

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522460
(P2004-522460A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 B 5/00	A 6 1 B 5/00	2 G O 4 5
G O 1 N 1/10	G O 1 N 1/10	2 G O 5 2
G O 1 N 33/48	G O 1 N 33/48	S
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	A
G O 1 N 37/00	G O 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 198 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-587645 (P2001-587645)
 (86) (22) 出願日 平成13年5月30日 (2001.5.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年11月29日 (2002.11.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/017081
 (87) 国際公開番号 W02001/091626
 (87) 国際公開日 平成13年12月6日 (2001.12.6)
 (31) 優先権主張番号 60/208,327
 (32) 優先日 平成12年6月1日 (2000.6.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

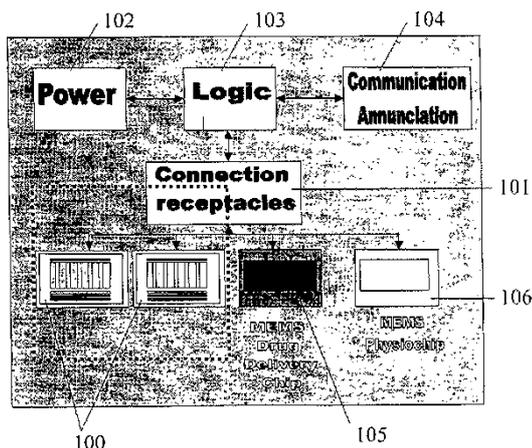
(71) 出願人 500089996
 サイエンス アプリケーションズ インター
 ナショナル コーポレイション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121 サン ディエゴ キャンパス ポ
 イント ドライブ 10260
 (71) 出願人 594140915
 ジョージタウン・ユニバーシティ
 GEORGETOWN UNIVERSIT
 Y
 アメリカ合衆国ディ・シー20057、
 ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティ
 ーセブンス・アンド・オー・ストリート (番
 地の表示なし)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 健康状態をモニタリングするため、および経皮にて薬剤を送達するためのシステムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、被験者の皮膚より経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を回収し、送達するための、少なくとも1つの試料採取器、前記少なくとも1つの分析物を同定し定量するための、少なくとも1つの検出器システム、および(i)前記少なくとも1つの検出器からの入力データを受領し、保存する、(ii)被験者から得た他のデータと前記入力データを関連づける、(iii)出力情報を表示する、(iv)出力情報を他のシステムに送信する、および(v)前記少なくとも1つの試料採取器および少なくとも1つの検出器の操作を制御するための少なくとも1つの論理モジュールを含む経皮サンプリングのためのシステムおよび方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

経皮サンプリングシステムであって、
被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも 1 つの分析物を、採取および送達するための少なくとも 1 つの試料採取器、
前記少なくとも 1 つの分析物を同定および定量するための少なくとも 1 つの検出器システム、

(i) 前記少なくとも 1 つの検出器からの入力データを受信し、保存する、(i i) 被験者から得た他のデータと、前記入力データを関連づける、(i i i) 出力情報を表示する、(i v) 出力情報を他のシステムに送信する、(v) 前記少なくとも 1 つの試料採取器、および少なくとも 1 つの検出器の操作を制御するための少なくとも 1 つの論理モジュール、を含むシステム。

10

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの試料採取器が、マイクロ流体アセンブリを含む微細加工器具である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記マイクロ流体アセンブリが、少なくとも 1 つのレザーバ、および少なくとも 1 つの管を通して前記少なくとも 1 つの分析物を採取し、送達するために前記レザーバに連結した前記少なくとも 1 つの管を含み、前記少なくとも 1 つの管を通して採取され、送達された前記少なくとも 1 つの分析物を検出するために、前記少なくとも 1 つの検出器が前記少なくとも 1 つの管に連結している、請求項 2 に記載のシステム。

20

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの試料採取器がさらに、被験者の皮膚から前記少なくとも 1 つの分析物を採取するために、被験者の皮膚の透過性を増強するための手段を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を採取することを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 6】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮からの間質液へのアクセスを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項 4 に記載のシステム。

30

【請求項 7】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の採取を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部分を切除するのに効果的なように放射線を生成し、被験者の皮膚表面に照射するために配置した放射線源を備える、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記放射線源が光源である、請求項 7 に記載のシステム。

40

【請求項 9】

前記光源がレーザーである、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 10】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の拡散を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部分を切除するのに効果的なように放射線を生成し、被験者の皮膚表面に照射するために配置した放射線源を備える、請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 11】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、(i) 皮膚の表面を化学的に変化させるための手段、(i i) 皮膚の表面に穴を開ける手段、(i i i)、皮膚の表面を可溶性にする

50

手段、(iv)皮膚の切除を引き起こすのに十分な光線を皮膚の表面に照射する手段、および(v)皮膚の切除を引き起こすのに十分な放射線を皮膚の表面に照射する手段のうち少なくとも1つである、請求項4に記載のシステム。

【請求項12】

前記少なくとも1つの試料採取器が複数の試料採取器から成り、前記少なくとも1つの検出器システムが複数の検出器システムから成る、請求項1に記載のシステム。

【請求項13】

前記少なくとも1つの検出器システムが、蛍光団を励起するのに十分な光源からなる光学検出システム、および励起された蛍光団からの蛍光を検出するための少なくとも1つの検出器を含む、請求項1に記載のシステム。

10

【請求項14】

前記光源が少なくとも1つのLEDを含む、請求項13に記載のシステム。

【請求項15】

前記光源が少なくとも1つのレーザーを含む、請求項13に記載のシステム。

【請求項16】

前記少なくとも1つのレーザーが流体を含み、前記少なくとも1つの管内への前記少なくとも1つの分析物の流れを促進するために、被験者の皮膚に前記流体を送達するために配置する、請求項3に記載のシステム。

【請求項17】

前記少なくとも1つのレーザー内に含まれる前記流体が、被験者の皮膚に浸透することが可能である、請求項16に記載のシステム。

20

【請求項18】

被験者からの分析物サンプリングの前に、前記レーザー内に前記流体を保持しておくための破壊可能シールをさらに備える、請求項16に記載のシステム。

【請求項19】

被験者の皮膚へ試料採取器を接着させるために、前記試料採取器上に接着剤をさらに備える、請求項1に記載のシステム。

【請求項20】

対象分析物に結合可能である、前記試料採取器内に位置する少なくとも1つの基質をさらに含み、前記基質が前記少なくとも1つの検出器システムによって検出可能である、請求項1に記載のシステム。

30

【請求項21】

被験者の皮膚との接触部分に前記流体を送り込むためのポンプをさらに備える、請求項16に記載のシステム。

【請求項22】

前記流体が被験者の皮膚との接触部分に送り込まれたところに近接した場所にて、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定される、マイクロヒーターをさらに備える、請求項21に記載のシステム。

【請求項23】

前記少なくとも1つの論理モジュールによって入力データと関連づけるために、前記他のデータとして規定の生理学的データをモニタリングするための方法をさらに含む、請求項1に記載のシステム。

40

【請求項24】

前記少なくとも1つの論理モジュールによって入力データと関連づけるために、前記他のデータとして環境状態データをモニタリングするための方法をさらに含む、請求項1に記載のシステム。

【請求項25】

前記少なくとも1つの検出器システムが、前記少なくとも1つの分析物との接触にตอบสนองして変色するために、少なくとも1つの分析物に対して感受性のパッチ、および前記パッチの変色を検出するための少なくとも1つの検出器を備える、請求項1に記載のシステム。

50

【請求項 26】

被験者の遠隔モニタリングを可能にするための微細加工器具であって、被験者の皮膚より経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を、採取し送達するための少なくとも1つの試料採取器ユニット体、被験者から回収した少なくとも1つの分析物を同定し定量するための前記少なくとも1つの試料採取器ユニット体に連結した、少なくとも1つの検出器システム、および前記検出システムによって検出された少なくとも1つの分析物に関連したデータを、論理モジュールによって処理するために、および理論的モジュールによって微細加工器具の制御を可能にするために、送達するための送信器/受信器を備える微小加工器具。

【請求項 27】

試料ユニット体がさらに、マイクロ流体アセンブリを備える、請求項 26 に記載の器具。

10

【請求項 28】

前記マイクロ流体アセンブリが、少なくとも1つの管を介して前記少なくとも1つの分析物を採取し送達するための、少なくとも1つのレザーバ、および前記レザーバに連結した前記少なくとも1つの管、および前記少なくとも1つの管を介して採取され送達された前記少なくとも1つの分析物を検出するための、前記少なくとも1つの管に連結している前記少なくとも1つの検出器を備える、請求項 27 に記載の器具。

【請求項 29】

前記少なくとも1つの試料採取器ユニット体がさらに、被験者の皮膚から少なくとも1つの分析物を採取するために、被験者の皮膚の透過性を増強するための手段を備える、請求項 26 に記載の器具。

20

【請求項 30】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を採取することを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定された、マイクロヒーターを備える、請求項 29 に記載の器具。

【請求項 31】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮から間質液の拡散を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部分を切除するのに効果的なように、放射線を生成し、被験者の皮膚表面に照射するために配置した放射線源を備える、請求項 29 に記載の器具。

30

【請求項 32】

前記放射線源が光源である、請求項 31 に記載の器具。

【請求項 33】

前記光源がレーザーである、請求項 32 に記載の器具。

【請求項 34】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、(i) 皮膚の表面を化学的に変化させるための手段、(ii) 皮膚の表面に穴を開ける手段、(iii) 皮膚の表面を可溶性にする手段、(iv) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な光線を皮膚の表面に照射する手段、および(v) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な放射線を皮膚の表面に照射する手段のうち少なくとも1つである、請求項 29 に記載の器具。

40

【請求項 35】

前記少なくとも1つの試料採取器ユニット体が複数のサンプリング管から成り、前記少なくとも1つの検出器システムが複数の検出器システムから成る、請求項 26 に記載の器具。

【請求項 36】

前記少なくとも1つの検出器システムが、蛍光団を励起するのに効果的である光源からなる光学検出システムを備え、励起された蛍光団からの蛍光を検出するための少なくとも1つの検出器を備える、請求項 1 に記載の器具。

【請求項 37】

前記光源が少なくとも1つのLEDを備える、請求項 36 に記載の器具。

50

【請求項 38】

前記光源が少なくとも1つのレーザーを備える、請求項36に記載の器具。

【請求項 39】

前記少なくとも1つのレーザーが流体を含み、前記少なくとも1つの管内へ前記少なくとも1つの分析物の流れを促進するために、被験者の皮膚へ前記流体を送達するために配置する、請求項28に記載の器具。

【請求項 40】

前記少なくとも1つのレーザーに含まれる前記流体が、被験者の皮膚を透過することが可能である、請求項39に記載の器具。

【請求項 41】

被験者から分析物をサンプリングする前に、前記レーザー内に前記流体を保持するための破壊可能シールをさらに備える、請求項39に記載の器具。

10

【請求項 42】

被験者の皮膚へ試料を接着させるため前記試料採取器上に接着剤をさらに備える、請求項26に記載の器具。

【請求項 43】

対象分析物に結合可能である前記試料採取器ユニット体内に少なくとも1つの基質をさらに含み、前記基質が前記少なくとも1つの検出器システムによって検出可能である、請求項26に記載の器具。

【請求項 44】

前記少なくとも1つの検出器システムが、前記少なくとも1つの分析物との接触に反応して変色させるために、少なくとも1つの分析物に感受性があり、前記少なくとも1つの分析物との接触のために前記試料採取器ユニット体内に位置するパッチ、およびパッチの変色を検出するために配置する、前記試料採取器ユニット体内の少なくとも1つの検出器を備える、請求項26に記載の器具。

20

【請求項 45】

前記試料採取器ユニット体が、そこより伸びたキャピラリー管のアレイを有するシリコン体であり、前記キャピラリー管を介して、被験者の皮膚からの分析物をサンプリングすることを目的とし、少なくとも1つの検出器チャンバーが、キャピラリーチャンバー内で受領した分析物を検出するために、前記キャピラリー管に連結して、前記少なくとも1つの

30

【請求項 46】

前記少なくとも1つの試料採取器が、被験者の皮膚から前記少なくとも1つの分析物を採取するために、被験者の皮膚の透過性を増強するための手段をさらに備える、請求項45に記載の器具。

【請求項 47】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を採取することを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項46に記載の器具。

【請求項 48】

透過性を増強するための前記手段が被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を拡散させることを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項46に記載の器具。

40

【請求項 49】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の採取を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するのに効果的なように、放射線を生成し、被験者の皮膚表面に照射するために配置された放射線源を含む、請求項46に記載の器具。

【請求項 50】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の拡散を

50

可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するのに効果的なように、放射線を生成し、被験者の皮膚表面に放射するために配置された放射線源を含む、請求項 4 6 に記載の器具。

【請求項 5 1】

前記放射線源が光源である、請求項 5 0 に記載の器具。

【請求項 5 2】

前記光源がレーザーである、請求項 5 1 に記載の器具。

【請求項 5 3】

皮膚の透過性を増強するための前記手段が、(i) 皮膚の表面を化学的に変化させるための手段、(i i) 皮膚の表面に穴を開ける手段、(i i i)、皮膚の表面を可溶性にする手段、(i v) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な光線を皮膚の表面に照射する手段、および(v) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な放射線を皮膚の表面に照射する手段のうち少なくとも 1 つである、請求項 4 6 に記載の器具。

10

【請求項 5 4】

前記少なくとも 1 つの検出器システムが、蛍光団を励起するのに効果的である光源からなる光学検出システムを備え、励起された蛍光団からの蛍光を検出するための少なくとも 1 つの検出器を備える、請求項 4 6 に記載の器具。

