Isolierwand **15DD**. Diese Konfigurationen erscheinen am Boden der oberen Hälfte **11** und der Oberseite der unteren Hälfte **12** und die Wände und Kammern stimmen, wenn die Zelle geschlossen ist, überein, wie in **Fig. 1** gezeigt.

[0061] Natürlich ist die Oberseite der oberen Hälfte **11** mit einer offenen Oberseite der Kammern **16A** und **16C** gezeigt. Die Oberseite kann jedoch geschlossen oder abgedeckt sein. Auf diese Weise könnten die Kammern **16A** und **16C** in vielen Winkeln von der Vertikalen angeordnet sein und die Kammern **16A** und **16C** würden guten elektrischen Kontakt mit der Membranoberfläche behalten.

[0062] Um einen festen elektrischen Kontakt aufrecht zu erhalten, kann ein chemisches Klebemittel, das nicht

der Iontophorese unterliegt, wie die hyperallergenen chemischen Klebemittel von 3 M Company, St. Paul, Minnesota, angewandt werden.

[0063] Es wird ein nicht-invasives Verfahren und eine Vorrichtung zur Entnahme und Überwachung von nicht-ionischen Einheiten, wie Glukose, Saccharose u. ä., unter Anwendung der Iontophorese, beschrieben.

[0064] Glukose: Die medizinische Diagnose und die Pflege von Patienten beruhen auf der Entnahme und Analyse von biologisch aktiven Substanzen im Körper. Typischerweise umfaßt die Probenentnahme die Analyse von Blut und Plasma, was eine invasive, unangenehme, risikobehaftete (z. B. Viren) und manchmal beschränkte Entnahme von Blut bedeutet. Einer der wichtigsten Fälle, wo eine Blutentnahme mindestens mehrmals täglich, ein Leben lang, erforderlich ist, liegt bei Patienten mit Diabetes vor. Die Echtzeit-Information bezüglich der Glukose-Gehalte im Körper (z. B. Blut) ist die wichtigste Information bei der Behandlung von Patienten und in vielen Fällen häufig eine Frage von Leben und Tod. Es wird nun eine einfache nicht-invasive Methode unter Anwendung der Iontophorese zur Entnahme beschrieben.

[0065] Um die Möglichkeit zu zeigen, mit Hilfe dieser Methode Glukose durch die Haut zu sammeln bzw. zu entnehmen, werden in-vitro Untersuchungen durchgeführt unter Verwendung von haarloser Mäusehaut als Hautmodell und der iontophoretischen Diffusionszelle der **Fig. 1 bis 5**. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind anwendbar auf die in-vivo Entnahme von einem Säugetier, besonders einem Menschen. Zwei selbsthaftende Gel-Elektroden (Kenzgelelc, von Nitto Electric Industry Co., Limited, Osaka, Japan) werden auf die gleiche Seite eines einzigen zusammenhängenden Stücks von haarloser Mäusehaut (vollständige Dicke etwa 0.5 mm) aufgesetzt (Skh: hr-1, 8 bis 13 Wochen alt). Unter der Haut strömt radioaktiv markierte (^{14}C -U)-Glukose mit einer bekannten Konzentration, in Lösung in phosphatgepufferter Salzlösung (0.9 Natriumchlorid), hindurch; der pH-Wert des Phosphats ist etwa 7.4. Die Temperatur ist Umgebungstemperatur.

[0066] Bei der ersten Versuchsreihe wird nach dem Zusammenstellen der Zelle und Beginn des Durchleitens der Glukoselösung ein Strom (0.5 mA) 2 h angelegt. Die Spannung kann von etwa 1 bis 10 Volt variieren. Üblicherweise beträgt sie etwa 5 Volt. Der wichtigste Parameter, der konstant gehalten werden muß, ist der angelegte Strom. Die Spannung kann variieren, bezogen auf den relativen Widerstand an der Entnahmestelle. Dann werden die Gel-Elektroden ausgeschaltet und auf den Radioaktivitätsgehalt untersucht durch übliche Flüssigkeits-Szintillationszählung. wenn sich die Glukose-Konzentration unter der Haut von 1.07 mg/ml auf 0.153 mg/ml verändert (ein Faktor von 0.143) verändert sich die in 2 h durch die Haut entnommene Menge von 4.9 μg auf 0.705 μg (ein Faktor von 0.144 – s. Tabelle 1). Die Ergebnisse zeigen, daß für eine feste Entnahmestunde unter den gleichen elektrischen Bedingungen eine nahezu perfekte Übereinstimmung zwischen der Glukose-Konzentration in der Haut und der Menge an gesammelter Glukose an der (+)-Elektrode erhalten wird. (Elektrische Bedingungen in den Versuchen: der selbe konstante Gleichstrom (dc), aber ein gepulster Strom sollte auch in vorhersagbarer Weise bei der Entnahme wirken).

TABELLE 1
Glukose-Entnahme

<u>Konzentration [mg/ml]</u>	<u>Iontophoretischer Fluß Probe [$\mu\text{g}/2\text{h}$]</u>
A 0.153	0.705 \pm 0.095
B 1.07	4.9 \pm 0.7
	(14 %)
Verhältnis A / B 0.143	0.144 (gefunden)

[0067] Bei der zweiten Versuchsreihe wird unter Anwendung einer ähnlichen Versuchsanordnung wie oben, eine (^{14}C -U)-Glukoselösung mit 0.34 mg/ml Glukose in phosphatgepufferter Salzlösung hindurchgeleitet und die Gelelektroden werden alle 30 min ersetzt.

[0068] Die Bewertung der in das Elektroden-Gel gesammelten bzw. entnommenen Glukose zeigt eine wiederholbare Menge an radioaktiver Glukose 0.8 $\mu\text{g}/0.5$ h mit einer Standardabweichung (S. D.) von $\pm 23\%$ (s. Tabelle 2). Da die Haut für jeden einzelnen Versuch von einer unterschiedlichen Maus kommt, wird die Bewertung für jeweils eine einzelne Diffusionszelle (d. h. durch das gleiche Hautstück entnommene Proben) vorgenommen, wobei die erste Probeausgeschlossen wurde (die ersten 0.5 h sind etwas höher als die anderen aufgrund der Versuchsbedingungen). Die erhaltenen Versuchswerte von 0.79 bis 0.74 μg sind ein Mittelwert der in vier getrennten Zellen gefundenen Glukosemenge.

TABELLE 2
Glukose-Entnahme

<u>Probe</u>	<u>Zeit [h]</u>	<u>gesammelte Glukose [μg]</u>
1	1 - 0.5	0.97 \pm 0.12
2	0.5 - 1	0.79 \pm 0.09
3	1 - 1.5	0.76 \pm 0.10
4	1.5 - 2	0.75 \pm 0.21
5	2 - 2.5	0.74 \pm 0.24
	Mittel	0.80 \pm 0.19 (\pm 0.23 %)

[0069] Die Konzentration der Glukose ist 0.34 mg/ml. Die Fließgeschwindigkeit der Glukoselösung ist 15 ml/h. n = 4, für jede Probe wurde das Mittel von vier Zellen genommen.

[0070] Es wird gezeigt, daß die S. D. für einzelne Diffusionszellen, d. h. einzelne Mäuse, innerhalb eines Bereichs von 4 bis 9% liegen (außer für Zelle 3) – s. Tabelle 3.

TABELLE 3
Glukose-Entnahme

Zelle*	Gemessene Menge an Glukose in der Gel-Elektrode pro Probe [μg]
1	0.825 \pm 0.041 (\pm 5%)
2	0.963 \pm 0.090 (\pm 9%)
3	0.530 \pm 0.115 (\pm 22%)
4	Zelle gebrochen
5	0.727 \pm 0.033 (\pm 4%)

[0071] Die Konzentration der Glukose ist 0.34 mg/ml. Die Fließgeschwindigkeit der Glukoselösung ist 15 ml/h. n = 4, für jede Probe wurde das Mittel von 4 Zellen für jede von 4 Zeiten genommen.

[0072] Es wird gezeigt, daß Glukose nach der vorliegenden Erfindung iontophoretisch genau gesammelt bzw. entnommen wird. Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der Glukosemenge unter der Haut und der entnommenen Glukosemenge. Die Glukosemengen sind deutlich und wiederholbar und daher zuverlässig. Da bekannt ist, daß der iontophoretische Transport linear von dem Strom und der Dauer des Stroms abhängt, werden diese Parameter genau eingestellt (innerhalb sicherer Grenzen der Stromkonzentration), um nachweisbare Mengen an Glukose in der Gel-Elektrode zu erhalten. Diese Methode ist nicht auf die transdermale Probenahme beschränkt und ist über Schleimhautoberflächen (z. B. nasal, bukkal), bei denen die Barriere für den Transport nicht-ionischer Spezies niedriger ist und der Konzentration an Blutgefäßen höher ist, möglich.

[0073] Die Kombination dieses Entnahme-Verfahrens mit spezifischen Biosensoren für Glukose (z. B. J. C. Cooper, E. A. H. Hall, Journal of Biomedical Engineering, Bd. 10, S. 210–219, veröffentlicht 1988), oder mit für Glukose selektiven Elektroden (R. L. Solsky, Analytical Chemistry, Bd. 60, Nr. 12, 106R–113R, veröffentlicht 1988), oder der in-situ Analyse (z. B. colorimetrisch) ergibt eine Echtzeit Information über Glukose.

[0074] Die vorliegende Erfindung ist daher geeignet zur Bestimmung von metabolischen Glukosegehalten bei Säugetieren, vorzugsweise Menschen. Es werden sowohl hypoglykämische als auch hyperglykämische Zustände überwacht, z. B. von Glukosegehalten in mg/ml Blut von etwa 0.1 mg/ml bis 5.0 mg/ml. Ein bevorzugter Bereich zur Überwachung von Hypoglykämie liegt zwischen etwa 0.3 und 0.7 mg/ml. Ein bevorzugter Bereich bei Hyperglykämie (Diabetes) liegt zwischen etwa 1.0 und 5.0 mg/ml. Ein normaler Glukosegehalt im Blut liegt zwischen etwa 0.8 und 1.1 mg Glukose/ml Blut.