【請求項 5 5】

前記光源が少なくとも 1 つの LED を備える、請求項 5 4 に記載の器具。

【請求項 5 6】

前記光源が少なくとも 1 つのレーザーを備える、請求項 5 4 に記載の器具。

20

【請求項 5 7】

前記シリコン体が、少なくとも 1 つの前記キャピラリー管内に、前記少なくとも 1 つの分析物の流れを促進するために、被験者の皮膚に前記流体を送達するために、流体の保持が可能で前記キャピラリー管と連結した少なくとも 1 つのレーザーバを含む、請求項 4 6 に記載の器具。

【請求項 5 8】

前記シリコン体がさらに、前記流体が被験者の皮膚との接触部分に送達されるところに近接した場所に、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されるマイクロヒーターをさらに備える、請求項 5 7 に記載の器具

30

【請求項 5 9】

被験者の皮膚から分析物をサンプリングするための微細加工器具であって、被験者の皮膚から採取した分析物を受領するための検出チャンバー、前記検出チャンバーと連結した前記微細加工器具に密着して配置された光子源、および前記検出チャンバー内で受領された分析物を検出するための前記検出チャンバーと連結した検出器を含む光子検出システム、を含む器具。

【請求項 6 0】

前記光子源が少なくとも 1 つの LED である、請求項 5 9 に記載の器具。

40

【請求項 6 1】

前記光子源が少なくとも 1 つのレーザーである、請求項 5 9 に記載の器具。

【請求項 6 2】

選択された分析物に結合し、前記光子源が放射線をアプラインする場合に蛍光を発する基質を前記器具中にさらに含む、請求項 5 9 に記載の器具。

【請求項 6 3】

被験者の皮膚から分析物をサンプリングするための微細加工器具であって、被験者の皮膚から採取された分析物を受領するための検出チャンバー、前記検出チャンバーと連結した前記微細加工器具に密着して配置され、規定の分析物と接触した場合に変色するパッチ、

50

規定の分析物の存在を示唆しているパッチの変色を検出するための、前記検出チャンバーに接続した検出器、
からなる器具。

【請求項 6 4】

被験者の皮膚から採取した分析物をサンプリングし、検出するための微細加工器具であって、

被験者の皮膚からの分析物を採取し、検出器に送達するための少なくとも 1 つの管、
被験者の皮膚から少なくとも 1 つの分析物を採取するために、被験者の皮膚の透過性を増強するための手段、
を含む器具。

10

【請求項 6 5】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を採取することを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項 6 4 に記載の器具。

【請求項 6 6】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の皮膚表面に近接して配置され、被験者の基底生存表皮から間質液を拡散させることを可能にするように、被験者の皮膚の表皮角質の一部を切除するために設定されたマイクロヒーターを備える、請求項 6 4 に記載の器具。

【請求項 6 7】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の採取を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部分を切除するのに効果的なように、放射線を生成し被験者の皮膚表面に照射するために配置された放射線源を含む、請求項 6 4 に記載の器具。

20

【請求項 6 8】

透過性を増強するための前記手段が、被験者の基底生存表皮からの間質液の拡散を可能にするため、被験者の皮膚の表皮角質の一部分を切除するのに効果的なように、放射線を生成し被験者の皮膚表面に照射するために配置された放射線源を含む、請求項 6 4 に記載の器具。

【請求項 6 9】

前記放射線源が光源である、請求項 6 7 に記載のシステム。

30

【請求項 7 0】

前記光源がレーザーである、請求項 6 9 に記載のシステム。

【請求項 7 1】

皮膚の透過性を増強するための前記方法が、(i) 皮膚の表面を化学的に変化させるための手段、(i i) 皮膚の表面に穴を開ける手段、(i i i)、皮膚の表面を可溶性にする手段、(i v) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な光線を皮膚の表面に照射する手段、および(v) 皮膚の切除を引き起こすのに十分な放射線を皮膚の表面に放射する手段のうち少なくとも 1 つである、請求項 6 4 に記載のシステム。

【請求項 7 2】

経皮サンプリングシステムであって、

被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも 1 つの分析物を採取し、送達するためのマイクロ流体アセンブリ、

前記少なくとも 1 つの分析物を同定し定量するための少なくとも 1 つの検出器システム、
(i) 前記少なくとも 1 つの検出器からの入力データを受領し、保存する、(i i) 被験者から得た他のデータと前記入力データを関連づける、(i i i) 出力情報を表示する、
(i v) 出力情報を他のシステムに送信する、(v) 前記少なくとも 1 つの試料採取器および少なくとも 1 つの検出器の操作を制御するための少なくとも 1 つの論理モジュールを含むシステム。

40

【請求項 7 3】

マイクロ流体アセンブリが少なくとも 1 つの湾曲キャピラリーチャンネルを備える、請求項

50

7 2 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 7 4】

マイクロ流体アセンブリがさらに、
少なくとも 1 つのレーザーバチャネル、
少なくとも 1 つの底部キャッピング部分、
少なくとも 1 つの上部キャッピング部分、
を備える、請求項 7 2 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 7 5】

少なくとも 1 つのレーザーバチャネルが、少なくとも 1 つのレーザーバチャネル内に生理学的に適合性のある流体を保持するために、少なくとも 1 つのシールをさらに備える、請求項 7 2 に記載の経皮サンプリングシステム。

10

【請求項 7 6】

少なくとも底部キャッピング部分がマイクロヒーティング要素を備える、請求項 7 4 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 7 7】

前記マイクロヒーティング要素が表皮角質を切除するために使用される、請求項 7 6 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 7 8】

前記マイクロヒーティング要素が少なくとも 1 つのシールを破裂させるために使用される、請求項 7 6 に記載の経皮サンプリングシステム。

20

【請求項 7 9】

前記マイクロヒーティング要素が表皮角質を切除し、少なくとも 1 つのシールを破裂させるために使用される、請求項 7 6 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 0】

前記少なくとも 1 つの上部キャッピング部分が 2 つ以上の電極を備える、請求項 7 4 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 1】

前記 2 つ以上の電極が少なくとも 1 つの湾曲キャピラリーチャンネルを介して、生理学的に適合性のある流体の流れをサポートする、請求項 8 0 に記載の経皮サンプリングシステム。

30

【請求項 8 2】

前記マイクロ流体アセンブリが少なくとも 1 つの分析物を検出するためのセンサーをさらに備える、請求項 7 4 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 3】

前記センサーが蛍光団を励起するのに効果的な少なくとも 1 つの光源を備える光学的検出システムを備え、励起された蛍光団からの蛍光を検出するための少なくとも 1 つの検出器を備える、請求項 8 2 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 4】

前記少なくとも 1 つ光源が少なくとも 1 つの LED を備える、請求項 8 3 に記載の経皮サンプリングシステム。

40

【請求項 8 5】

前記少なくとも 1 つの光源が、少なくとも 1 つのレーザーを備える、請求項 8 3 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 6】

前記少なくとも 1 つの分析物を検出するための前記センサーが、少なくとも 1 つの分析物との接触に反応して変色するための、少なくとも 1 つの分析物に感受性のパッチ、および前記パッチの変色を検出するための少なくとも 1 つの検出器を備える、請求項 8 2 に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 8 7】

経皮サンプリングシステムであって、

50

被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を採取し、送達するためのマイクロ流体アセンブリ、

前記少なくとも1つの分析物を同定し定量するための少なくとも1つの検出器システム、
 (i) 前記少なくとも1つの検出器からの入力データを受領し、保存する、(ii) 被験者から得た他のデータと前記入力データを関連づける、(iii) 出力情報を表示する、
 (iv) 出力情報を他のシステムに送信する、(v) 前記少なくとも1つの試料採取器および少なくとも1つの検出器の操作を制御するための少なくとも1つの論理モジュールを含み、

前記マイクロ流体アセンブリが、被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を採取し送達するための、生理学的に適合性のある流体を含み、

10

前記マイクロ流体アセンブリが被験者の皮膚に接着する、
 経皮サンプリングシステム。

【請求項88】

前記被験者の皮膚へのマイクロ流体アセンブリの接着が接着剤により達成される、請求項87に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項89】

前記接着剤が、被験者の皮膚から経皮サンプリングシステムが動くのを防止するために使用される、請求項88に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項90】

前記接着剤が、生理学的に適合性のある流体の欠失を防止するために使用される、請求項87に記載の経皮サンプリングシステム。

20

【請求項91】

接着剤が不透水性である、請求項89に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項92】

経皮サンプリングシステムであって、

被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を採取し、送達するためのマイクロ流体アセンブリ、

前記少なくとも1つの分析物を同定し定量するための少なくとも1つの検出器システム、
 (i) 前記少なくとも1つの検出器からの入力データを受領し、保存する、(ii) 被験者から得た他のデータと前記入力データを関連づける、(iii) 出力情報を表示する、
 (iv) 出力情報を他のシステムに送信する、(v) 前記少なくとも1つの試料採取器および少なくとも1つの検出器の操作を制御するための少なくとも1つの論理モジュールを含み、

30

前記少なくとも1つのマイクロ流体アセンブリの表面が改変されている、経皮サンプリングシステム。

【請求項93】

少なくとも1つのマイクロ流体アセンブリの表面の前記改変が、マイクロ流体アセンブリの少なくとも1つの表面へのタンパク質の吸着を防止する、請求項92に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項94】

40

少なくとも1つのマイクロ流体アセンブリの表面の前記改変が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する少なくとも1つの特異的結合分子をマイクロ流体アセンブリの少なくとも1つの表面に接着させる、請求項92に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項95】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの蛍光標識分析物と結合し、被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物が、結合した少なくとも1つの蛍光標識分析物に置き代わり、

少なくとも1つの特異的結合分子から置き代わった蛍光の量の測定が、被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物の量と相関する、

請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

50

【請求項 96】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する抗体である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 97】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する抗体フラグメントである、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 98】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する人工抗体である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 99】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する人工抗体である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 100】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合するレクチンである、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 101】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合するハイブリッド可能核酸である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 102】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合する核酸結合タンパク質である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 103】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合するタンパク質結合タンパク質である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 104】

前記少なくとも1つの特異的結合分子が、少なくとも1つの分析物に特異的に結合するコファクター結合タンパク質である、請求項94に記載の経皮サンプリングシステム。

【請求項 105】

被験者の状態を生物医学的にモニタリングする方法であって、
被験者の皮膚にて間質液を灌流するために被験者の皮膚を切除すること、
被験者の切除した皮膚から間質液を採取すること、
採取した間質液中に含まれる選択した分子の少なくとも1種を同定し、定量することを含む方法。

【請求項 106】

前記分子の少なくとも1種がストレスの代謝マーカーである、請求項105に記載の方法。

【請求項 107】

前記分子の少なくとも1種が、有機リン殺虫剤、細菌毒素、細菌毒素に対する炎症性続発症、孢子代謝物、プレアルブミン、C反応型タンパク質、トロポニンI、エストロゲン、およびテストステロンのうち少なくともいずれか1つである、請求項105に記載の方法。

【請求項 108】

被験者のバイタル生理学的統計値の少なくとも1つをモニタリングすることをさらに含む、請求項105に記載の方法。

【請求項 109】

前記少なくとも1つの被験者のバイタル生理学的統計値が、体温、脈拍、血圧および心臓活性の少なくとも1つを含む、請求項108に記載の方法。

【請求項 110】

被験者が生活する環境状態をモニタリングし検出することをさらに含む、請求項105に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 1】

前記同定および定量が、前記少なくとも 1 種の分子を前記少なくとも 1 種の分子と接触した時に変色するパッチに送達すること、およびパッチの変色を検出することを含む、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記同定および定量が、照射した時に蛍光を発する第二の種類分子と、前記少なくとも 1 種の分子を結合させること、前記第二の種類分子に結合した前記第一の種類分子に照射すること、および得られた蛍光を検出することを含む、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記放射線源がレーザーである、請求項 1 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 4】

前記放射線源が LED である、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(関連特許の相互参照)

本明細書は、2000年6月1日に申請した、仮出願番号第60/208,327号、表題「経皮健康モニタリングと薬物送達システム (TRANSDERMAL HEALTH MONITORING AND DRUG DELIVERY SYSTEM)」の優先権を請求し、そのすべてを参考文献として組み込む。

【0 0 0 2】

20

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、全般的に携帯式の生物医学的モニタリングに関する。さらに詳しくは本発明は、非侵襲的および低侵襲的分子モニタリング、および任意に、遠隔測定法を介した保護フィードバック測定および遠隔モニタリングの実施に関する。

【0 0 0 3】

(関連技術の説明)

体液の非侵襲的経皮サンプリングは、長い間医学研究における目標であった。血流内の重要な分析物の濃度を含む価値のある診断情報を、皮膚の損傷なしに得ることができるという見解が、多くの研究領域の進展を促進してきた。そのような技術により、ニードルまたは外来患者介護を用いない、長期の便利な健康状態モニタリングおよびスクリーニングが現実のものとなりつつある。糖尿病は、採血することなく血液グルコースをモニタリングすることができ、細菌、真菌またはウイルス感染のマーカーに関してモニタリング可能であり、毒素への環境的曝露は非侵襲的に検査できる。

30

【0 0 0 4】

人の生命に対して有害であり、毒性であると考えられる環境化学物質に対する曝露レベルを検出、測定および評価するために、生体マーカーが効果的に利用されてきた。生体マーカーに感受性があるため、これらのマーカーは環境中の微妙な変化に対する警告指標として使用可能である。これらマーカーの特異性は、化学薬剤の特性を確立するため、曝露レベルを測定するため、および作用の好適な経路を確定するために使用することができる。環境により誘発された疾患はある程度まですべての人に影響を与えるが、個人の感受性により、1つの群に他を上回る程度の毒性反応を引き起こす傾向を生ずる。1996年に86,912件の農薬曝露が、アメリカ毒物センター協会 (American Association of Poison Centers) に報告されており、うち26件は致命的なものであることは考慮する価値がある。特に重要な身体機能がそのような曝露に耐え、処理し、扱うことができるレベルにまで成熟していないので、胎児時期から青年期までの発達段階における者が、そのような環境ストレスにとりわけ感受性である。子供の環境上の健康を測定する生体マーカーの使用により、毒素の早期検出および身体状態における障害の予防、ならびに毒性環境に曝露された子供に対する治療方法の決定ができるようになるであろう。

40

50

【0005】

小児科学分野でとりわけ重要なのは、低侵襲的な健康評価ツールを使用することである。

【0006】

多くの経皮サンプリング技術が報告されているが、現在までそのすべてが複数の重大な欠点を抱えている。従来の技術は、受動的で、汗に依存しない経皮分析物の採取および検出技術を除いては、著しく侵襲的（および有害の可能性あり）であり、汗または間質液に依存するという欠点がある。

【0007】

経皮サンプリングに対する1つのアプローチでは、汗の採取を用いてきた。たとえば、M . Philips and M . H . McAlloon . Alcohol Clin . Exp . Res . 4391 (1980) は、閉塞性接着カバーで覆った塩浸漬のセルロースパッドである、吸着パッドを開示している。しかしながら、経皮サンプリングのそのような方法は、発汗率に依存し、遠心による汗の抽出が必要であり、外部化学分析を必要とする。S . Balabanova and E . Schneider . Beitr . Ger . richtl . Med 48 , 45 (1990) は、ピロカルピン (Pilocarpine) 誘導による汗分泌を開示しているが、このシステムはピロカルピンのイオントフォーシス誘導注入および分析物希釈を必要とする。Schoendorfer et al . に付与された米国特許第5 , 203 , 327号は、水蒸気浸透性の閉塞性接着カバーで覆った吸着パッドを開示しているが、本システムは発汗率に依存し、化学的抽出および外部化学分析を必要とする。F . P . Smith and D . A . Kidwell , Forensic Sci . Int . 83 , 179 (1996) は綿製の汗ワイブを開示しているが、本システムは発汗量に依存し、抽出および外部化学分析を必要とする。G . L . Henderson and B . K . Wilson , Res . Commun . Chem . Pathol . Pharmacol . 5 , 1 (1973) は、運動後の液体汗の採取を開示しているが、このシステムは活発な運動を必要とし、発汗量依存であり、抽出と外部化学分析を必要とする。

10

20

【0008】

C . C . Peck , D . P . Conner , et al . Skin Pharmacol 1 , 14 (1988) は、閉塞性接着カバーで覆った分析物結合レザーバを備えたゲルを開示している。しかしながら、この参考文献は、抽出と外部化学分析を必要としている。

30

【0009】

Peckに付与された米国特許第4 , 909 , 256号は、閉塞性接着カバーで覆った乾燥結合レザーバを開示している。しかしながら、本参考文献は抽出と外部化学分析を必要としている。

【0010】

Peckに付与された米国特許第4 , 821 , 733号は、閉塞性接着カバーで覆った採取および検出システムを開示している。しかしながら、本参考文献は、高い感度の検出コンポーネントを必要としている。

【0011】

Jacquesに付与された米国特許第4 , 775 , 361号は、皮膚表面に対する分析物の遊走の増強を開示している。しかしながら、本参考文献は体内への光エネルギーの導入を必要としている。

40

【0012】

Guyに付与された米国特許第5 , 362 , 307号は、皮膚からのイオントフォーシス増強分析物採取を開示している。しかしながら、本参考文献は体内への電気エネルギーの導入を必要としている。

【0013】

Eppsteinに付与された米国特許第5 , 722 , 397号は、皮膚からの超音波増強分析物採取を開示している。しかしながら、本参考文献は体内への音響エネルギーおよ

50

び化学物質の導入を必要としている。

【0014】

E p p s t e i n に付与された米国特許第 5, 8 8 5, 2 1 1 号は、加熱水蒸気、物理的ランセット、音響エネルギー、液体の高圧ジェット、または電気を用いた、ミクロ細孔形成を開示している。しかしながら、本参考文献は、熱、音響、または電気エネルギー、力学的または水力学的力を用いて皮膚に穴を開ける必要がある。

【0015】

ウェブサイト、www.spectrx.com は、間質液の採取のための、レーザー誘導皮膚細孔への吸引の適用を開示している。しかしながら、本参考文献は間質液を採取するため体内への音響エネルギーおよび力学的エネルギーの導入を必要とし、炎症反応を引き起こす可能性がある。

10

【0016】

したがって、経皮サンプリング分野において、重要な生体医学マーカー類および環境毒素曝露を、迅速で安価に、そして大掛かりでなく痛みなくモニタリングするのに適した低侵襲的なサンプリング技術および器具が必要である。本発明のこれらの特性および利点が、以下の開示を読むことによって当業者に明らかになるであろう。

【0017】

(発明の要約)

本発明は、被験者の皮膚から経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を採取し、送達するための少なくとも1つの試料採取器、前記少なくとも1つの分析物を同定し、定量するための少なくとも1つの検出器システム、および(i)前記少なくとも1つの検出器からの入力データを受領し、保存する、(ii)被験者から得た他のデータと前記入力データを関連づける、(iii)出力情報を表示する、(iv)出力情報を他のシステムに送信する、(v)前記少なくとも1つの試料採取器および少なくとも1つの検出器の操作を制御するための少なくとも1つの論理モジュールを含む、経皮サンプリングシステムに関する。

20

【0018】

本発明はまた、被験者の遠隔モニタリングを可能にするための微細加工器具であって、被験者の皮膚より経皮的に採取した少なくとも1つの分析物を回収し、送達するための少なくとも1つの試料採取器ユニット体、被験者から採取した少なくとも1つの分析物を同定し、定量するための前記少なくとも1つの試料採取器ユニット体に連結した、少なくとも1つの検出器システム、および前記検出システムによって検出された、少なくとも1つの分析物に関連したデータを論理モジュールによって処理するために前記モジュールに送達し、論理モジュールによって微細加工器具の制御を可能にするための送信器/受信器を備える器具に関する。

30

【0019】

本発明はまた、被験者の皮膚から採取した分析物を受領するための検出チャンバー、および前記検出チャンバーと連結した前記微細加工器具に接続して位置する光子源および前記検出チャンバー内で受領された分析物を検出するための前記検出チャンバーと連結した検出器、を備える光子検出システムを含む、被験者の皮膚からの分析物をサンプリングするための微細加工器具に関する。

40

【0020】

本発明はまた、被験者の皮膚から採取した分析物を受領するための検出チャンバー、前記検出チャンバーと連結した前記微細加工器具に接続して位置する、規定の分析物に接触した場合に変色するパッチ、規定の分析物の存在を示すパッチの変色を検出するための、前記検出チャンバーと連結した検出器を含む、被験者の皮膚から分析物をサンプリングするための微細加工器具に関する。

【0021】

本発明はまた、被験者の皮膚から分析物を回収し、検出器へ送達するための少なくとも1つの管、および被験者の皮膚から前記少なくとも1つの分析物を採取するため、被験者の

50

皮膚の透過性を増強するための手段を備える、被験者の皮膚から採取した分析物をサンプリングし、検出するための微細加工器具に関する。

【0022】

本発明の目的は経皮サンプリングシステムを提供することである。

【0023】

本発明の他の目的はパッチタイプの検出器を用いた統合検出システムを提供することである。

【0024】

本発明のさらに他の目的は統合光子を用いた統合検出システムを提供することである。

【0025】

本発明のさらなる目的は生物学的分子の経皮送達を増強するための、マイクロ流体灌流システムを提供することである。

【0026】

本発明のまた他の目的は表皮角質の切除のための、抵抗加熱法による熱切除メカニズムを提供することである。

【0027】

本発明のまた他の目的は表皮角質の切除のための、レーザー切除メカニズムを提供することである。

【0028】

本発明のまた他の目的はキャピラリーの働きを用いた流体のマイクロ流体送達を提供することである。

【0029】

本発明の他の目的は皮膚上で経皮サンプリングシステムを保持するための接着剤を提供することである。

【0030】

本発明の他の目的は競合結合によって表面から放出され、下流にて検出される蛍光標識抗原を含む、抗体とのチャネル表面の化学的改変を提供することである。

【0031】

本発明およびその付随する利点は、以下に示す図面および詳細な記述を参照することによって理解されるであろう。

【0032】

(発明の詳細な記述)

本発明は、人の健康状態をモニタリングし、人に経皮的に薬物を送達するための機能強化システムおよび方法を提供する。とりわけ、本発明は総合的で、費用効率がよく迅速で大掛かりでない被験者の医学的状態の評価を提供する。本発明はさらに、被験者の医学的状態の上記評価に応じた、薬剤の経皮送達の手段を提供する。実施形態には、たとえば農薬曝露に関する被験者のモニタリング、兵士のストレス状態のモニタリング、感染または疾患状態を示すための、酵素N-アセチルトランスフェラーゼを用いた遺伝子型決定、有機リン系殺虫剤神経薬剤(タブン、サリン、ソマン)または有機リン系農薬(パラチオンおよびその代謝物)のいずれかの、人への外部曝露および内部汚染のモニタリング、微生物感染に应答した炎症性続発症(インターロイキン-1、インターロイキン-6、腫瘍壊死因子)のモニタリング、微生物毒素(アントラキシン、ボツリヌス毒素、エンドトキシン)のモニタリング、リンパ経路または肝臓経路を介したヒト異化作用から発生する孢子代謝物のモニタリング、カフェイン、アンチヒスタミン類(デキソメトファン、カフェイン)のような刺激物のモニタリング、血中グルコース濃度の変化、またはインスリン/グルコースの代謝物の変化を介したストレスのモニタリングが含まれる。

【0033】

本発明の好ましい実施形態の全体の構造は図1に示されている。対象分析物を検出するために、使い捨てB-FIT100を採用し、B-FITの温度ヒーターへの電気接続を含む、機械サポートおよび電気接続を行うために、レセプタクル101内にマウントする。

10

20

30

40

50

接続レセプタクル101はまた、切り替え可能光子バックプレーンに関してB-FITと正確に並べる。接続レセプタクルはまた、好ましくは電源102、論理制御103、および電力管理のための電子回路、結果の電子的保存、生化学的分析データを処理するための電子回路、事象のタイミングをみるための電子回路、直接または遠隔測定の内いずれかの通信結果のための手段104を備える。光学的コンポーネントは、好ましくはB-FIT100またはMEMS物理チップ106内に局在して提供される。ひとつの実施様態において、蛍光測定は、B-FIT内に含まれる複数の分析チャンバーそれぞれにおいて連続的に実施される。薬物送達チップ105もまた任意に本発明により提供され、経皮にて強力な薬剤を送達するのに使用される。たとえば、神経ガスを解毒するのに使用される薬剤が送達される場合もある。さらに、物理チップ106は任意に血圧および脈拍を含む連続的な基礎的バイタル情報を収集するために提供される。

10

【0034】

B-FITおよび薬剤送達チップ内に位置する経皮サブシステムが、生理学的に適合性のある溶液または薬剤を含む生理学的に適合性のある溶液と皮膚とを接触させるように機能する。B-FITは、独立した単一のレーザーキャピラリーペアの密なアレイ内に編成される。キャピラリーペアはそれぞれ、生理学的に適合性のある溶液を保持するためのレーザーキャピラリー211、(破裂状態として示した)破壊可能シール215を有するレーザーバ、および生理学的に適合性のある溶液を運搬するための隣接運搬キャピラリー212を備え、皮膚を分析物測定部位と接触させる。接着層216が、B-FITの下方表面に備わっている。使用に際し、前記接着層はB-FITの下方表面と皮膚との間に挿入され、B-FITを皮膚に接着させる。

20

【0035】

好ましい実施様態において、熱穿孔サブシステムが、間質が曝露されるように、皮膚の最上層である表皮角質の微視的部分を切除するために機能する。本熱穿孔サブシステムは、好ましくは皮膚表面に近接したマイクロヒーターおよびマイクロヒーターに対する電流を調節する電気的コンポーネントからなる。

【0036】

キャピラリーアレイサブシステムは、好ましくはB-FITを備えるシリコンウエハー内に微細加工されて提供される。本発明は、好ましくは複数のキャピラリー-アレイサブシステムを提供し、そのそれぞれが皮膚表面へ流体を送達するための流体送達チャンバーまたはレーザーバチャンバー201、皮膚表面からの流体を採取するためのキャピラリーチャンネル202、およびそこで分析物または分析物類が検出される、少なくとも1つの横断キャピラリーチャンネルを備える。B-FIT200は、好ましくはマイクロマシンシリコンウエハー、第一ウエハー204、第二ウエハー206、および検出層203の多重層アセンブリからなる。検出層は好ましくは、可視または蛍光測定のための光子システム、または分析物の存在下で変色を発現させる比色試薬を含む層、あるいは分析物の検出のための他の手段のためのキャピラリーから成る。したがってキャピラリーサブシステムは、好ましくは生理的流体の保存、通過および分析を含む。キャピラリーの直径および表面コーティングは、好ましくは流体の流れを制御するために最適化され、キャピラリー壁上への流体コンポーネントの非特異的吸着を防止する。

30

40

【0037】

1つ以上の分析物の存在を定量的または定性的の内いずれかで測定するために、光学的統合光子システムが本発明によって提供される。統合光子システムには、電波管、レンズ、鏡、光源、および光検出器が含まれる。好ましくは、統合光子システムは連結レセプタクル101内に内蔵され、これは皮膚から離れて面したB-FIT100の表面に接着する。いくつかの実施様態において、統合光子サブシステムは比色分析物の感受性領域によって置き換えられ、そこで観察者によって直接知覚された変色は分析物の存在を示す。