[0075] Der ExacTech (Baxter Travenol, Deerfield, Illinois) Biosensor für Glukose ist ein amperometrisch arbeitender Biosensor der zweiten Generation. Sauerstoff wird durch einen künstlichen Elektronenmediator ersetzt, der die Elektronen von der biologischen Komponente zu der Elektrode führt. Derartige revolutionäre Mediatoren: zeigen (1) eine leichte Beteiligung an Redox-Reaktionen, sowohl mit der biologischen Komponente als auch mit der Elektrode, zeigen (2) Stabilität unter den erforderlichen Assay-Bedingungen, neigen (3) nicht dazu, während des Elektronen-Transfers an Nebenreaktionen teilzunehmen, wie der Reduktion von Sauerstoff, besitzen (4) entsprechende RedoxPotentiale, entfernt von denjenigen anderer elektrochemisch aktiver Arten, die in den Proben vorhanden sein können, werden (5) von einem weiten Bereich von pH-Werten nicht angegriffen, sind nicht toxisch, insbesondere für in-vivo Anwendungen, und können (6) immobilisiert werden.

[0076] Der ExacTech-Glukosetest kann leicht durchgeführt werden und ein Ergebnis wird innerhalb von 30 s

erhalten, nach dem Aufbringen der ganzen Blutprobe auf eine wegwerfbare bleistiftartige Vorrichtung. Bei der derzeit ins Auge gefaßten verbesserten Anwendung einer solchen Vorrichtung wird der wegwerfbare Streifen, der sich in der Vorrichtung befindet, ersetzt durch ein Material, das mit Glukose benetzt wird, die iontophoretisch durch die Haut gezogen worden ist (ohne daß Blut hindurchgezogen wird). Die Matrix für die gesammelte Probe besteht aus Polyvinylchlorid, ebenso wie der wegwerfbare Streifen, oder sie besteht aus irgend einem anderen Material mit besseren Eigenschaften zur iontophoretischen Entnahme. Die Beladung der vorgesehenen Matrix wird in einer getrennten Stufe oder vorzugsweise als Teil eines Assays durchgeführt, mit gleichzeitiger oder abgestimmter Entnahme und Bestimmung von Glukose. Die Matrix zum Nachweis kann ein wegwerfbarer Streifen sein, wie in den derzeitigen Nachweissystemen für Blut, und nur einmal verwendet werden, oder es kann ein Material sein, das mehrfache Entnahmen ermöglicht. Die zuletzt genannte Matrix kann unbegrenzt an der Stelle bleiben oder sie kann nur über einen bestimmten Zeitraum (Anzahl von Bestimmungen) verwendbar sein. Vorzugsweise befindet sie sich in entsprechender Anordnung zu den Elektroden, um das gemeinsame Assay zu ermöglichen. Sie ist jedoch mit der Vorrichtung (Überwachungssystem) in Bezug auf die Entnahme und den Nachweis so ausgebildet, daß die benetzte Matrix, die iontophoretisch entnommene Glukose enthält, über dem zugänglichen Elektrodenbereich aufgebracht ist, am freien Ende der Elektrode. Hier katalysiert Glukoseoxidase die Oxidation von Glukose, wobei die gebildeten Elektronen über einen Mediator zu der darunter liegenden Elektrode übertragen werden. Die Stärke des entstandenen Stroms ist proportional der Glukosekonzentration im Blut der Probe und wird angezeigt in mg/dl auf einem Flüssigkristall-Display, das in den Monitor eingebaut ist. Wenn sie in den Handel kommen, können andere vergleichbare oder noch empfindlichere Mittel zum Nachweis von Glukose, anstelle der oben beschriebenen handelsüblichen Blutentnahmesysteme, verwendet werden.

In-vivo Entnahme

[0077] Die zur Erläuterung der in-vivo Entnahme geeigneten Zeichnungen sind die **Fig. 5, 7, 8, 9A und 9B**. Die oben zur in-vitro Entnahme angegebenen Informationen können hier angepaßt und angewandt werden.

[0078] In **Fig. 7** ist eine Ausführungsform der Entnahme gezeigt. Das Äußere des Oberteils der Zelle **81** sieht sehr ähnlich aus wie die obere Hälfte **11**, aber besitzt die Form des Oberteils **81**. Die Elektroden scheinen ähnlich oder identisch zu sein mit den Kammern **16A, 16B** und **16C**. Das Oberteil **81** ist mit Bügeln bzw. Gummibändern **82** an einem lebenden Säugetier **86** (Mensch) befestigt. Wenn die Elektrodendrähte **26A** und **26B** über die Leitungen **84** und **84A** an eine Energiezufuhr **83** angeschlossen werden, ist der Stromkreis geschlossen und die zu entnehmende Substanz wird in dem elektrisch leitenden Gel **25A** oder **25B** angesammelt. Der Hauptunterschied zwischen der oberen Hälfte **11** und dem Oberteil **81** besteht darin, daß die Glaswände **15A** und **15B** usw. so ausgedehnt sind, daß sie eine gute Abdichtung auf dem horizontalen Membran-Substrat ergeben beim Kontakt mit der Oberfläche **85**. (Die Energiezufuhr **83** kann die Form einer kleinen Uhr besitzen und tragbar sein).

[0079] Es ist bekannt, daß Arzneimittel und ihre Metaboliten, wie Alkohol, Aminopyrin, Methylhamstoff, Acetamid, Sulfaguanidin, Sulfadiazin, Theophyllin und andere niedermolekulare Nicht-Elektrolyte, durch die Haut oder Schleimhautmembran ausgeschieden werden in Schweiß, Speichel o. ä. Andere Verbindungen und ihre Metaboliten, die Indikativ sein können für bestimmte normale und Krankheits-Zustände, wie z. B. Phenylalanin (Phenylketonurie), Zucker (Diabetes), Östrial (Schwangerschaft), Calcium (Neoplasmen) und Kupfer (Leukämie), sowie normale und abnormale Metaboliten von anderen Substanzen können in solchen Flüssigkeiten ausgeschieden werden. Das Sammeln von Flüssigkeiten wird auch experimentell angewandt zum Nachweis von biologischen Erfordernissen an verschiedenen Substanzen wie Magnesium. Wenn Flüssigkeitsproben erhalten und auf diese Materialien untersucht werden, kann das Vorhandensein derartiger Materialien im Körper nachgewiesen werden. Das Sammeln derartiger Flüssigkeiten ist daher für einen weiten Bereich von experimentellen, diagnostischen, therapeutischen und forensischen Zwecken geeignet. Während solche Flüssigkeiten auf zahlreiche Arten gesammelt werden können, beschreibt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Sammeln von Glucose mit Hilfe von elektrischem Strom.

Biologische Untersuchung (Biosensing) unter Anwendung der Iontophorese

[0080] Für diesen Aspekt sind die **Fig. 5, 7, 8, 9A und 9B** von Bedeutung. Die obige Beschreibung zur in-vivo Entnahme ist von Interesse zuzüglich einer Analyse-Komponente.

[0081] Die Analyse-Komponenten können (ionen)spezifische Elektroden, selektive Elektroden, elektronische Biosensoren, die spezifische biochemische Veränderungen mit Veränderungen elektrischer Signale verbinden, colorimetrische Reagentien o. ä. sein.

[0082] Der Nachweis der Gegenwart einer Substanz von Interesse im Gewebe eines Patienten kann qualitativer oder quantitativer Natur sein. Der gemessene Wert kann an eine Medikamentenabgabereinheit weitergegeben werden, um ein höheres Niveau eines therapeutischen Mittels einzustellen.

[0083] Das analytische Verfahren kann, wenn es feststellt, daß die fragliche Substanz (oder das fragliche bioaktive Material) sich verändert hat, automatisch einen geeigneten Spiegel des benötigten therapeutischen Mittels bereitstellen. Die Messung kann einen Anwender auch einfach darauf aufmerksam machen, daß ein therapeutisches Mittel oral, dermal, rektal, bukkal, intravenös oder dergleichen verabreicht werden muß.

Vorteile der iontophoretischen in-vivo oder in-vitro Entnahme oder Abgabe

1. Die hier angegebene Entnahmeweise ist eine einfache, bequeme und schmerzlose Technik zur Entnahme von biologisch aktiven Materialien zum Zweck der Diagnose oder Überwachung. Die Entnahme kann kontinuierlich oder periodisch durchgeführt werden.
2. Die Entnahme ist von großer Bedeutung in Situationen, wo eine Routine-Blutentnahme nicht durchgeführt werden kann, oder wo die Gewinnung von mehrfachen Blutproben unerwünscht ist (z. B. bei einem Kind).
3. Die Entnahmetechnik offeriert Möglichkeiten, die letztendlich zu einem Biofeedback"-Rückkopplungssystem entwickelt werden kann. In anderen Worten, die iontophoretische Vorrichtung kann, indem sie die Entnahme nach der beschriebenen Methode erlaubt, auch dazu verwandt werden, ein therapeutisches Mittel auf eine beliebige Verabreichungsweise zu verabreichen (d. h. als Antwort auf einen Bedarf, der durch die Entnahme wahrgenommen" wurde).
4. Die Entnahme macht die Überwachung außerhalb des Patienten sicher und einfach und ergibt eine Anwendung der Iontophorese mit breiter und nahezu allgemeiner Anwendbarkeit.
5. Die Entnahme irgend eines biologisch aktiven Materials kann modifiziert werden, wenn das entnommene biologische Material nicht schnell genug durch die Haut hindurchgeht: Mittel (z. B. Alkohole, Fettsäuren, Glykole, Azone usw.), die die lokale Barrierewirkung der Haut herabsetzen, können in die Elektroden-Vorrichtung eingebaut werden, um die Extraktion zu verstärken.
6. Das Verfahren ist geeignet zur Entnahme an beiden Elektroden, d. h. zur gleichzeitigen Bestimmung von mehr als einem einzigen biologisch aktiven Mittel (z. B. einem Arzneimittel und einem Metaboliten oder Konjugat des Mittels).
7. Wie angedeutet, ist die Technik nicht allein darauf beschränkt, Biomaterialien durch die Haut aufzuspüren. Andere Schleimhautoberflächen können auch für den Ansatz geeignet sein. Beispiele schließen die Nasenschleimhaut, das Rektum, die Vagina und das Innere des Mundes ein. Diese Oberflächen werden gegenwärtig als Entnahmeorte mit verschiedenem Erfolg verwandt. Da diese Schleimhautoberflächen im allgemeinen gut mit kleinen Blutgefäßen durchsetzt sind und weil diese Membranen dem Molekültransport weniger Widerstand entgegensetzen, kann ein für eine kürzere Zeit eingesetzter geringer Strom verwandt werden, um Proben aus diesen Geweben zu entnehmen.
8. Das Verfahren hat eine Effektivität, die abhängt von dem zwischen den Elektroden angelegten Strom und der Dauer des Stromes. Diese Variablen können genau kontrolliert werden, was eine reproduzierbare Entnahme ermöglicht und dadurch die Gewinnung von zuverlässigen Daten für Vergleichszwecke erlaubt (z. B. zur Gegenüberstellung von Gehalten an einem speziellen biologisch aktiven Material vor, während und nach einer therapeutischen Behandlung). Dies wäre ein bemerkenswerter Vorteil bei der Entnahme von der Nase, einer bekanntermaßen schwierigen Stelle, um von dort reproduzierbare Informationen zu erhalten.
9. Die Methode macht es möglich, in-vivo oder in-vitro eine Substanz (oder ein biologisch aktives Material) zu entnehmen, wobei die Elektroden sich auf der selben Seite der Oberfläche befinden. Die Probe (Vorrichtung) hat im allgemeinen eine horizontale Konfiguration, wobei die Elektroden-Materialien im allgemeinen vertikal an einander angrenzen. Wenn der Oberteil der Vorrichtung dicht abgeschlossen ist, kann er irgend eine Orientierung auf der Haut annehmen, so lange der elektrische Kontakt mit der Membranoberfläche nicht gestört wird.