【0038】

これらの各サブシステム、およびサブシステム間の相互作用を、より詳細に以下で記述する。

50

【0039】

B - F I T は、好ましくは「単一レーザーバキャピラリーペア (single reservoir capillary pair)」と命名されるいくつかの独立した分析物検出器具のレイ 200 を含む。本明細書で使用するところの語句「生理学的流体 (physiological fluid)」は、生存組織に対して生物学的に適合性がある、したがって、たとえば生存表皮細胞または表皮角質の細胞と接触するのに、培地として等張圧的に、さもなければ生理学的に (たとえば pH) 好適である流体を意味する。この意味内にある生理学的溶液の例は、生理食塩水である。それぞれの単一レーザーバキャピラリーペアは、好ましくは皮膚表面または表皮角質の小さな領域を湿らせ、分析物を採取するために、生理学的流体を保存し、放出するレーザーバキャピラリー 201 を備える。破壊可能シール 205 が好ましくは、皮膚を湿らすために流体の放出のタイミングを制御するために備わっている。流体は好ましくは、たとえば検出パッチ 203 のような、分析局所へ流体を運ぶキャピラリーチャンネル 202 内に回収される。経皮サブシステムは好ましくは対象の分析物が、もし存在するならば、前記流体にアクセス可能であることを保証するために、単一の採取キャピラリーペアを使用する。

10

【0040】

本明細書で使用するところの語句「経皮線量測定 (transdermal dosimetry)」は、皮膚の最外層である表皮角質下に存在する間質液からの受動拡散によって、皮膚の表面に到達した微量の分析物の採取および検出を意味する。本発明の 1 つの実施様態において、間質液は、対象の分析物の存在に関してサンプリングされることが理解されるであろう。さらに、本発明の他の実施様態において、表皮角質の微視的部分の切除によりレーザーバからの生理学的溶液が、基底生存表皮の上部分と接触可能であり、間質液中の分析物が分析のための受動拡散を介して、生理学的溶液内に移動することが可能となる。

20

【0041】

本明細書で使用するところの語句、「非侵襲的経皮検出 (non-invasive transdermal detection)」は、正常皮膚バリアの物理的または化学的改変なしに実施される、皮膚下基質の検出を意味する。水および脂溶性の両方を示している低分子量分析物を、非侵襲的技術によってサンプリングすることができる。

30

【0042】

たとえば、図 3 で例示したように汗を皮膚表面からサンプリングし、血中アルコール濃度を示唆する比色試験によって、アルコール含量を分析することができる。非侵襲的検出のこの例において、アルコールは、試験の前に 0 ~ 4 アルコール飲料を摂取した 7 人の男性被験者の手の甲から摂取した汗中で検出される。汗中に含まれるアルコールは、反応層内に含まれる薬剤と反応し、結果として、血中のアルコール含量の定量的測定となる。

【0043】

しかしながら、非侵襲的技術は、分析物が高分子量である場合 (たとえばタンパク質)、高極性である場合 (たとえばグルコース)、または溶解性が乏しい場合には実用的ではない。そのような分子の、皮膚を介した表面上への流出は、表皮角質の切除によって大きく増強される。切除は、30 ~ 60 μm の典型的な深さで実施され、基底表皮が曝露され、これによって流体を採取し切除されていない表皮角質ではわずかにしか浸透しない分析物を分析することができる。この技術は、表皮角質のみが切除され、基底表皮は裂かれないことから本明細書では「低侵襲的 (minimally invasive)」と呼ばれる。本発明の 1 つの好ましい実施様態において、低侵襲的経皮検出が表皮角質層の微視的加熱切除によって実施される。本発明の他の好ましい実施様態において、低侵襲的経皮検出は、表皮角質層のレーザー切除によって実施される。

40

【0044】

接着層は好ましくは、本発明の器具と皮膚との間の境界に備わっている。接着層は B - F I T アセンブリの一番下の層に添加され、皮膚表面の好適な部分へ B - F I T アセンブリを接着させるように機能し、これによって、効果的なサンプリングのために、皮膚に関連

50

したB - F I Tアセンブリの動きが最小化される。生理学的溶液を皮膚に接触させるために、接着層内の隙間が、それぞれのキャピラリーペアに提供される。接着層は、流体の側面に沿った漏洩を防止し、好ましくは、比較的水不透過性であるバンドエイドタイプの接着剤からなる。

【0045】

表皮と接触するB - F I Tの部分が、好ましくは、皮膚の外表面（表皮角質）または生存表皮の最外層に直接接触したB - F I Tシステムをしっかりと、閉塞して配置するために機能することが理解されるであろう。閉塞接触は、好ましくは、B - F I Tの、その皮膚上の初期位置からの側面および垂直に移動するのを防止し、B - F I T物質の外部への放出を制限し、外部物質の進入を除外するようなものである。移動防止特性には、好ましくは、B - F I Tの最下表面上に局在している、および/またはB - F I Tすべてを覆っており、皮膚表面に接着している、接着要素を含む。さらに、B - F I Tの最下表面は、その初期位置からB - F I Tを移動させようとする垂直力を防止するために、表皮に接着させることができる。B - F I Tを皮膚へ取り付ける閉塞性特性が、B - F I T内での身体または皮膚からの水蒸気を含むすべての基質の移動を制限するために使用される。この捕獲された水蒸気は、表皮角質に潤いを与え、広い範囲の分析物または治療的薬剤に対してより浸透性を与えることで経皮浸潤を促進する。

10

【0046】

本発明の1つの好ましい実施様態において、表皮角質の低侵襲的切除が、特定の分析物の流出が有意に増加するのを達成するために使用される。好ましい実施様態において、熱切除が、抵抗過熱のメカニズムを介して、皮膚の微視的領域上で表皮角質を切除するのに使用される。マイクロヒーターを含むマイクロ切除ユニットが、それぞれのキャピラリーペアに近接したB - F I Tの表面上で加工され、表皮角質に対する導電性熱経路を提供する。マイクロヒーターは、好ましくは、抵抗物質の使用によって、または湾曲伝導性経路によってのいずれかで、表皮角質の適切な部分が局所的に切除されるように、効果的な熱量が産出されるように、電流に対して十分な抵抗を提供するために、準備された伝導性経路によって連結した電極の1対を含む。電氣的接続がまた、マイクロヒーターユニットを、電極に対する電源の適用を制御するためのコントローラーに連結するために、2つの電極のそれぞれに提供される。好ましい実施様態において、マイクロヒーターがB - F I Tのシリコン基質表面から突き出て、表皮角質への熱伝導を改善し、マイクロヒーターの電力消費が減少することが利点である。1つの実施様態において、バルクシリコン物質を介するよりも、皮膚バリアに向かって熱の流れを向けるために、放熱物質が、マイクロヒーターの上部に組み込まれる。他の実施様態において、マイクロヒーターはB - F I Tの主要シリコン基質から突き出たシリコンメサ上に加工される。そのような実施様態は、好ましくは、シリコンメサから接触しているバルクシリコン基質への経路を導くために、電氣的接続の非平面的組み立てが必要になる可能性がある。そのような非平面組み立て技術は、本明細書にそのすべてが参考文献として組み込まれたParanjape et al., Technical Digest, 1997 International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Chicago, Illinois, Vol. 1, pp. 397 (1997)に例示されたように、当業者に公知である。

20

30

40

【0047】

熱切除マイクロヒーターは、局所切除を実施するために、好適な交流または直流にてパルスされる。加熱パルスの間隔および強度の調節が、好ましくは、正確な面積および深さの切除を達成するために、実施される。微小切除は、好ましくは、およそ $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ の表皮角質の限定された量で実施される。

【0048】

図4(a)および4(b)は、(a)底からおよび(b)断面から見た密封構造を例示している。

【0049】

50

1種またはそれ以上の薬剤を含みうるか、または含み得ない、生理学的に適合性のある溶液を、使用の前に、破壊可能シール405によってレザーキャピラリー401内に保持する。シールは、好ましくは、レザーキャピラリーを開くこと、および皮膚表面または曝露された表皮角質を生理学的溶液に接触させることのための、電氣的にアドレス可能である方法を提供する。シールは、レザーキャピラリーの底部末端での閉鎖手段を備え、またレザーキャピラリーを開く方法を備える。好ましい実施様態において、シールは、好ましくは、上昇した温度にて破裂する誘電性二重層および、金属導電性経路である、細膜400を含む。好ましくは、意図された使用の前に裂かれることがないように十分丈夫であり、電氣的に帯電してはならず、上昇した温度で破裂する、薄く毒性ではない任意の膜性材料が、シール密閉としての使用に好適な物質である。好ましい物質は、低ストレスニトリドである。この膜のフィルムストレスの制御が加工中必要である。本明細書にそのすべてが参考文献として組み込まれている、Kinard et al., IEEE Trans. on Inst. Meas., 46(2), 347(1998)。シールを加工するために、金属帯電パス402は、低ストレスシリコン誘電体400上に表面沈着される。マイクロヒーティング要素に対する好ましい金属はエバノーム(evanohm)が含まれる。シールを破裂させるために使用される熱は、任意にまた、特定の実施様態において皮膚を切除するために使用され、フィルムストレスの注意深いバランス、厚さおよび抵抗が、所望の過熱および破裂特性両方を提供するように、好ましく実施される。フィルム上の金属の沈着がまた、不規則な地形の上での金属の沈着を必要とする。そのような技術は、当業者に公知である。そのすべてが本明細書にて参考文献として組み込まれている、Geist et al., NIST Journal of Research 95(6), 631(1990)。帯電パスは、好ましくは、帯電経路402を介した静電気の通過を促進するために、2つの電氣的接触パッド403、404にて終端となる。操作の好ましいモードにおいて、薄い帯電経路を通過した電流は、帯電性経路402の金属を熱し、下に存在する誘電性層の破裂を引き起こし、したがって、レザーキャピラリーの開裂を引き起こす。本発明のこの好ましい実施様態、およびこの好ましいシールの利点は、とりわけ、機械的移動部分が存在せず、これによって信頼度が増加することに注意すべきである。

10

20

【0050】

特定の好ましい実施様態において、シールは、レザーキャピラリーおよびキャピラリーチャンネル両方のシールをし、これによって両方が同時に開く。

30

【0051】

図5は、B-FIT器具の断面図を例示しており、非侵襲的/低侵襲的サンプリングにおける詳細を順を追って示している。模範的な未使用キャピラリーペア502が本来のシールを含んでおり、そこで、生理学的溶液がレザーキャピラリー内で保持され、好適な電流の適用に際してシール501が開裂し、生理学的に適合性のある溶液が、まず皮膚に接触し、ついで輸送キャピラリー内に採取される。最後は、開裂したシール500を伴った使用済みキャピラリーが例示されている。この好ましい実施様態において、それぞれのキャピラリーペアは、シールと生理学的溶液を利用できるように単一使用ユニットとして機能する。

40

【0052】

同様に、図6は、血中グルコース濃度を測定するための、B-FITシステムの、低侵襲的実施例の操作を、順を追って例示している。マイクロヒーター603は好ましくは、シール601破裂と同時、または直前に、接着層604中の隙間の下に局在する表皮角質の一部を切除するために動作する。そのような器具は、「要求に応じた(オンデマンド; on-demand)」分析を提供する。生理学的溶液は好ましくは、曝露された生存表皮上に放出され、輸送キャピラリー内に回収される。輸送キャピラリーは、好ましくはグルコースが、青色反応が産出される比色反応にて検出される検出パスへ溶液を導く。本好ましい実施様態において、マイクロヒーターおよびシールに送達される電流パルスが同一であるかまたは異なってよく、したがって、ヒーターおよびシールが直列または並列のい

50

ずれかで、電氣的に連結されうることに注意すべきである。

【0053】

B - F I T 器具のシリコン体内のキャピラリーが、たとえばマイクロマシン化によって、または適切にディープ レジスティブ イオン エッチング (D R I E) 技術を用いるエッチングによって好ましく加工されうる。ここで図7を参照すると、B - F I T の好ましい実施様態の構造が例示されている。器具は、3つの主要部分、好ましくはシリコン702からなり、それぞれその固有のレーザーバチャンネル707を持つ、いくつかの湾曲キャピラリーチャンネル706を含む本体700、湾曲構造の最下部分を形成しており、またマイクロヒーティング要素703を含む底部キャッピング部分701、および湾曲チャンネル706の上部を形成しており、任意に湾曲チャンネルの水平区画を通した電気性 - 浸透圧性ポンピングを用いて生理学的流体の流れを補助するための電極を含む上部キャッピング部分704、からなっている。いくつかの実施様態において、上部キャッピング部分704は本体に結合しており、そのような配置の利点は、それによって達成されるキャピラリー内への光の良好な連結である。本体は、好ましくはシリコンからなる。本体700および底部キャッピング部分701は、好ましくは互いに永久に固定されており、センサー705を含み、特定の実施様態においてはこれが、使用の後に上部キャッピング部分704よりはずれ、新しいアレイと置き換えることが可能である。

10

【0054】

レーザーバおよびキャピラリーチャンネルは、好ましくは標準のシリコンウエハー内で組み立てられる。キャピラリーの寸法は、重力下、レーザーバの開放端からの、そしてキャピラリーの動きを介したキャピラリーチャンネル内への、汗、間質液、または他の生理学的流体の輸送を促進するように選択される。好ましい実施様態において、キャピラリーチャンネルは、直径が25 μm であり、長さがおよそ500 μm であり、レーザーバチャンネルは、直径が50 μm であるが、しかし長さが500 μm よりわずかに短くエッチング処理され、後壁を形成する。湾曲キャピラリーチャンネル708の側面部分が提供され、分析物の光学的検出のために、器具の本体の上部表面に平行で、接着した、流体の流れの領域を提供する。側面部分の下内部表面は任意に、光学的検出を促進するように、反射金属コーティングのような、反射表面を伴って提供される。湾曲キャピラリーの側面部分は、好ましい実施様態においては、上部キャッピング部分の表面によって形成される。使用に際し、生理学的流体の輸送および分析物の採取は、レーザーバチャンネル内に先に保持された流体で皮膚をす

20

30

【0055】

キャピラリーアレイシステムの表面は、好ましくは、表面の特性を改善するために、たとえば、タンパク質の吸着を防止するため、および/または表面へ抗体のような生体分子を接着させるために機能化される。特定の分析物に結合する分子を、続く検出および定量的分析のために、分析物を固定化するために使用する。好適な生体分子には、抗体、抗体フラグメント、人工抗体、レクチン、ハイブリッド可能核酸、核酸結合タンパク質、核酸に結合するタンパク質、他のタンパク質に結合するタンパク質、コファクターに結合するタンパク質、コファクター（たとえば、フラビン類、プテリン類、チアミン、ピリドキサル類、キノン）、および生物学的分析物に特異的に結合する他の薬剤が、限定はしないが含まれる。

40

【0056】

キャピラリーチューブは、好ましくは、化学的処理または血漿処理のいずれかによって改変される。この工程は、有機汚染物の表面クリーニングを促進し、キャピラリー表面上に表面ヒドロキシル基を導入し、この基は好ましくは、アミノプロピルトリメトキシシラン (A P T S) のようなシランと反応し、抗体のようなカップリング物に対するアンカーとして遊離アミノ基を提供する。好ましい実施様態において、タンパク質の吸着を防止する表面コーティングを提供するために、ポリエチレングリコール (P E G) シラン誘導体が使用される。

50

【0057】

1つの実施様態において、対象の分析物を指向する抗体を含む溶液を当業者に公知の穏やかな酸化状態に曝露し、これにより、抗体の表面上にアルデヒド基が提供される。ついでこのアルデヒド官能基はシッフ塩基反応を介してキャピラリーチューブ表面上の遊離アミンにカップリングし、したがって、抗体が、キャピラリーチューブ表面に固定化される。

【0058】

好ましい実施様態において、対象分析物の検出は蛍光を用いた手段によって行われる。分析物（たとえば抗体）802に特異的に結合可能な基質を、先に記述したようにキャピラリーの表面に共有的に結合させる。固定化物質802の結合部位を、本発明の使用前に蛍光標識分析物801で充填する。分析物800が存在する場合、これは特異的結合部位に競合し、標識分析物分子の一部が溶液内に置換される。標識分析物の置換の程度は、溶液中の分析物の濃度に依存する。したがって、好適に較正されている場合、溶液中に置換された蛍光の量を測定することにより分析物800の濃度が定量的に測定される。

10

【0059】

結合部位を別々に、異なる放射および励起スペクトルを持つ蛍光団にてタグ化した各分析物で満たし、異なる結合特性の複数の抗体を好ましく固定化することによって、複数の分析物測定が好ましく単一キャピラリーペア内で行い得る。スペクトルフィルターおよび/または他の光源を好ましい実施様態にて使用し、異なる蛍光団からの蛍光を励起および検出し、それによって試料の総蛍光特性に対するそれぞれの蛍光団の貢献度を決定する。

【0060】

本発明に対する好ましい蛍光団には、ローダミン類、蛍光類、テキサスレッド（Texas red）、オレゴングリーン（Oregon green）、バイジピ色素類、およびアミノナフタレン類が含まれる。

20

【0061】

1つの実施様態において、N-アセチルトランスフェラーゼ、アイソザイム2（NAT-2）活性を、薬剤の副作用、毒性、および疾患に対する素因のマーカーとして測定する。NAT-2表現系は、たとえばNAT-2によって生成したカフェインの2つの代謝物、5-アセチルアミノ-6-ホルミルアミノ-3-メチルウラシル（AFMU）および1-メチルキサンチン（1X）の比を検出することによって検出可能である。AFMU対1Xの比を用いて、NAT-2の活性を測定することができる。ポリクローナル抗体をこれらの2つの代謝物に対して作製し、次いで精製することが可能である。これらの抗体はまた、ELISAによって尿試料中のAFMUおよび1Xを検出するために使用することができる。

30

【0062】

本発明の好ましい実施様態において、レーザーキャピラリーには、シールに対して反対のキャピラリー末端に位置するマイクロヒータ要素が備えられている。マイクロヒータは、泡を産出するように生理学的流体の局所加熱を提供するために活性化され、これによって一旦シールが破裂したならばキャピラリーからの生理学的溶液が強制的に放出される。マイクロヒータはポンプとして機能すること、ポンプ動作は機械的移動部分なしで実施され、したがって信頼性の向上が保証されることに注意すべきである。

40

【0063】

マイクロヒータ要素は、好ましくはシリコンの表面上での従来の沈着方法によって沈着した抵抗導電性経路を備える。破壊可能シールとは異なり、加熱要素は帯電経路の破壊なしに温度の上昇に抵抗するように設計される。導電性経路は、1つの好ましい実施様態において湾曲経路であり、ここで小さな表面積内に高密度で配置された薄い導電性経路からなる湾曲経路の使用により、高抵抗性経路および熱生成の局在化が達成される。

【0064】

本発明の他の好ましい側面は、統合光子分析サブシステムである。光子コンポーネントのB-FITシステム内への統合により、アッセイ密度の増加、サイズの減少、より少ない電力消費、およびコスト削減が可能になる。好ましい実施様態において、光子コンポーネ

50

ントは本器具の上部キャッピング部分を備える、プラスチックハウジング内に收容される。他の検出方法が本発明において考えられ、以下で考察されることに注意すべきである。

【0065】

そのような統合光子分析サブシステムにおいて、光子源、たとえばLEDまたはレーザーを、検出器、導波管、カプラー、および鏡と連結し、本発明での分析物を検出するための完全に統合された光学システムが提供される。光子コンポーネントは好ましくは、上部キャッピング部分中のB-FITの本体の上部表面上に接続して配置される。

【0066】

供給源および検出器アレイのための、カプラーを伴ったポリマー導波管を、マウントするために、統合「フレックス回路(flex circuits)」として組み立てる。完全に統合した導波管構造は、乾燥抵抗工程による導波管の一体型加工のような、当業者に公知の方法によって構築される。-低導波管物質($n_{水} = 1.33$)が好ましい。

【0067】

図9は、導波管および試料チャンバーの好ましい実施様態を例示している。好ましい実施様態において、キャピラリー蛍光を使用して、キャピラリー内の分析物を検出する。緑色、青色、黄色または赤色光を放射するLED源を、蛍光団を励起するために使用可能である。励起されている波長の選択は、それぞれの蛍光団の励起スペクトルによって第一に規定される。他の実施様態において、レーザーのコスト、サイズおよび電力消費は、一般的にLEDより高いけれど、レーザー源が特定の励起波長を提供するために使用可能である。

【0068】

好ましい実施様態において、湾曲キャピラリーの側面部分の上内部表面は上部キャッピング部分900の表面によって形成される。光学的検出は、好ましくは、側面部分内で実施される。光は好ましくはプラスチックの上部キャッピング部分内に組み立てられた一体型導波管によって、側面部分から、および側面部分へ導かれる。導波管の方向は、シリコン表面に対して平行に走っている。

【0069】

他の実施様態において、導波管によって導かれた光が横方向キャピラリー900に含まれる溶液の一部分を直接介して通過するように、横方向キャピラリーが導波管の経路903を遮る。本実施様態は、シンプルであるという利点があり、レンズおよび鏡は、光線を切り替え、照合するのに必要ではない。蛍光または吸光測定は、好ましくは導波管を遮る横方向導管の部分内で実施される。前述の導管部分902は好ましくは、分析物が存在する場合に蛍光団の溶液内への置換をおこす結合試薬を含む。続く導管901は好ましくは、溶液を光路の外に導く。

【0070】

本発明の他の実施様態において、光の測定は、水よりも低い屈折指数を持つ材料から構築されるキャピラリー内で実施される。本実施様態はまたレンズおよび鏡の必要性をなくし、よりすぐれたシグナル対ノイズ特性を提供する。

【0071】

図10は、B-Fitシステムプラットフォームの好ましい実施様態を例示している。導波管1008からの光の、側面部分内への、および側面部分から導波管への連結を促進するために、マイクロ鏡1005が好ましく提供される。鏡は、上部カップリング部分内のプレス加工成分として統合されるか、または注入モールドイングによってプラスチックハウジング内に位置した分離コンポーネントであるか、または任意の他の好ましい方法によって構築される。好ましくは、マイクロ鏡1005は、キャピラリーの側面部分のシリコン表面に関しておよそ45°にて配置し、側面部分上に直接配置される。金属コーティングのような高反射表面コーティングが、好ましくは水平方向導波管からの光を下方のキャピラリーの側面部分内に反射するために鏡の表面上に沈着させる。レンズは好ましくは、蛍光励起および放射光線を照合するために提供される。1つの実施様態において、マイクロレンズ1012は、導波管から側面部分に入る光線の分岐を提供するために凸状であり

10

20

30

40

50

、側面部分を出て、導波管1008に入る光に関して収束する。蛍光検出を使用する実施様態において、蛍光団を励起することが可能であるスペクトル領域からの光が、導波管を通して導かれ、分岐鏡に当たり、側面道管内に含まれる溶液に入る。側面道管内の蛍光団が好ましくは励起され、より長い波長の光を放射する。放射された光は鏡に当たり、この鏡は光を収束し、再び導波管に入る。

【0072】

帯域通過またはノッチフィルタが、好ましくは光検出器実施様態のバンド幅感度に依存して、検出された蛍光のシグナル対ノイズ比を最適化するために、光の経路中に挿入されてもよい。

【0073】

統合光子分析サブシステムのための光源にはLEDが含まれ、これは青色から緑色までの光放射色で最近入手可能になっており、したがって、ほとんどの一般的に使用される蛍光プローブの励起スペクトルの少なくとも一部分を十分に対象とする。たとえば、生物学的活性に対する蛍光プローブ&発光プローブ：定量的リアルタイム分析のための技術に関する実践的ガイド(Fluorescent and Luminescent Probe for Biological Activity A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis), Second Ed. W. T. Mason, ed. Academic Press (1999)を参照のこと。あるいは、マイクロ電子工学レーザーを、特定の波長が要求される場合に好ましく使用することができる。任意の光検出手段を、放射された蛍光を検出するのに使用することができる。フォトダイオード、フォトトランジスタ、ダーリントン対フォトトランジスタ、またはフォトレジスタを本体のシリコン表面上に組み立てることができ、または分離したコンポーネントとして提供することができる。

【0074】

標準の低出力CMOS加工が、マイクロシステムを動かすため、連続する論理的制御を提供するため、およびメモリ中のデータの保存およびその操作を可能にするために好ましく使用される。

【0075】

分析物の蛍光検出に関する前述の開示に関わらず、本発明は蛍光測定に制限されないことに注意すべきである。本発明で都合よく使用される他の検出方法には、二次元技術を含む、Raman、UV-VIS、およびFTIR分光法、および蛍光相関分光法が含まれるが、これに限定されない。さらに、放射線センサーおよび電磁場センサーもまた、特定の実施様態における検出の基礎として有用である。放射線労働者などをモニタリングするために、好ましいセンサー実施様態は、光学ランダムアクセスメモリー(ORAM)物質である。これらの物質は、ポリ(メチルメタクリレート)マトリックス内に埋め込まれたスピロベンゾピランのような光互変性物質分子からなる。測定アプローチは、光学メモリーメディア中の放射誘導トラックの測定に基づく。

【0076】

光学偏向磁場センサーが、磁場モニタリングが望まれる場合に好ましく使用される。マイクロセンサーは4つのアルミニウム保持アームを用いて、マイクロマシンシリコン基質上に浮遊するアルミニウムビームを含む。これらのアームは、ビームをその中心点に保持し、この点はビームが基本共鳴周波数にて振動する場合のゼロ置換点である。正弦波電流が1つの支持アームを介して、ビームの長さを通して、および他の支持アームを通して流れるように強制される。正弦波電流の周波数は、ビームの機械的な共鳴周波数のそれと本質的に同一である。磁場がない場合には、ビームは影響を受けない。しかしながら、ビームに対して垂直に延びる磁場が存在する場合、磁力がキャリアの偏向を引き起こし、言い換えれば、ビームをその共鳴周波数で振動させる。振動の振幅は、磁場の力に直接比例し、レーザーを使用して測定することができる。

【0077】

10

20

30

40

50

図10は、分析物検出に関するB-FITシステムの実施様態の操作を例示している。表皮角膜の一部分の切除し、シールを破裂させ、および生理学的溶液をレーザーバッチャネル1002から放出させるために、マイクロヒーター1006の操作に続いて、生理学的溶液が、曝露された生存表皮と好ましく接触する。生存表皮にたまっている間質液から採取した分析物を含む溶液は、好ましくはキャピラリーチャンネル1004に入る。キャピラリーチャンネル内で、分析物はキャピラリー壁に結合している分析物結合分子より、蛍光標識分析物を置換する。置換された蛍光標識分析物は、好ましくは導波管1008、マイクロ鏡1005、およびマイクロレンズ1012によって導かれた光によって励起される場所である、側面部分に運ばれる。蛍光団によって放射されるより長い波長の光は、1つの実施様態において、逆光学経路によって導波管1008内に導かれて戻り、検出器に伝搬する。

10

【0078】

本発明の総合的側面にはまた、被験者のリアルタイムモニタリングにより、得られたデータに応じて、条件（たとえば加熱パルス特徴、サンプリング速度など）、および薬物送達方法を最適化するために、適応制御アルゴリズムが使用可能になるという側面を好ましく含む。本発明のこの好ましい実施様態において、データマシン学習技術が1人の被験者の健康に関する1測定を分析物測定に関連させる関数を求め、または学習するために好ましく使用され、これによって続く分析物測定からの健康測定を予測する能力が獲得される可能性がある。本発明で使用される適応制御アルゴリズムは、学習、適応、フィードバック、および意思決定の段階を統合する。身体は動的システムであるので、これらの段階は本発明の器具の寿命期間中、同時にそして連続的に起こる。