[0084] Die folgenden Beispiele sind nur als erläuternd und beispielhaft zu verstehen. Sie sind in keiner Weise beschränkend gemeint.

IN-VITRO ENTNAHME

Untersuchung der Modellzelle:

[0085] Glas-Diffusionszellen, wie oben beschrieben (s. **Fig. 1, 2, 3** oder **4**), wurden hergestellt von Skin Permeation Systems (L. G. A., Berkeley, CA). Die Zelle **10** ist eine Modifikation einer Standard-Strömungs-Diffusionszelle (LGA skin penetration cell, Katalog Nr. LG 1084-MPC), beschrieben von Gummer et al., International Journal of Pharmacology, Bd. 40, S. 101 ff, veröffentlicht 1987.

[0086] Die obere Hälfte der Zelle ist in drei Teile oder Kammern (**16A, 16B** oder **16C**) unterteilt durch zwei Wände **15A** und **15B**, so daß die einzige physikalische/ elektrische Verbindung zwischen den beiden Elektro-

denkammern (**16A** und **16C** in **Fig. 1, 2, 3** oder **4**) die Möglichkeit einer Undichtigkeit zwischen ihnen verringert und es möglich macht, Fragen, umfassend die Kontinuität der Haut, zu untersuchen. Die obere Hälfte der Zelle **12** hat einen Kanal **18** oder Durchgang unterhalb dieses Raumes, der die Haut von dem Rest der Rezeptorphase isoliert. Durch Füllen dieses Kanals **18** mit Rezeptorflüssigkeit **19** während des Versuchs wird die Haut darüber feucht gehalten. Die untere Hälfte der Zelle **12** hat auch Öffnungen **20A** und **20B** zum kontinuierlichen Fluß der Rezeptorphase **17** und Öffnungen **21A** und **21B** zur Zirkulation von Wasser in dem Mantel. Die Kapillarwirkung zwischen den Kammerwänden und dem Äußeren wurde verhindert durch Silanisieren des Oberteils der Zelle mit Dichlordimethylsilan (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI). Die Zellen wurden mit einem Dreistufen-Magnetrührer und einem Rührstab **27** (LG-1083-MS, LGA, Berkeley) angewandt.

[0087] Metall-Elektrodendrähte (**26A** und **26B**): Platin-Draht (Pt wire – Fisher Nr. B-766-SA, 99,5% rein).

[0088] Energiezufuhr (**29**): Strom- oder Spannungskontrolle wurde durchgeführt mit Hilfe eines automatischen Crossovers (Modell APH 1000OM, Kepco, Inc., Flushing, NY) Diese Quelle besitzt eine angegebene Abweichung von $\leq 2 \mu\text{A}/8 \text{ h}$ für den systemgesteuerten Output, eine wichtige Überlegung, wenn der Arzneimittelfluß gegenüber Änderungen des Stromes empfindlich ist.

[0089] Rezeptorflüssigkeit (**17**): Phosphatgepufferte Salzlösung (pH = 7.4, 0,9% NaCl Gew./Vol.).

[0090] Farbstoff: Blauer Farbstoff Nr. 1 FD&C in entionisiertem Wasser.

[0091] Arzneimittel: Clonidin-HCl (Sigma Chemicals Co., St.Louis, MO), Clonidin-HCl (Phenyl-4-³H) mit spezifischer Aktivität von 90 mCi/mg (Amershan, Arlington Heights, IL); Morphin-sulfat (Sigma Chemicals Co., St.Louis, Mo); Morphin (N-Methyl-³H) mit spezifischer Aktivität von 255 mCi/mg (New England Nuclear, Boston, MA). Die nicht markierten Arzneimittel wurden in entionisiertem Wasser gelöst unter Bildung von Lösungen von 1 mg/ml, mit ausreichend markiertem Arzneimittel, um eine Aktivität von etwa 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ zu erreichen.

[0092] Haut (**13**): Haut in voller Dicke, frisch ausgeschnitten von 11 bis 15 Wochen alten weiblichen haarlosen Mäusen (Stamm Skh : HR-1, Simonsen Laboratory, Gilroy, CA).

[0093] Untersuchung der Modell-Zelle: Die Diffusionszelle **10** wurde auf drei Arten untersucht:

[0094] (1) Auslauf-Tests (ohne Strom) unter Verwendung von Farbstoff und Silicon-Kautschuk statt Haut; (2) Auslauf-Tests unter Verwendung von Farbstoff und Haut (ohne Strom) und (3) iontophoretische Tests unter Verwendung von Arzneimittel-Lösungen und Haut (mit und ohne Strom). Die Verfahren (1) und (2) wurden bewertet durch visuelle Inspektion der Zelle. Für das Verfahren (3) wurden 0.6 ml markierte Arzneimittel-Lösung in die Kammer **16A** gegeben, 0.6 ml gepufferte Salzlösung wurden in die Kammer **16C** pipettiert und ein konstanter Strom von 0.63 mA/cm² (Mit einer auf 9 V begrenzten Spannung) wurde zwischen den Elektroden in den beiden Kammern angelegt. Die Aktivität der Lösungen in den Kammern **16A** und **16C** wurde vor und nach der Iontophorese bestimmt. Die Aktivität der Haut **13** und der aus der Rezeptorkammer entnommenen Proben wurden nach dem Versuch bestimmt. Jeder Versuch dauerte etwa $24 \pm 2 \text{ h}$, wobei stündlich Proben entnommen wurden. Die Rezeptorflüssigkeit **17** wurde magnetisch gerührt und die Sammel-Fließgeschwindigkeit betrug 10 ml/h. Jedes Verfahren wurde dreimal wiederholt.

ERGEBNISSE

[0095] Verfahren (1) und (2): Es wurde kein Austreten von Farbstoff aus den Seitenkammern **16A** und **16C** in die Mittelkammer **16B** oder aus irgend einer Kammer nach dem Äußeren der Zelle beobachtet bei beiden Modellen mit der Silicon-Kautschuk-Membran und mit der haarlosen Mäusehaut.

[0096] Verfahren (3): Wenn der Farbstoff in der Kammer **16** durch ein markiertes Arzneimittel ersetzt wurde und kein Strom angelegt wurde, diffundierten die Arzneimittel in die Rezeptorphase **17** mit mittleren Geschwindigkeiten von 0.05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ für Clonidin-HCl und 0.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ für Morphin-Sulfat. In beiden Fällen fand sich nach 20 h kein Arzneimittel in der gepufferten Salzlösung der Kammer **16C**.

[0097] Wenn zwischen der Kammer mit dem markierten Arzneimittel und der Kammer mit der gepufferten Salzlösung Strom angelegt wurde, nahm die Wanderung deutlich zu. Die Geschwindigkeit der Wanderung von Morphin-sulfat durch die Haut mit einem Strom von 0.63 mA/cm² betrug 2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$, verglichen mit der passiven Transportgeschwindigkeit von 0.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$. Im Falle von Clonidin-HCl veränderte sich die Geschwindigkeit von 0.05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ ohne Strom auf 15.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ mit einer elektrischen Triebkraft. Markiertes Arzneimittel wurde in der gepufferten Salzlösung der Kammer **16C** nachgewiesen, wobei 1 μg Morphinsulfat nach etwa 20 h vorhanden war (s. **Fig. 14**) und 5 μg Clonidin nach der selben Zeit.

[0098] Das markierte Arzneimittel kann über verschiedene Wege in die Kammer **16C** gelangt sein, wobei der wahrscheinlichste der ist, daß es durch die Haut unter der passiven Elektrode "zurückgezogen" worden ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zwei Zellen durch ein Röhrchen **95** miteinander verbunden, so daß ihre Rezeptorphasen **92** und **93** gemeinsam waren, aber daß die Haut und die Oberteile der Zellen physikalisch voneinander getrennt waren (s. **Fig. 10**). Markiertes Arzneimittel und die positive Elektrode befanden sich in der Kammer **91A** der Zelle **90A**. Die negative Elektrode befand sich in der Kammer **91B** der Zelle **90B**. Alle anderen Kammern (**91C**, **91D**, **92** und **93**) waren mit gepufferter Salzlösung gefüllt. Das restliche Versuchsverfahren (elektrische Parameter, Probenentnahme) waren identisch mit denjenigen des Verfahrens 3 oben. Mar-

kiertes Arzneimittel wurde in die Kammer **91A** der Zelle **90A** transportiert, wenn die Zellen auf diese Weise verbunden waren, was das Vorhandensein eines "transdermalen Reservewegs" bei der Iontophorese zeigt, der tatsächlich die Entnahme durch Iontophorese bewirkt.

(b) Zusätzliche Materialien, von denen erwartet wird, daß sie auf ähnliche Weise wie oben für Clonidin beschrieben, gesammelt werden können umfassen z. B. Morphin, Heroin, Insulin, Neomycin, Nitrofurason und β -Methason.