20

【0079】

図12は、ELISAマイクロシステム情報コンポーネントの概要を例示している。本発明の好ましい側面は、延長された時間にて可能である多数の個体の測定である。延長測定時間にてベースラインドリフトは、有意な偏差が正確に検出されるように説明されるべきである。本発明は、好ましくはベースラインドリフトを説明するための、およびそれによって最新のベースラインからの偏差を検出するためのコンピュータ化された手段を提供する。本手段は、被験者の健康のモニタリングを指向する実施様態に関して例示される。モニタリング技術の改善によって、代謝の日々の変化が健康な個体にて好ましく確立され、感染、疾患進行、および毒素への曝露の初期段階を検出するために限度値が設定される。

30

【0080】

薬物のような外来化合物の代謝は、連続する酵素によって媒介される。各個体でのこれらの酵素のタイプおよび量は個人の遺伝子型にて反映され、遺伝子情報に基づき個体は高効率代謝者（FAST）および低効率代謝者（SLOW）として分類できる。健康な個体において、遺伝的性質（遺伝子型）とその発現（表現型）との間の関連が保持されており、すなわちFAST遺伝子型はFAST表現型を引き起こし、一方でSLOW遺伝子型はSLOW表現型を引き起こす。しかしながら、個体の疾患状態はこの関係を変更でき、とりわけ食事、喫煙、アルコール、環境化学物質、および生物兵器または化学兵器が変化させる。個人のNAT-2遺伝子型の決定およびその個体のNAT-2表現型のモニタリングを、健康および臨床的状态の直接的で、感度のよいプローブとして使用することができる。

40

【0081】

本アプローチにおいて、カフェイン代謝物AFMUおよび1Xに対して、ポリクローナル抗体が好ましく発現し、本発明の実施様態においてNAT-2表現型を決定するために使用される。血中グルコース濃度、サイトカイン濃度、およびデキストロメトロファン代謝物濃度もまたモニタリングすることができる。

【0082】

マシン学習アルゴリズムが、代謝ベースラインを獲得するため、および個体の身体がストレスまたは疾患の状態に入り始めた時点を示すために好ましく使用される。WindowおよびWeighted-Majority-Algorithms(Littlest

50

one & Warmuth, Information and Computations 108, 212 (1994)を好ましく使用することができる。よく知られている正規の特性を持つこれらのアルゴリズムは、(すなわちベースラインドリフトの存在下で)動的環境中で学習および実施可能である。

【0083】

2つのカフェイン代謝物、AFMUと1Xの読み取り値が計算のための入力として好ましく提供され、本計算は2つの交互および強調モード、学習のモードおよび実施モードにて好ましく実施される。学習モードにおいて、器具は適応アルゴリズムを用いて着用者身体の化学的性質に対して自らを好ましく連続的に較正し、体重の設定を調整し、フィードバックを補助する。代謝物の濃度が正常な身体機能を示唆していない(すなわち使用者が、偽陰性のためのみフィードバックを提供する)ような方法で身体を刺激する場合にのみ、使用者のインターアクションが必要である。実施モードにおいて、現在のコンセプト記述(すなわち体重)を使用して器具がカフェイン代謝物の読み取り値を取り込み、健康な身体状態に関して決定を行い、ついで使用者に伝達する。身体は動的システムであるので、学習、適応、フィードバックおよび意思決定のこの工程は、好ましくは連続して、そして器具の寿命期間を通じておこる。

【0084】

本器具はまた、着用者の健康状態のモデルを好ましく取得し、本モデルを将来の健康の状態を予測するために使用する。形式上、マシン学習方法は、 $y = f(x)$ のような、 x 、 y 対の1組からのいくつかの関数 f_n を導き、使用する。一般的には $f()$ は、未知である実際の関数の近似である。

【0085】

しかしながら、たとえばトロポニンIの濃度が増加しはじめた場合(切迫心臓発作を示している)、1回の測定から次への変化率が増加する可能性があるので、本器具は好ましくは、より頻繁にサンプリングする必要がある。本状態において適応制御アルゴリズムが好ましく使用され、これはサンプリング率を好ましく制御するのに十分強力であるが、マイクロハードウェア内で稼動するのに十分シンプルである。

【0086】

したがって、好ましい実施様態においてその着用者から標的物質をサンプリングするように経皮コンポーネントを利用するために、適応制御アルゴリズムを使用することが可能であり、変化する着用者の健康状態のモデルを獲得するためにマシン学習アルゴリズムを使用できる。

【0087】

振り返ってみると、図10は、B-FITマイクロシステムの好ましい実施様態を例示している。この総モジュラーシステムは、好ましくは、(1)レーザーバッチャネル1002およびキャピラリーチャネル1004を含む、流体輸送システム、(2)マイクロヒーター(類)1006、(3)導波管1008、マイクロ鏡1005、およびマイクロレンズ1012を含む光子システム、および(4)選択した分析物の分析のための化学物質を含む。生体マーカーの分子指標を含む間質液を、表皮角質の制御熱マイクロ切除を利用した低侵襲的技術を用いて得る。このために使用するマイクロヒーター(類)1006は、好ましくは、B-FITマイクロシステムの一部である、シリコンベースのサブシステム内に直接組み込まれる。分析キャピラリーを介した間質液または分析物の光学的輸送に関して、生理学的に適合性のある流体を含む第二のレーザーバッチャネルが、モジュールの上表面にすべての流体を導くために使用される。誘導力は好ましくは、流体をレーザーバッチャネルおよび皮膚の熱切除領域を超えて流出させる泡を産出する、マイクロヒーター(類)1006によって提供される。一旦、タグ化した分子およびタグ化していない分子を含む間質液および生理学的に適切な流体が上部ホールディング洞に達したならば、分析をはじめることができる。この総経皮検出プラットフォームの上部は、好ましくは、ホールディングチャンパー内で好ましく指向させるために、マイクロ鏡(類)1005およびマイクロレンズ1012を備える光学導波管と統合できる。ホールディング洞の分析領域に

10

20

30

40

50

当たる光を、蛍光的にタグ化した分子を励起するために使用する。この蛍光の強度は、好ましくは同一の光学導波管によってリターンパスを介して獲得される。

【0088】

マイクロシステムの分子特性により、選択した分析物の検出のために新規の化学物質を適用することによって、多くの画期的な適用に簡単に適応可能である、優れたプラットフォームが提供される。たとえば、農薬に曝露された子供に対してとりわけ重要な一つの分析物または生体マーカーは、アセチルコリンである。アセチルコリンは、身体全体を通して局在化しており、それが放出される場合、末梢および中枢神経システムにおける神経伝導を伝搬するため、または筋肉収縮を開始させるための、興奮性神経伝達物質として働く。有機リン系農薬への曝露は、アセチルコリンエステラーゼ活性の阻害を引き起し、結果としてアセチルコリンの蓄積となる。このアセチルコリン濃度増加は生体マーカーとして働き、曝露がなかった子供におけるベースラインをまず確立することで本器具を用いて測定される。MEMSに基づいたパッチは小さくて控えめであり、農薬汚染への曝露に関して連続的にモニタリングし、初期の警告診断を提供する間、子供は彼らの日常の生活を送ることが可能である。

10

【0089】

したがって、本発明の携帯式生物医学的モニタリング器具の一つの実施様態は、農薬マイクロパッチシステム(P μ P)としてである。そのようなP μ P器具を提供することに際して、三つの作業が存在する。作業1は、B-FITマイクロシステムに対して類似に機能するシリコンベッド構造の構築である。上記のように、本ベッドは、キャピラリーの内部および回収チャンパーへ流体を送達するために働く。加えて、ベッドは化学物質の統合に関してB-FITマイクロシステムを映す。作業2は、アセチルコリンを検出するための化学反応である。本作業は、シリコンの平面試料を化学的に改変することが含まれ、ベッドへの化学反応の統合のための機能化方法が可能になる。作業3は、検査およびバリデーション相を含み、そこでは化学反応プロトコールがキャピラリーベッドに採用される。アセチルコリンの検出限界が確立され、試料体間質液を検査する。

20

【0090】

B-FITシステムに関して、キャピラリーベッド構造の加工は、一つの実施様態においてシリコンのバルクマイクロマシンに依存しており、ディーブリアクティブイオンエッチング(DRIE)または湿化学反応エッチングのいずれかを介して達成される。DRIE工程は、さまざまな直径の細いマイクロキャピラリーを形成する、高アスペクト比ウエハー通過孔の加工を好ましく可能にする。500 μ mの名目上の厚さをもつウエハーを使用するが、しかし好ましい厚さは、表面改変試験を介して確立することが可能である。

30

【0091】

図10で示した例示的ベッド構造(C型)に関して、さまざまな直径を持つキャピラリーのレイは、石版術デザインおよびDRIEを用いて好ましく形成される。湿化学反応はキャピラリー壁表面改変において、およびアセチルコリンを含む試験溶液を使用した蛍光バリデーション中の両方に関わるので、このタイプの構造により溶液のチャネル内での汲み上げを可能にするキャピラリーの働きに必要な最適な直径に関する選択が可能である。一旦キャピラリーが化学的に改変したならば、蛍光の試験をシリコンキャピラリーの上方入り口部に位置するレーザー源、および底側上の出口部に位置する検出器を用いて好ましく実施する。

40

【0092】

この好ましい検出スキームを例示している図11に戻ると、レーザー光経路1102のスポットサイズは、好ましくはシリコン基質1106内でエッチングされたシリコンキャピラリー孔1104の直径にマッチするように調整することができ、一方でその励起波長は好ましくは430nmで保持され、蛍光1108を放射させるように蛍光団を励起するのに必要な周波数にあわせる。検出器には、好ましくは、光電子増倍管1110が含まれ、567nmの蛍光波長に対して検出器を調節するために、モノクロメーター1112が

50

好ましく使用される。さらに光電子増倍管への到達による望まないレーザー光周波数を大きく減衰させるために、ノッチフィルター 1 1 1 4 が好ましく使用される。

【 0 0 9 3 】

C I 型と呼ばれる、第二の例示的なベッド構造は、マイクロ流体内部連結で固定された、入り口部が改変された基礎的キャピラリーアレイと同一である。このデザインは、好ましくはキャピラリー動作がおそらく適切に機能しない状況でC型の代替として使用される。そのような環境において、C I 型は表面改変および試験の目的のために、外部チュービングまたはシリンジポートをシリコンキャピラリーに直接連結可能にする、内部連結メカニズムを提供する。

【 0 0 9 4 】

図 1 3 は、外部チュービングをシリコンキャピラリーと連結する、マイクロ流体内部連結を示している、C I 型ベッド構造の断面図を例示している。一般的にはD R I E によって産出された孔は好ましくは、その内径および外径を開放口内に挿入し、接着剤 1 3 0 2 にて固定される、内部連結チュービングの直径と適合させるように形成される。したがって、穴 1 3 0 4 を介してウエハーとして組み立てられたD R I E マイクロキャピラリーは、シリコン基質 1 3 0 6 内に位置する。孔は好ましくは、その内径および外径が、シリコンキャピラリー 1 3 0 8 に連結した外部チュービングの直径と適合するように産出され、そこでチュービングは接着剤 1 3 1 0 によって固定される。しかしながら、チュービングの保持のために使用する接着剤が、流れを妨げるキャピラリー内に漏れ出さないように注意すべきである。

10

20

【 0 0 9 5 】

図 1 4 は、外部チュービングをシリコンキャピラリーと連結する、シリコンスリーブマイクロ流体内部連結を示す、D R I E キャピラリー孔周辺のシリコンスリーブを用いている、他の実施様態の断面図を例示している。スリーブは好ましくは、外部流体コンポーネントに関して増強された機械的統一性を提供するが、しかし接着剤 1 4 0 2 が漏れだしたりキャピラリー孔を塞ぐのを防いでいる。一旦外部チュービングがシリコン基質に連結されたならば、好ましくは化学物質および分析物を圧力勾配またはシリンジのいずれかを用いて注入することができる。次いで、狭いキャピラリーチャンネル内に流体を導入する目的を満たした外部チュービングをはずし、C型器具の場合のように蛍光を検出するためのペリフィケーション手順を開始することができる。図 1 4 はしたがって接着剤 1 4 0 2

30

【 0 0 9 6 】

図 1 5 は、分析物に対する回収チャンバーを組み込んだ第三のベッド構造の断面図を例示しており、キャピラリーの働きによってD R I E キャピラリー通過ウエハー孔 1 5 0 2 を介して分析物が上昇する。C C 型と呼ぶこの微小構造に関して、シリコンキャピラリーが好ましくはシリコン基質 1 5 0 4 の表側上に回収チャンバーを作製するために、D R I E および異方性湿シリコンエッチを用いて組み立てられる。このベッドによって、本チャンバーの表面のみを化学的に改変することで十分である。分析物は、好ましくはキャピラリーチャンネルを上流し、チャンバー内で固定化された化学物質と反応し、蛍光光路 1 5 0 6 を産出する。

40

【 0 0 9 7 】

図 1 5 はまた、好ましい励起レーザー 1 5 0 8 および蛍光光路 1 5 1 0 検出装置を例示している。励起および検出方法は、好ましくは以前のようにそれぞれ励起レーザー 1 5 0 8、光電子増倍管 1 5 1 2、およびモノクロメーター 1 5 1 4 を用いて行われるが、しかし、ここでこのセットアップは、ベッド構造の表側上のみで好ましい。光電子増倍管 1 5 1 2 およびモノクロメーター 1 5 1 4 は、蛍光検出器として働くように、好ましくは採取レーザーバの直上に設定される。この状況において、衝突レーザー光は、好ましくは、その反射が光電子増倍管 1 5 1 2 検出に寄与しないような角度にて、回収チャンバーに向けさせ

50

ることができる。にもかかわらず、ノッチ-フィルター1516を好ましく、検出ユニットとチャンバーとの間で使用し、励起レーザー1508からの散在光を切除することが可能である。