BEISPIEL 2

IONOTOPHORETISCHE IN-VITRO-ENTNAHME

[0099] Die iontophoretische Entnahme besteht in dem Herausziehen von Substanzen aus dem Körper durch die Haut mit Hilfe von Elektrizität. Um dieses Verfahren zu untersuchen, wird eine iontophoretische in-vitro Zelle angewandt (**Fig. 1, 2, 3 oder 4**). Haut von haarlosen Mäusen **13** (8 bis 13 Wochen alt) wird in voller Dicke zwischen die beiden Teile der Zelle gelegt. Lösungen von radioaktiv markierten Arzneimitteln in bekannter Konzentration in phosphatgepufferter Salzlösung zirkulieren mit 10 ml/h unter der Haut. Auf der Oberseite der Haut befinden sich zwei selbstklebende Gelelektroden, die mit einer Energiezufuhr verbunden sind, die auf einen Modus mit konstantem Strom (0.5 mA) eingestellt ist. Der Strom wird für eine gemessene Zeit (etwa 2 h) entsprechend etwa 0.63 mA/cm² angelegt. Nach dem Versuch werden die Gelelektroden zur Szintillationszählung entnommen, die die Menge an von den Gelelektroden absorbierten Arzneimittel widerspiegelt. Unter Anwendung verschiedener Arzneimittel-Konzentrationen mit dem gleichen elektrischen Strom während der gleichen Zeit wird ein linearer Zusammenhang zwischen der von der Elektrode gesammelten Menge und der Arzneimittel-Konzentration erwartet.

[0100] Ergebnisse des oben beschriebenen Verfahrens unter Verwendung von Clonidin und Theophyllin in verschiedenen Konzentrationen sind als Diagramme angegeben (**Fig. 11 und 12**), wobei jeder Datenpunkt das Mittel von mindestens zwei Versuchen ist. Die graphische Darstellung der Daten zeigt die Linearität der Ergebnisse.

IN-VIVO ENTNAHME

[0101] Das obige Verfahren und die Beschreibung zur in-vitro Entnahme wird angewandt, mit der Ausnahme, daß die Membran durch die Oberseite des Unterarms eines 29 jährigen Mannes ersetzt wird. Die angewandte Entnahme-Zelle ist in den **Fig. 7, 8, 9A und 9B** angegeben. Die Menge an gesammeltem Clonidin ist vergleichbar mit derjenigen, die im in-vitro Fall beobachtet wurde.

[0102] **Fig. 13** zeigt ein Schema von einem Meerschweinchen mit getrennten Pflaster-Elektroden zur Entnahme von biologisch aktiven Materialien aus dem Säugetier.

Biosensorik unter Anwendung der Iontophorese

[0103] Die in-vitro-Entnahme von radioaktivem Clonidin ist oben beschrieben. Wenn das Verfahren auf die in-vivo-Entnahme an einem Hund übertragen wird, wird der Spiegel des radioaktiven Clonidin rasch und genau iontophoretisch gemessen. Der Laborant wird gewart, wann er eine Injektion Clodin zu verabreichen hat, um den gewünschten Clodin-Spiegel im Versuchshund zu erhalten.

Patentansprüche

1. Nichtinvasive, elektrisch verstärkte Probenvorrichtung zur Entnahme von Glucose aus einem Säugetier durch die intakte Haut oder eine Schleimhautmembran ohne mechanische Durchdringung, wobei die Vorrichtung folgende Komponenten umfaßt:

a) eine positive Elektrode (**26A**),

b) eine negative Elektrode (**26B**), und

c) ein elektrisch isolierendes Material zwischen den Einzelkomponenten a) und b),

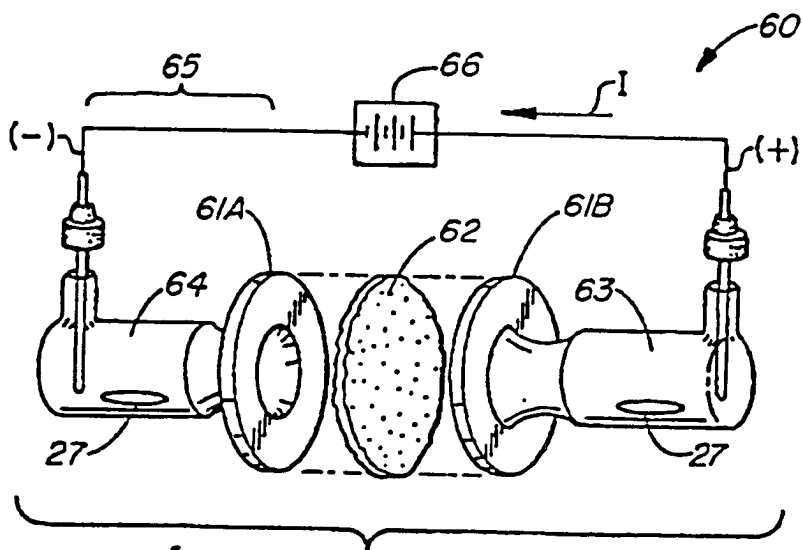
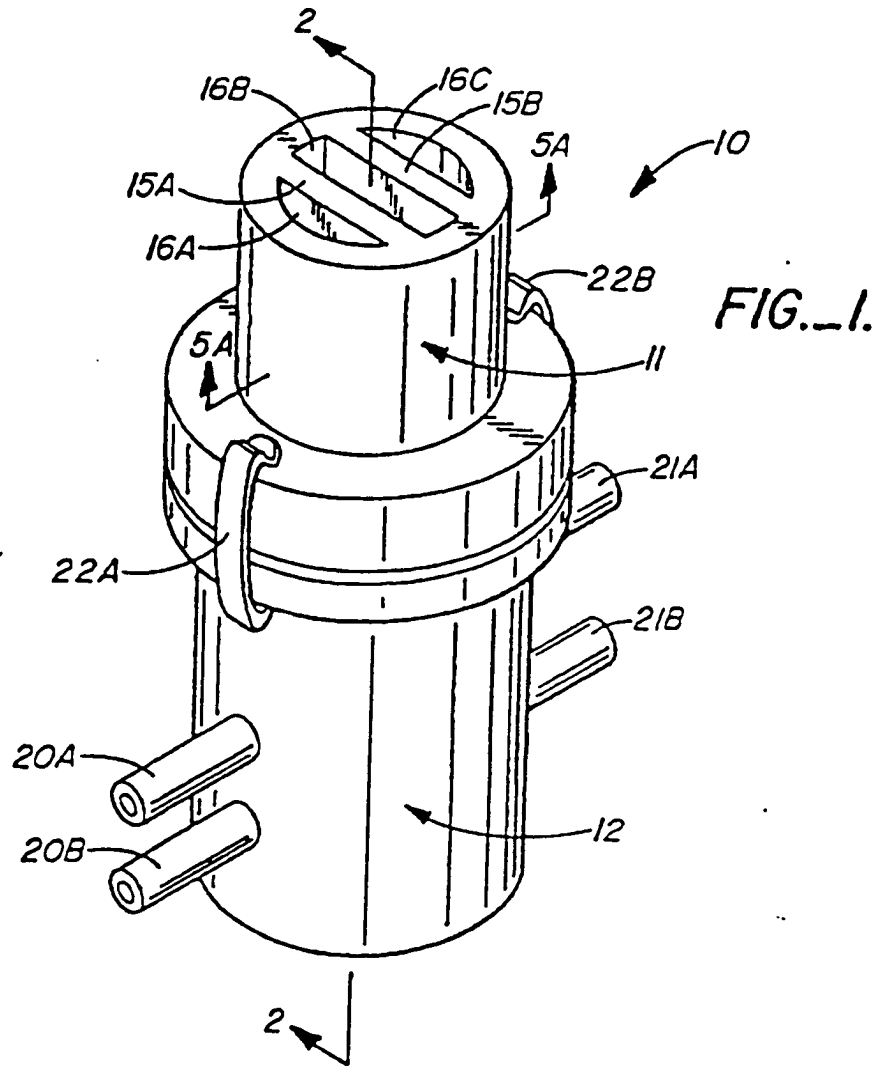
wobei die positive Elektrode, die negative Elektrode und das isolierende Material räumlich so angeordnet sind, daß sie eine einzelne gemeinsame Oberfläche (**85**) der Vorrichtung zum Kontakt mit der gleichen Seite der Haut oder der Schleimhautmembran des Säugetieres darbieten, und wobei die Vorrichtung eine Analyse-Einrichtung für Glucose umfaßt.

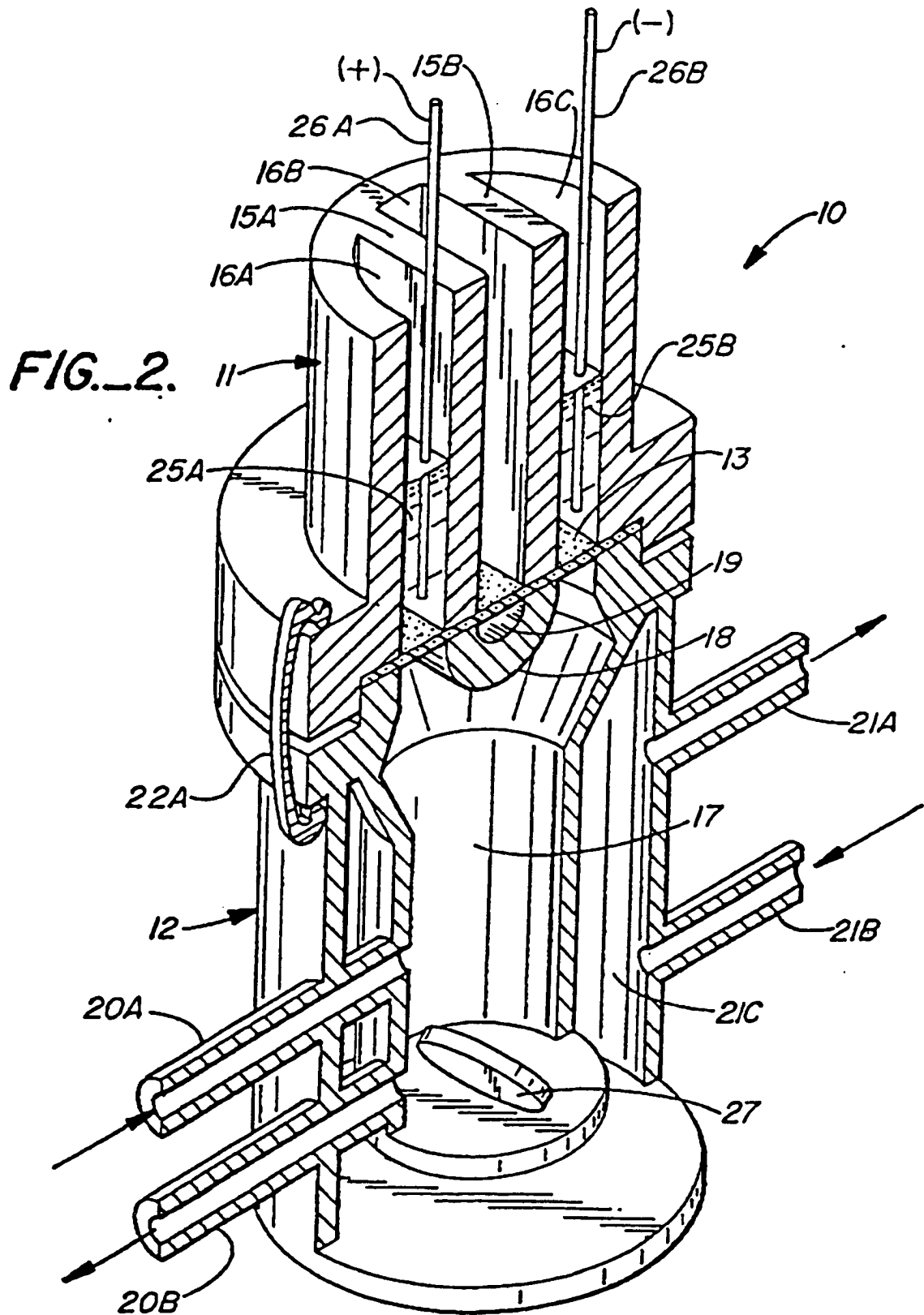
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung eine Spannungsversorgung (**83**) umfaßt.

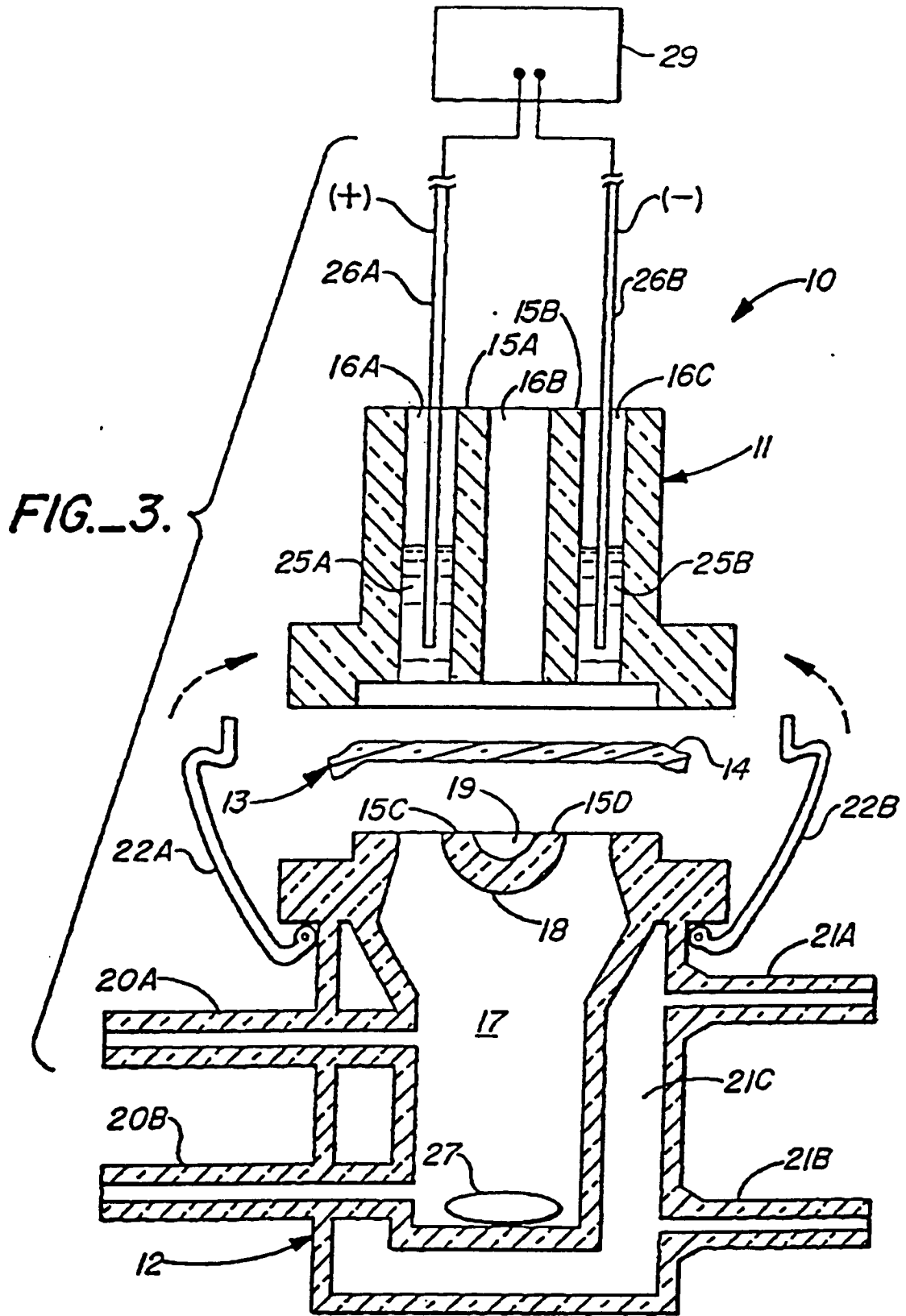
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung eine Probenmatrix zur Aufnahme der entnommenen Glucose umfaßt.

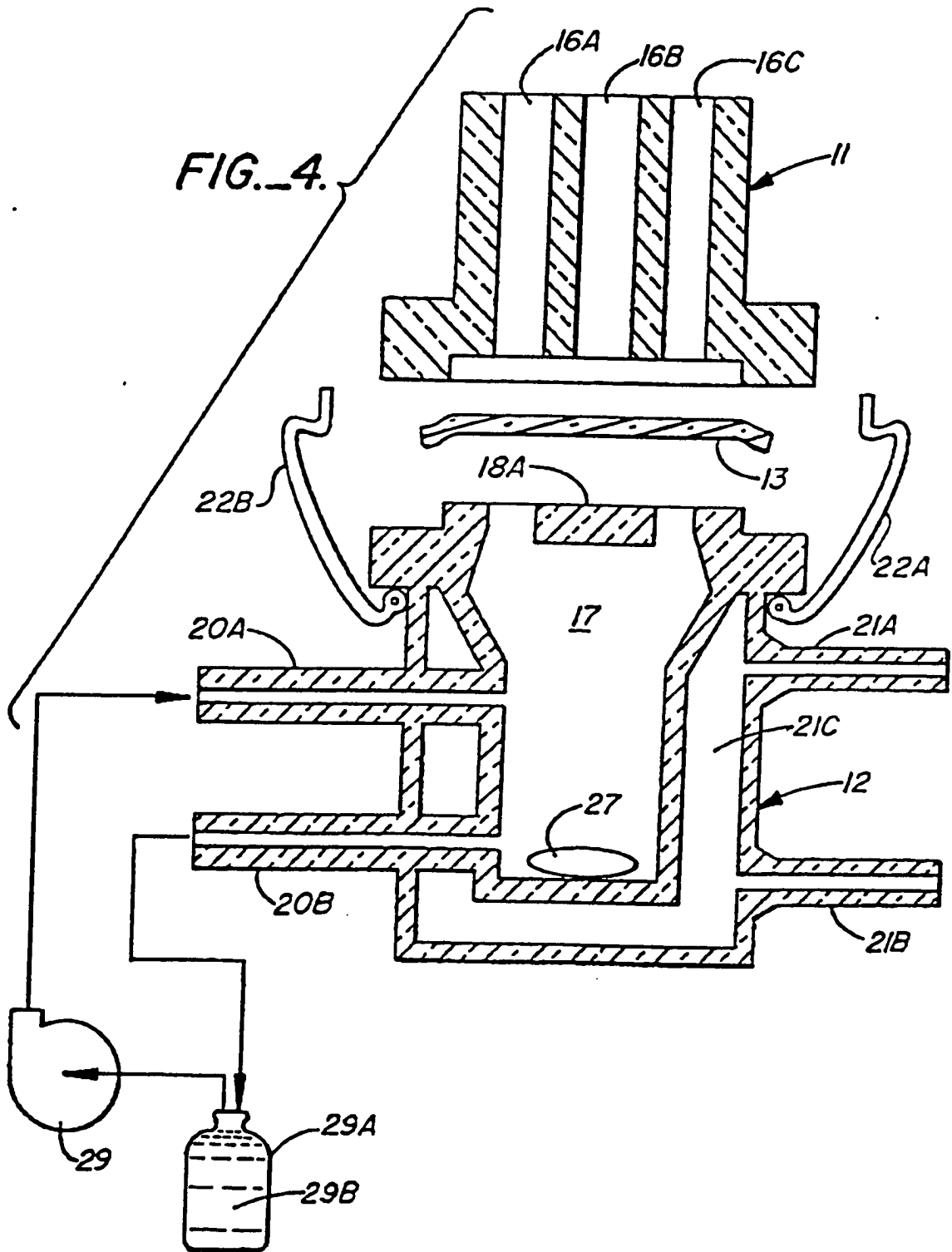
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden Gel-Elektroden (**25A**, **25B**) sind, welche die Probenmatrix bereitstellen.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen









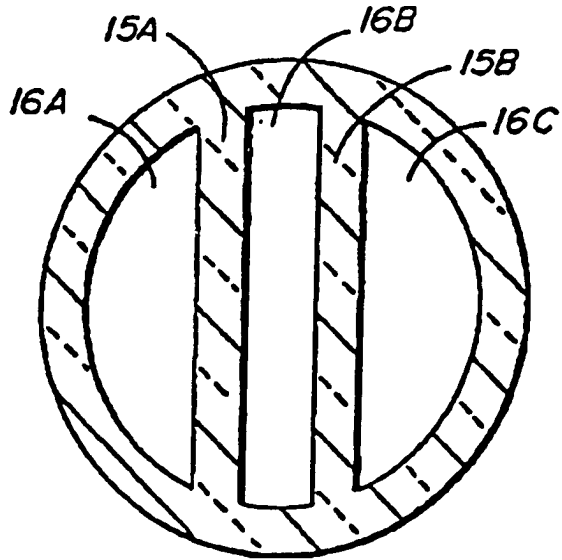


FIG. 5A

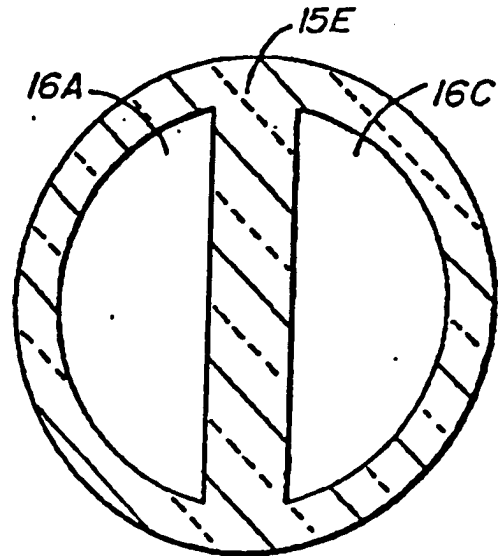


FIG. 5B

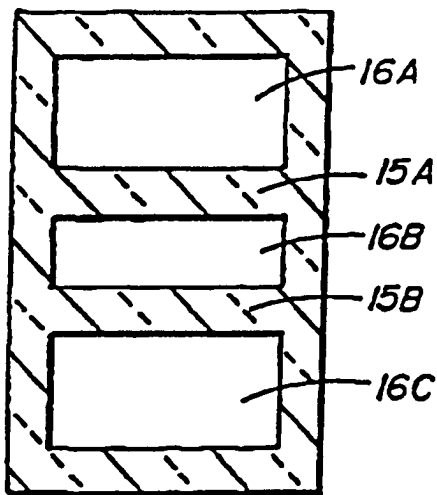


FIG. 5C

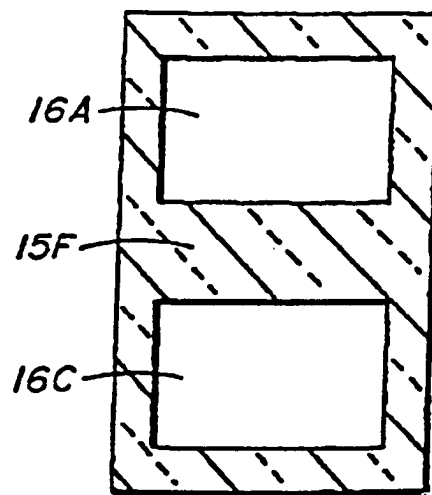


FIG. 5D

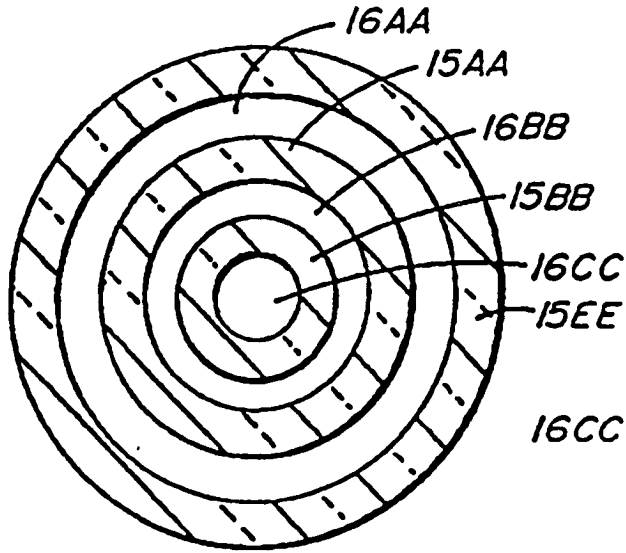


FIG. 5E

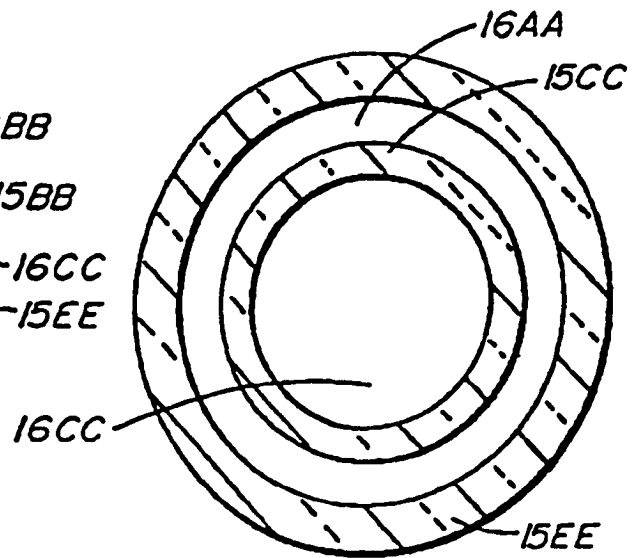


FIG. 5F

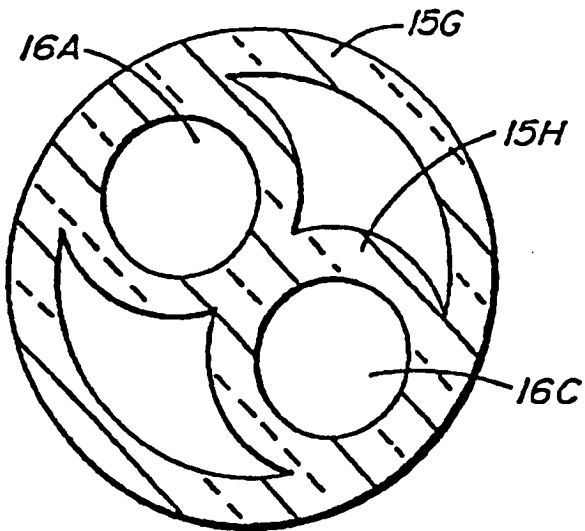


FIG. 5G

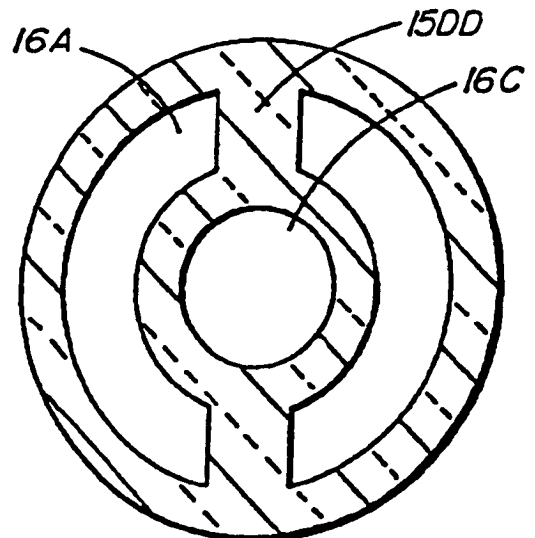
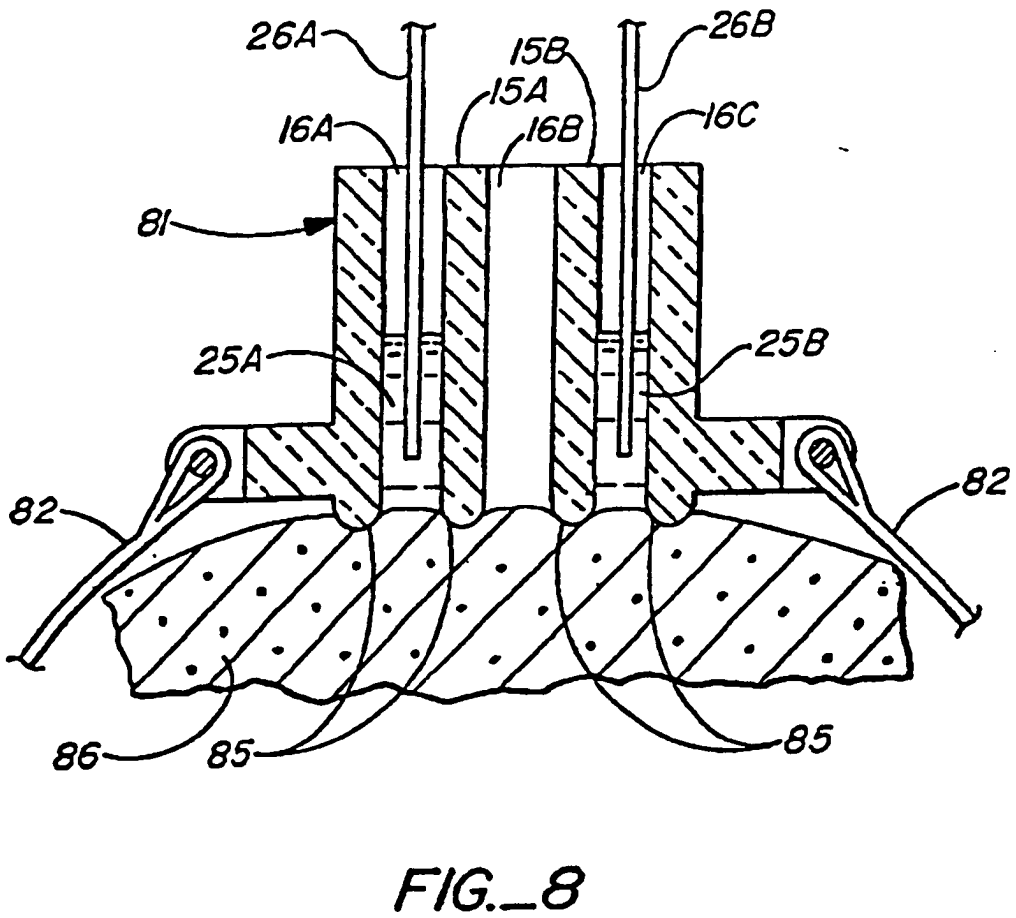
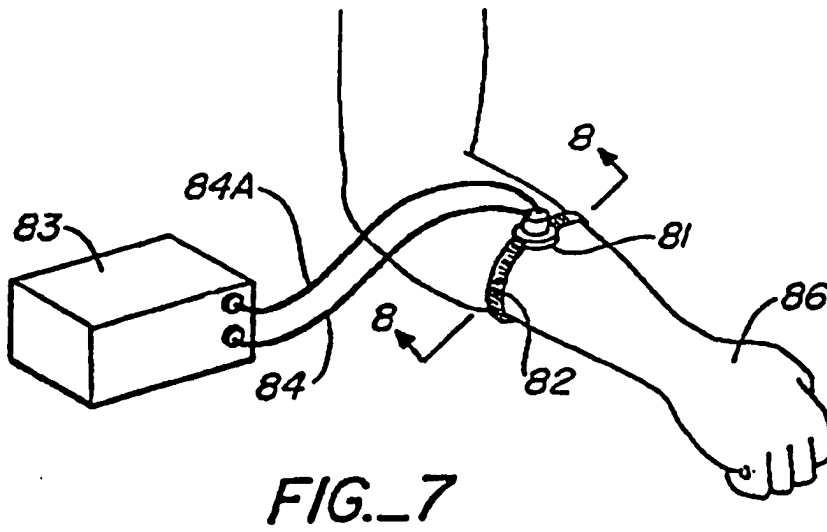