【0098】

図16は、回収チャンバー1602および流体内部連結を組み込んだ、CIC型と呼ばれる、第四の好ましいベッドの断面図を例示している。CC型のシリコンキャピラリーチャンネルおよび回収チャンバーに加えて、このベッドはまた、好ましくはウエハーの背側に流体内部連結メカニズムも含む。以前のように、このデザインは好ましくはキャピラリーの働きが回収チャンバーまで流体を引き上げる十分なキャピラリー力を提供しない場合に、代替メカニズムとして使用されうる。流体内部連結は好ましくは、CI型試験-ベッド構造にて示したように、シリコンスリーブ1604の使用を可能にする。DRIEキャピラリーウエハー通過孔1606およびシリコン基質1606もまた示されている。

【0099】

ベッド構造のそれぞれの変化に関して、ウエハー通過キャピラリーアレイの加工が、単一側研磨、<100>-型4インチシリコンウエハー上で実施される。キャピラリー孔のアレイは、好ましくは、名目上の長さ500 μ mの4つの直径値(25 μ m、50 μ m、75 μ m、および100 μ m)からなり、ウエハーの厚さに一致する。C型デザインに関して、孔のパターンは、好ましくはDRIE工程に対する理想的なマスク層として働く、フォトレジスト層内で形成される。単一(標準)写真平版段階により、好ましくは研磨されたシリコン表面の表側上にパターンが産出される。DRIE工程は、異方性にエッチされた空洞を提供するが、マスクのいくつかの切り取りが実施される。したがって、マスクのパターンはキャピラリーに関する望ましい直径を達成するために、この避けることのできない側面エッチが考慮される。使用されるDRIEシステムの型に依存して、垂直対側面エッチングの比は50対1よりよい。すなわち、エッチ深50 μ mごとにマスク層の下におよそ1 μ mのエッチ下が存在する。したがって、マスク層寸法はこのエッチパラメーターに依存し、前試験を通して測定することができる。DRIEサービスは、たとえば、ナショナルナノファブリケーションファシリティーズ(National Nanofabrication Facilities)の1つ、またはMEMSエクスチェンジ(MEMS Exchange)プログラムによって得ることができる。

【0100】

図17(a)~(f)は、(a)シリコンスリーブに対するフォトレジスト(PR)パターンニング、(b)スリーブの酸化物パターンニング、(c)PRの再適用、(d)孔のDRIEに対するパターン、(e)PRおよびDRIEスリーブの除去、および(f)酸化物除去を示している、CI型アレイに関する好ましい、一般的な加工工程を例示している。リソグラフィの前の初期段階により、シリコン表面全体にわたる熱シリコン二酸化物の薄膜が作られる。フォトレジストを適用し、酸化物をパターン化し、エッチして、マイクロ流体内部連結を提供する各キャピラリー孔の周辺に局在する、シリコンスリーブの場所を線引きする。この段階に続き、もう一度フォトレジストを適用し、キャピラリーの場所をフォトレジストおよび酸化物の両方の内にパターン化する。ウエハー通過孔を、C型器具によるようにDRIEを用いて再び形成させる。フォトレジストを続いて除去し、シリコン表面の表側上に熱酸化物の先にパターン化した層が残る。マスク層として働く酸化物層にてより短いDRIE段階を実施し、シリコンスリーブを作製する。

【0101】

CC型およびCIC型両方に関しては、組立工程において、好ましくは、背面から表面の位置あわせが必要なので、ウエハーを両面研磨することが必要である。CC型器具に関して、回収チャンバーは、好ましくは異方性湿化学エッチャントを用いてウエハーの表側内にバルクマイクロマシンされる。続いて、薄い熱酸化物を表面安定化処理層として働くように表面にのみ処理を施し、背面はフォトレジストにてコートする。キャピラリーに対するDRIE手順を、キャピラリーの孔が回収チャンバーの1つの側と合うように背面より実施する。

10

20

30

40

50

【0102】

図18は、CC型(およびCIC型)器具を組み立てるために必要な、二重側面化処理の断面図を例示している。ここで、続く背面でのキャピラリーおよびシリコンスリーブ内部連結の処理が、CI型器具に関するのと同じ処理に従うように、ウエハーが反転される。

【0103】

本発明の好ましい表面改変側面に関して、生体マーカである、アセチルコリンに特異的な表面結合蛍光プローブを提供するための技術的アプローチは、好ましくは、Inouye, M. et al., 「プロトン性培地中でのアセチルコリンの非破壊性検出: 人工シグナリングアセチルコリンレセプター (Nondestructive Detection of Acetylcholine in Protic Media: Artificial Signaling Acetylcholine Receptors)」, J. Am. Chem. Soc., 116, 5517 (1994)にて記述されている、溶液相検出に関して開発した方法を改変することで実施される。好ましい実施様態において本方法はスピロピラン類を使用し、これは販売業者より安価で簡単に入手可能である。これらはそのスペクトル特性に関して公知であり、とりわけ標準的ELISA検出法に関して使用される分子と比較して、非常に頑健度が高い。スピロピラン類は、シラン化学反応および標準的カップリング化学反応を用いて、回収チャンバー内またはキャピラリー内いずれかで、シリコンベッド上で合成的に表面固定される。

10

【0104】

図19は、シリコンキャピラリー内の固定されたスピロピラン類の拡大図を例示している。スピロピラン(たとえばC-メチルカリキシ[4]レゾルシナレン)は、好ましくは遊離アミノシラン改変シリコン表面にカップリングさせることが可能である、カルボン酸架橋基を組み込んで改変される。スピロピランへの塩基の化学量論的添加により、-プロモカルボン酸(たとえば5-プロモペンタノイル酸)の反応が可能になる。この分子の長さは、その水溶性および反応効率に関連する。炭素鎖の長さが長ければ長いほど水溶性であるが、表面へのカップリングが難しく、一方で炭素鎖の長さが長ければ長いほど、水溶性は少なく、表面へのカップリングがより起こりやすい。合成に続いて、反応産物を調査し特性化することが必要な時には、NMR分光法を実施できる。

20

【0105】

スピロピラン、またはレゾルシノール/アセトアルデヒドテトラマーが好ましくは皿型空洞内で準備し、アルキルアンモニウムカチオンを錯体化可能な、アルカリ培地中でテトラフェノレートを形成する。ピレン改変N-アルキルピリジニウムカチオン(PPC)と錯体形成する場合、蛍光は観察されない。PPCは、選択した方法により、購入するか、または合成してよい。一つの好ましいPPCの取り込み方法は、スピロピランとの溶液錯体化によるものである。スピロピランを固定化した後、PPCを導入して、錯体を形成させる。アセチルコリンの競合結合により、PPCが押し出され、蛍光錯体が産出される。この錯体は、微細加工アプローチにて、上記したレーザー/検出器スキームを用いて検出する。PPCはまた、スピロピランとPPCの混合単層を形成することで組み込むことができる。この方法においては、錯体は、溶液表面界面にて形成される。スピロピランとのPPC錯体の作製の他の好ましい方法は、上述のInouye et al.によって記述されたような、スピロピランへのPPCの合成的結合によるものである。本方法により、先の二つの方法にて記述されたような分子内クエンチとは対照的に、蛍光の分子間クエンチが可能になる。

30

40

【0106】

合成の終了に際し、シリコン基質は好ましくは、3-アミノプロピルトリメトキシシランのようなシラン類で誘導される。反応は、EDCのような、水溶性カルボジイミドを用いて、改変スピロピランのカルボキシル酸へカップリング可能である、シリコン表面上に、遊離アミノ基を提供する。X線光電子分光法(XPS)および接触角測定を利用して、さまざまな表面接着反応の進展を分析することができる。好ましい実施様態において、最も高い表面範囲が達成された。表面範囲に加えて、蛍光効率が蛍光顕微鏡を用いて試験され

50

る。このことは、連結したスピロピラン類の活性を限定するのを助ける。アセチルコリン添加前、およびアセチルコリンの添加後に、定性的蛍光強度をモニタリングするという簡単な実験によりベースラインが得られる。この時点で、本方法は試験のためのベッド器具内に移行される。

【0107】

微細加工作業の間、適切なベッド構造を産出するためにDRIEおよび湿化学エッチ率が、好ましくは試験試料を用いて測定される。さらに、好ましくは、試料を切除し、走査性電子顕微鏡を介して観察して、ウエハー通過キャピラリーの適切な切除形状が達成されているかどうかを測定する。化学反応作業に関して、表面改変および化学物質合成が、好ましくは、シリコンの平坦試料上での固定化プロトコールを確認するために使用される。この決定には、比較的大きな試料上の励起の後の蛍光の検出が必要であり、したがって、蛍光顕微鏡をこの試験手順の間使用する。

10

【0108】

一旦化学合成および表面改変作業が、厳密な大規模試料試験を介して完了したならば、次いで化学物質を小規模キャピラリーベッド構造上で試験する。このフェーズに関して、光子基礎試験セットアップが蛍光団の励起および放射に基づいて好ましく使用される。励起は、外部供給源からの直接の吸収を介する。整調可能連続波(CW)アルゴンイオン汲み上げ色素レーザー、空冷アルゴンイオンレーザー、光学パラメーター発振器を汲み上げるNd:YAGナノセカンドパルスレーザー、赤色(632.8nm)および緑色(543nm)波長出力のさまざまな小さい目のHeNeレーザーを含む、いくつもの好ましい供給源が、種々の試験戦略に関して入手可能である。Arイオン汲み上げ色素レーザーは、波長488nmおよび514nmでのポンプレーザーからの出力があり、最大電力は9Wである。CW色素レーザーからの最大電力は3Wであり、590nm~600nm、および610nm~630nmの範囲で整調可能であり、577nmにて追加出力を持つ。空冷Arイオンレーザーは、514nmでの単一出力であり、およそ70mVの電力である。Nd:YAGレーザーは、1064nmの基礎波長を持ち、内部調波生成器(KDP結晶)にて2倍(532nm)および3倍(355nm)出力が達成される。パルス幅は5~7ナノセカンドであり、ピークパルス力は200mJ以上である。しかしながら、シリコン表面上に固定化された蛍光団は、430nmで励起されることが必要であるので、三重出力Nd:YAGレーザーからの力を、ベータホウ酸バリウム結晶(BBO)を基にした、光学パラメーター発振器(OPO)を汲み上げるのに使用することができる。これは、本質的には非線形BBO結晶を含む光学共鳴空洞である。ポンプビームは、シグナルビームおよびアイドルビームと呼ばれるものに変換され、ここで波長は光子エネルギー変換要件より得られる以下の関係である。

20

30

$$1 / p_{u m p} = 1 / \text{ァイドル} + 1 / \text{シグナル}$$

2つの出力波長間の比は、付随ビームに関して、BBO結晶の角度によって決定される。これを使用し、出力波長を、結晶角を変化させることで整調可能である。シグナルまたはアイドル出力は、OPOの出力部分での高域または低域光学フィルターを用いて取り除くことができる。この出力は、400nm~2200nmの異なる範囲で整調可能である。波は、共鳴空洞鏡特性および出力フィルターによって設定される。これらの範囲のピークパルスエネルギーは10mJのオーダーである。

40

【0109】

出力蛍光は、好ましくは、前方方向、または微小構造幾何学に依存した任意の角度のいずれかで検出される。いずれの場合においても、付随レーザー光は好ましくは、ホログラフイーノッチフィルターおよびモノクロメーター両方を用いて遮断される。Raman分光計にて一般的に使用される、ノッチフィルターは、レーザーからの直接のもの、またはRayleighスッカッタリングからのものいずれも、放射光の波長でのすべての光を遮断する。モノクロメーターにより、周囲環境およびレーザーから両方の望まない光がさらに排除される。モノクロメーターによりまた、シグナル対ノイズ比の最適化のために、放射スペクトルの最大値を整調可能である。最終的に、検出は、好ましくは、レーザーエレ

50

クトロニクスよりゲートで制御して、光電子増倍管およびボックスカー統合器検出スキームを用いて実施される。あるいは、シグナルは、シリコンの電子なだれ感光性半導体素子にて検出し、より高い検出効率が提供される。

【0110】

C型ベッドにて、第一にキャピラリー孔の内部シリコン表面壁を改変するために、ついで第二に、固定化された側壁化学物質と反応する、分析物を引き出すために、キャピラリーの働きが、好ましく試験される。キャピラリー力が、試験しているキャピラリー寸法に対して有意な量の流体を引き上げるのに十分ではない場合、ここでC I型試験ベッドを好ましく使用する。このことによって、圧力勾配またはマイクロ流体内部連結に結合したシリンジポンプを用いて、キャピラリー内で流体の直接的な力学的挿入が可能になる。いずれの場合においても、キャピラリー内蛍光測定を実施する可能性を試験するのに、光電子検出システムが、好ましく使用される。一方、C C型試験ベッドは、回収チャンバーのシリコン表面内でのみ化学改変が必要である。したがって、この器具はまた、キャピラリーの働き、ならびにウエハーの表側上に位置する光電子検出システムを試験するのに使用することができる。さらに、本器具は、好ましくは、C I C型ベッドを用いて、分析物をキャピラリーアレイ内に挿入することで、力学的に試験することができる。

10

【0111】

一旦特定のベッドを選択したならば、さらなる試験は、好ましくは、キャピラリーアレイ内で固定化された化学物質に対する、生体マーカーの選択性および感度を決定することに関する。この型の試験は、好ましくは、たとえば、種々の濃度レベルでのアセチルコリンを含む溶液を導入することによって構築される。光電子増倍管からの出力を用いて、アセチルコリン濃度レベルの相当する変化をとまなう、蛍光の変化の量を検出することによって、アセチルコリン検出のより低い制限の定量的指標、およびしたがって器具感度が得られる。選択性を決定するために、他の連続する試験が好ましく実施され、分析物溶液内で種々の濃度の他の神経伝達物質が導入され、アセチルコリンに対して得られたものと関連して、その相対蛍光を測定する。アセチルコリン以外で、本試験相にて使用可能であるより一般的な神経伝達物質には、アドレナリン、ドーパミン、セロトニン、トリプタミン、ヒスタミンおよびグリシンが含まれる。選択性の総合的な試験のために、器具は好ましくは、望まない交差選択性蛍光反応を誘導することが可能である、ノルアドレナリン、チラミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、タウリン、およびプロリンのような他の神経伝達物質に対して試験される。最終的に、好ましくはヒトドナーからの従来抽出間質液を用いての、器具の *in vitro* 試験が実施される。高濃度の農薬に曝露された個体から試料を得、毒性環境に曝露されていない個体より対照セットを得る。