FIG. 5H



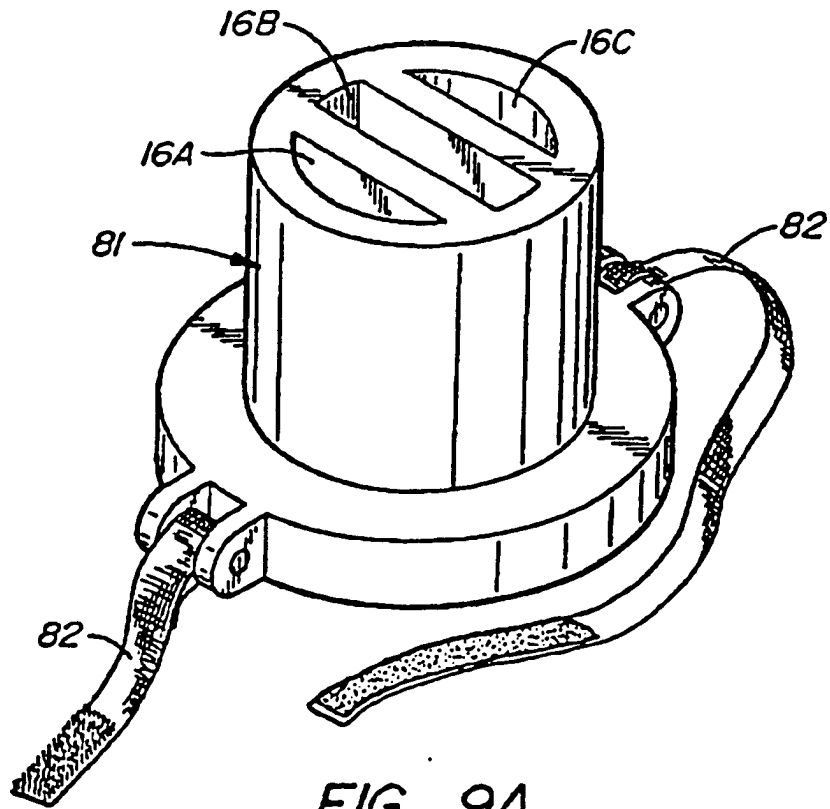


FIG. 9A

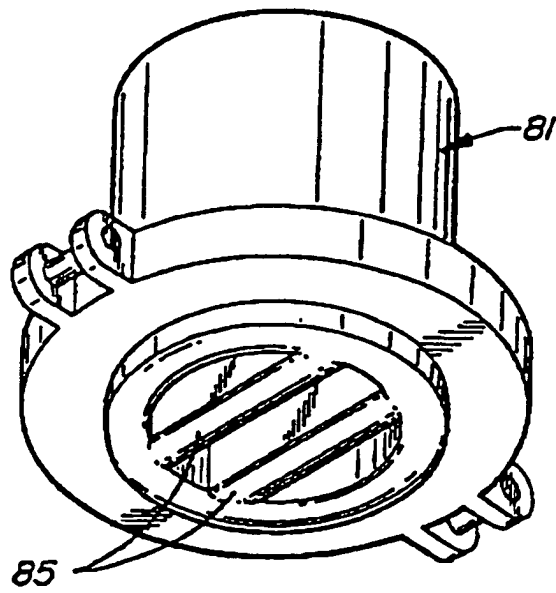


FIG. 9B

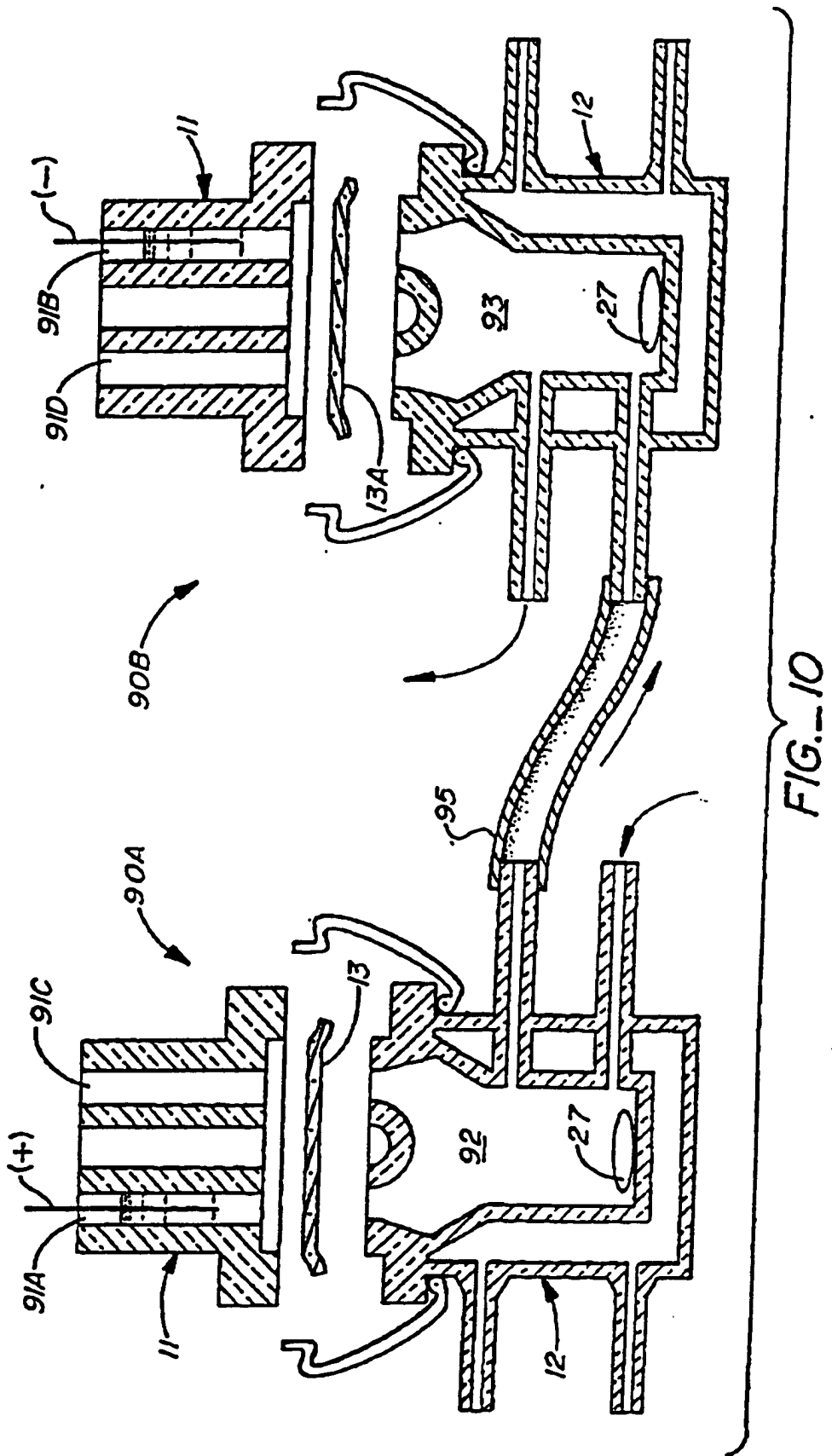
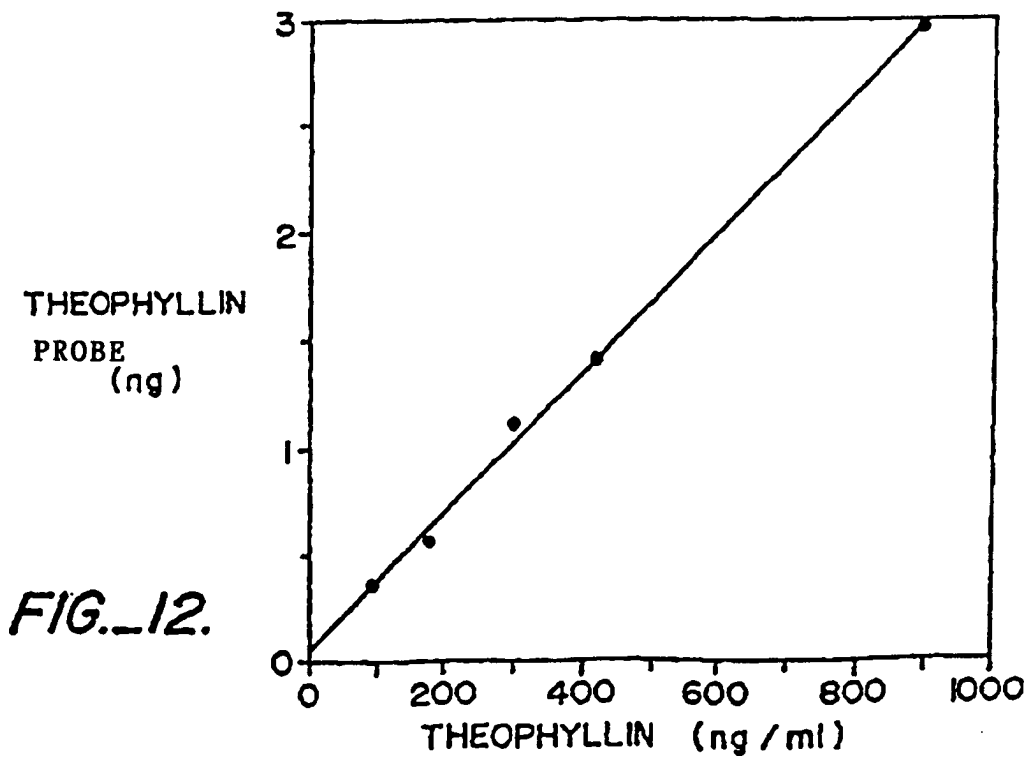
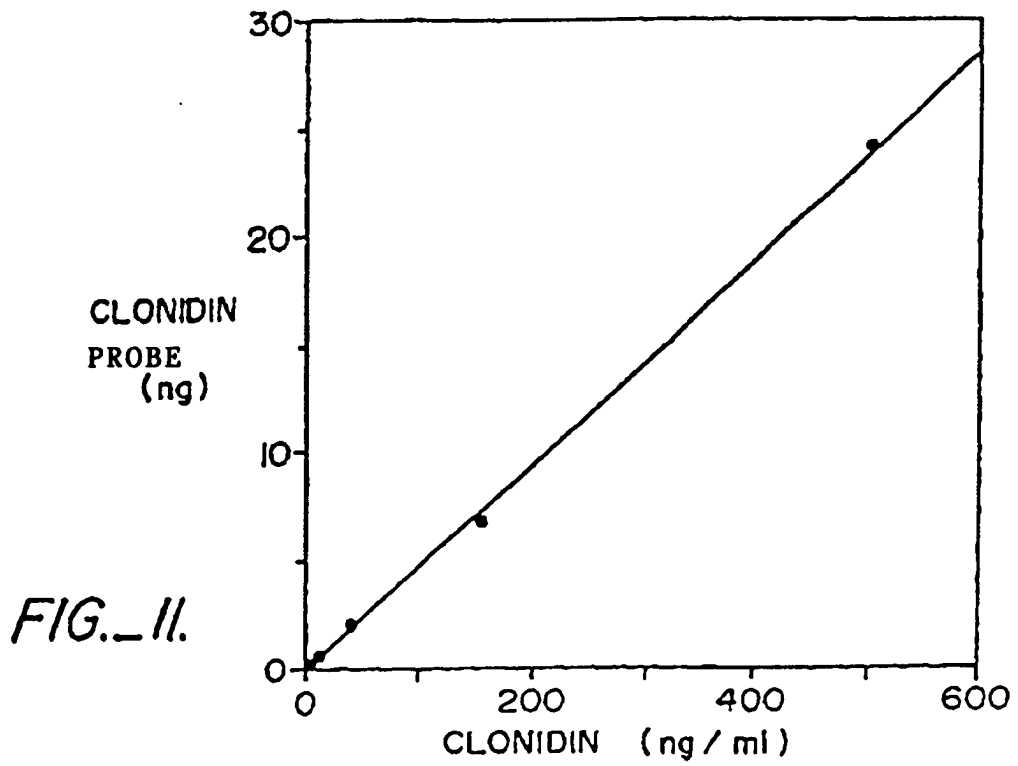


FIG. 10



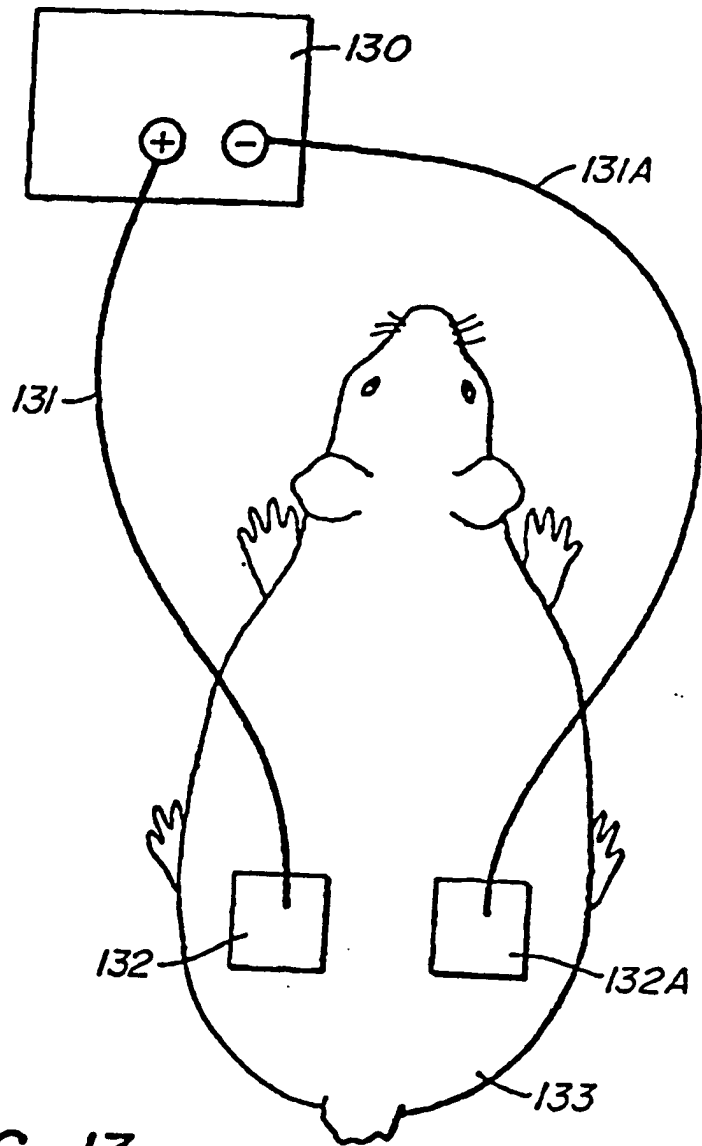


FIG. 13.

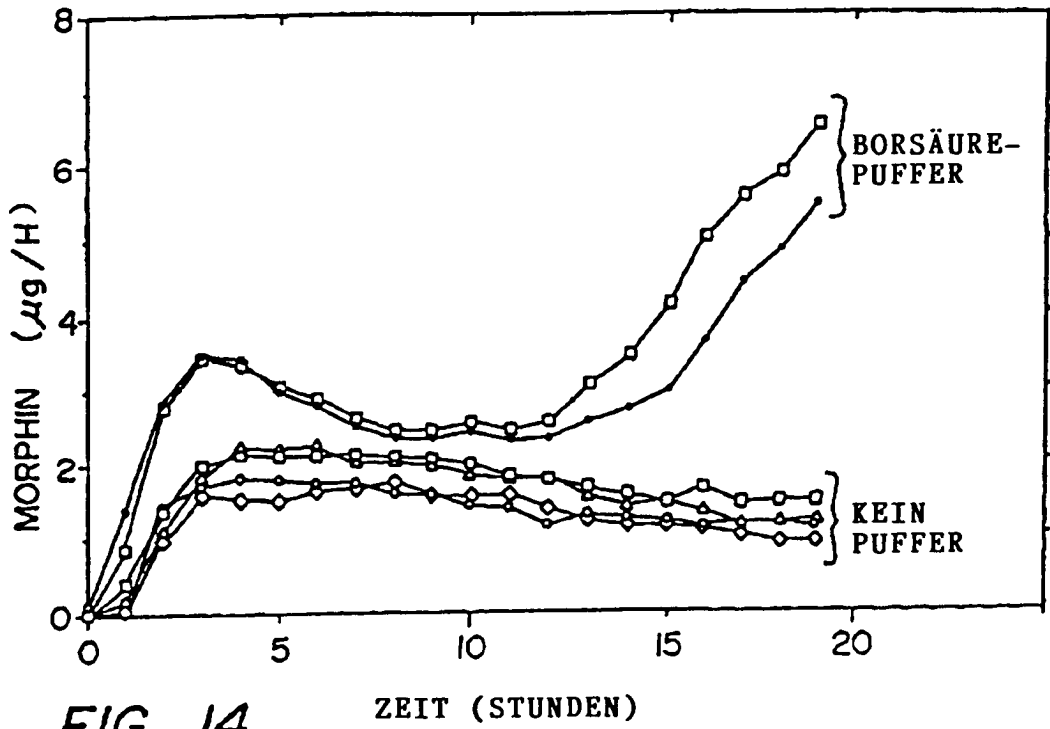


FIG. 14.

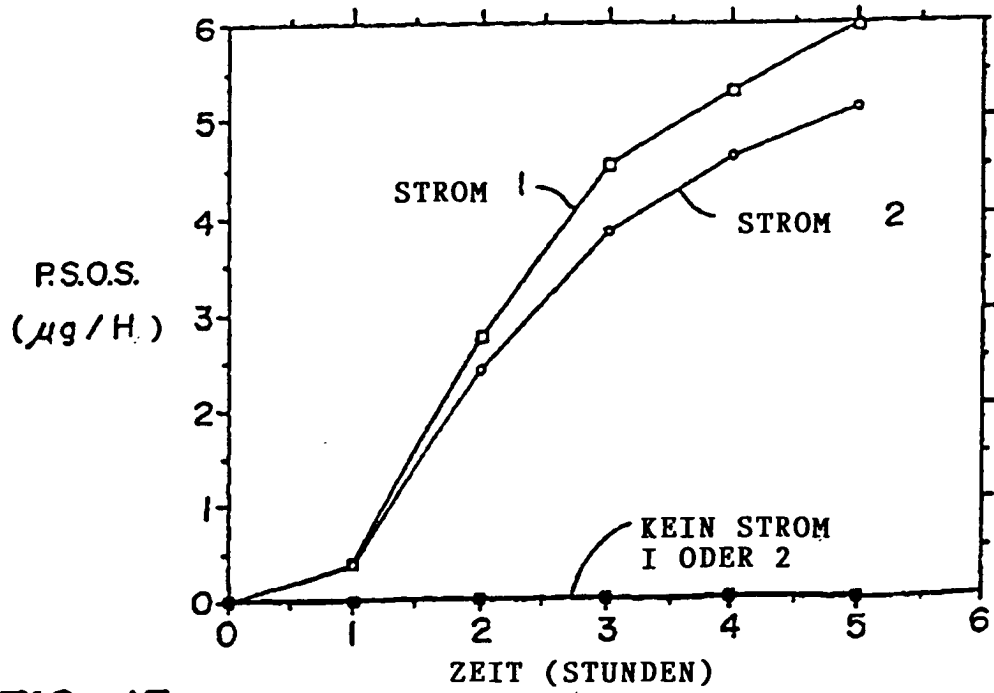


FIG. 15.