20

30

【0112】

本加工の試料結果および試験工程は、好ましくは、有機リン系農薬曝露に対する生体マーカーである、アセチルコリンの検出に関する化学物質固定化プロトコールをとまなう、シリコンに基づくキャピラリーアレイベッド (P μ P) である。さらに、感度プロフィールが確立される。P μ P 微小構造デザインにより、B - F I T 経皮サンプリングプラットフォームに対するモジュールとして簡単にインターフェイスで連結し、統合することが可能になる。経皮サンプリング工程は、好ましくは低侵襲的マイクロ-熱切除ヒーターを用いて、表皮角質/生内皮表面まで達するように開始され、これによって、間質液の抽出が可能になる。B - F I T マイクロシステムは、シリコン加工キャピラリーアレイの使用により、アレイの上端に位置するグルコース感受パッチへの間質液の送達を可能にする。P μ P 微小器具の基本的なキャピラリーアレイ構造を、B - F I T 内に組み込むことができる。生体マーカー、アセチルコリンのP μ P 内での検出メカニズムは、好ましくは、表面固定化された蛍光スピロピランの合成からなる。同定された化学物質により、ベッドの表面改変が実施され、これによって、廉価な、低侵襲的チップスケール検出の製造が簡単になる。

40

【0113】

B - F I T マイクロシステム器具の他の好ましい実施様態に際し、グルコースパッチのか

50

わりに、光子成分を組み込んだ化学反応が発展している。本システムは、好ましくは、アレイの上端において、導波技術によって適応され、それぞれ励起および蛍光を送達し、検出するのに使用できる。さらに、P μ P微小器具は、アセチルコリンの蛍光検出の観点から、B-FITへのモジュールとして理想的に適合する。刺激された体液およびヒト血清の試験は、好ましくは、試験ベッド上で実施され、化学反応の感度および特異性が測定される。

【0114】

本発明は、任意の数の、生体マーカーの加工および化学的固定を可能にし、それによって、モジュールの組をB-FITプラットフォーム内に「つなぐ(plugged into)」。酵素および代謝物を介した健康モニタリングに対する複数の分子生体マーカーから、ホルモンまでの範囲で、数多くの例、可能性および適用が存在する。農薬検出に関して、いくつかの他の重要な生体マーカーはアセチルコリンエステラーゼ、酢酸およびコリンである。P μ P微小器具の使用により可能となる、有機リン系以外の、他の分析物を検出することも重要である。これらには、抗コリンエステラーゼ殺虫剤(ホスホロチオネート)、オルガノクロリン殺虫剤(DDT、ディエルドリン、リンダン)、ピエチロイド殺虫剤(パーメスリン、フェンバレート)、除草剤(TCDD、パラクオート)、および殺鼠薬(ワーファリン、ジファシノン、フルオロ酢酸ナトリウム、ストリキニン)が含まれる。追跡する他の重要な生体マーカーは、アトロピンおよびプラリドキシムのような解毒剤であり得る。

【0115】

P μ Pの加工における処理段階およびそれぞれの装備には、好ましくは、以下の、(1)リソグラフィー：UVおよび深UVフォトリソグラフィーでの、1 μ mライン分解可能な表側マスク半導体微細パターン転写装置、二方アライメント可能な固定具、フォトレジストスピナー、プレおよびポスト-ベイクオーブン、および関連する処理化学反応、(2)沈着：金属(Al、W、Ni、Ti、Ptなど)を沈着可能なマグネトロンスパッタリングシステム、および加工において提供されうる酸化物のマグネトロン反応性スパッタリング、金属の低エネルギー沈着に対する、3つの炉を伴うe-ビームエバポレーター、およびストレスおよび接着に適合させるために表面をコートするための、PECVD酸化物および窒化物に対する沈着装置、(3)フィルム処理、急速熱アニーリング能力を用いた、フィルムおよび膜のストレスおよび強度を調整するためのもの、(4)光子マスクデザインおよび加工、(5)エッチング：ディープリアクティブイオンエッチャー(DRIE)、RIE装備および湿TMAHエッチング、(6)拡散および熱処理：湿性および乾燥酸素の増加が可能な高温加熱炉、およびめかしたシリコンからなるヒーターに関して必要になりうる加熱炉ソークアニーリング、および(7)測定：フィルムの厚さを測定するための、薄フィルターストレス試験器およびLeitz薄フィルター分析器、またはナノメーター自動化フィルム厚(Nanometrics Automatic Film Thickness)測定装置、が含まれる。高精度のLeitz顕微鏡およびEDS装備Zeiss SEMにて、顕微鏡試験も可能である。

【0116】

経皮送達システム(TTS)は好ましくは、種々の標準処理および加工技術を用いて製造される。TTS微小器具加工または、単純バルクマイクロマシンから、ディープリアクティブイオンエッチング(DRIE)手順まで、多くのマイクロマシン段階で実施される。

【0117】

TTS微小器具の加工処理段階は、好ましくは、図20で示しているような、2つのウェハーのシリコン処理を含む。ウェハー#1は、好ましくはレーザーバチャネル、キャピラリーチャネル、微小切除ユニット、および破壊可能シールからなる。微小切除ユニットは、ヒート-シンクと共にマイクロヒーターを含み、表皮角質に対して、高帯電熱パスが提供される。マイクロヒーター上にヒート-シンクを組み込むことによって、熱送達、より好ましく表皮角質に向かう。ウェハー#2は好ましくは、レーザーバマイクロヒーターを含み、これは好ましくは、

10

20

30

40

50

レーザーバチャネルの上部と適合するように並べられる。

【0118】

図21(a-e)は、ウエハー#1のためのウエハー処理段階の切除加工概略図を提供している。処理が表および裏側両方で実施される可能性があることから、本処理工程では、二方研磨した300 μ mの厚さのシリコンウエハーが好ましく使用される。1つの実施様態において、最初に、微小切除ヒーターを、パターン化したシリコン誘電性層上で金属層を沈着させ、パターン化することによって形成させ、電流が通過する湾曲加熱要素を形成させる。帯電は好ましくは、加熱要素が存在する正方形領域としてパターン化される。好ましいヒーター物質は、熱シミュレーションを介して選択することができる。加熱要素に加えて、加熱コイルを介した電流によって生成される局所温度をモニタリングするために、温度センサーを、好ましくは、それにそって統合することができる。これは図21aにて示されており、そこでは、処理がウエハーの上部側で実施されているが、最終的に底となるように逆にする。この型のデザインにおいて、すべての結合パッドおよびトレースは、加熱要素の平面に位置する。好ましくは、低ストレスシリコン窒化物層を、ウエハーを通して沈着させることによって、金属トレースおよび加熱要素を絶縁し、保護する。本表面安定処理化目的のためには、ストレスのない窒化物は要求されないけれども、続く段階での適用で利用可能である。

10

【0119】

図4(a-b)を振り返ってみると、第二段階は、好ましくは、破壊可能シールを加工することである。シールは好ましくは、先の段階にて沈着した、低ストレスシリコン窒化物層によって形成された二重層、および温度が上昇すると弱くなりうる金属からなる。金属が沈着した領域は、レーザーキャピラリーの位置を決定する。キャピラリー寸法は好ましくは、75 μ mのオーダーであるので、レーザーキャピラリーを開くために、破壊可能シールはこの75 μ m領域内に配置しなければならない。図4は、破壊可能シールのデザインの、底から見た図を示している。これは、シール金属によって架橋された、2つの低ストレスシリコン窒化物フラップからなる。この金属ストリップを介して十分に大きな電流が通過することによって、金属シールを弱めるのに十分な熱が発生し、それによって窒化物フラップが放出される。窒化物層は、ストレスにおいては低い、好ましくは、任意の制御可能な伸張および圧縮緊張が存在する。シリコン窒化物の沈着状態を調整することによって、シールが破裂したときに、窒化物フラップが、一方向のバルブとしてそのまま働

20

30

【0120】

好ましい第三の主要な処理段階は、微小切除加熱要素の上部で、ヒート-シンクを形成することである。以上で議論したように、ヒート-シンクは、好ましくは、バルクシリコン物質内での代わりに、角質表皮に向かって熱を向ける。その温度帯電性は空気よりも高いので、ヒート-シンクなしでは、大部分の熱はシリコンを介して移動する。ヒーター上にアルミニウムヒート-シンクを沈着させることで、得られる熱の流れは、シリコンおよびアルミニウム間にほぼ均質に分離される。これは、シリコンとアルミニウムの熱帯電性が類似であるからであるが、しかしシリコンおよびアルミニウムのものよりも高い熱帯電性を持つ金属を選択することで、より効率のよい熱送達が可能である。好ましい実施様態において、アルミニウムがヒート-シンク物質として使用されるが、しかしながらさらなる物質が適用可能である。角質表皮へ向かう温度の流れの増加に加えて、ヒート-シンクの配置が、好ましくは、熱供給源と皮膚バリアの間の総距離を減少させ、それによって、電力消費を減少させる。アルミニウムは、好ましくはリフト-オフ手順を用いてパターン化する。しかしながら、厚い金属層が必要である可能性があり、好ましくは、厚いフォトレジストを使用するか、またはアルミニウムを総ウエハー上で沈着させるかのいずれかである。このことにより、金属シールの問題が引き起こされる可能性があり、したがって薄い保護単離層がアルミニウムの前に好ましく沈着される。次いでアルミニウムを第四段階の後にリソグラフィでパターン化し、マイクロ切除ヒーター上にのみ残す。続く処理段階のために表面を平らに維持するために、パターン化は後のステージで実施する。

40

50

【0121】

第四の好ましい処理段階には、二方研磨ウエハーを逆にし、未処理の側を表にすることが含まれる。レーザーおよび薄キャピラリー両方が同時に形成される開口部をパターン化するために、フォトリソマスク層を好ましくは沈着させる。これらのキャピラリーは両方とも、狭く、高外観比ウエハー通過孔を得るために、ディープリアクティブイオンエッチングを用いて加工する。薄キャピラリーは、好ましくは、直径25 μm であるように設計され、一方でレーザーキャピラリーは直径およそ75 μm であり、両方とも名目長さは300 μm であるように設計される。DRIE処理の間、シリコンを孔がウエハーを通して作製されるまで、異方性にエッチする。しかしながら、レーザーキャピラリーに関しては、エッチング処理は、すでにウエハー後部上に存在するシリコン-窒化物上で終了する。これは、窒化物は、DRIEエッチ工程に対するエッチ終了として働くためである。以上でウエハー#1のすべての処理が完了したので、アルミニウムヒート-シンクを明確にでき、単離層を切除することができる。

10

【0122】

ウエハー#2に対する好ましい処理段階はまた、図22で示したような、切除加工概略図によって概説されうる。連続する段階は、困難ではないが、いくつかの整合問題が存在する。この好ましい処理における第一段階は、シリコンウエハーの表側上にレーザー加熱要素を加工することである。以前のように、これは、シリコン誘電表面上にヒーター物質を沈着させることによって実施する。物質は好ましくは加熱コイルの形態でパターン化し、続いて、保護シリコン窒化物表面保護層によって覆う。好ましい次の段階は、表面上にエッチ終了誘電層を沈着させることである。次に、ウエハーを反転させ、DRIEを用いてパターン化し、連結キャピラリー開口部を形成する。一旦完了したならば、第三の段階には好ましくは、レーザーヒーターを含む側上に、シリコン酸化物の層を沈着させることが含まれる。このことにより最終段階で、ウエハー#1のウエハー#2への陽極結合が可能になる。レーザーヒーターがレーザーキャピラリー開口部にあうことを確かにし、ウエハー#1からのキャピラリーを、ウエハー#2で形成されたキャピラリーと好ましく連結することを確実にするように、正確に注意をはらう。

20

【0123】

それぞれのキャピラリーおよびレーザーペアを好ましく、単一流体分析を実施するために、そのような対の1つのみが、皮膚表面に曝露されるように、個々に配置する。一旦利用したならば、キャピラリーの開口末端を、皮膚に曝露したままにするが、任意のさらなる使用のためには配置しない。

30

【0124】

好ましい実施様態には、シールを開き、熱を制御するための、シグナルに対するタイミングに関するさらなる考慮が含まれる。表皮角質の切除に影響を与える、ヒーターに与えられるエネルギーの総量、およびそのエネルギーが与えられる時間もまた考慮される。システムを、最小の切除エネルギーに対して設計し、試験する。すなわち、最小期間での最小エネルギーが、操作のための重要なパラメーターであり、結果として、基底生存表皮のダメージが最小になり、したがって、本工程の侵襲的特性が最小化される。

【0125】

キャピラリーシールの開放に関連した、切除処理(ヒーター)のタイミングを含む、他のタイミングの問題もまた、考慮される。当該キャピラリーに対するシールが破裂している時間、表皮角質の連続する層を温度的に切除するために、微小切除ヒーターが、好ましくは適切な交流電流でパルスされる。

40

【0126】

他のタイミングの考慮は、レーザーエリプティング工程に関連したヒーターパルスである。ヒーターパルス処理のタイミングは、レーザーへの流れを維持し、表皮角質からの流体を吸い上げないようにするための考慮である。流体レーザーの上部のヒーターは、好ましくは流体内容物を強制的に外に出す。このヒーターの制御によって、レーザー/キャピラリー分析の寿命中、流体の流れの制御が可能になる。

50

【0127】

種々のサブシステムの好ましい試験を、皮膚毒性学的、および臨床薬理学的利点を確立するために実施する。試験順序は好ましくは連続して行い、種々の物質における単純な試験で開始し、ヒト屍体皮膚または動物皮膚において、*in vitro*試験へ進み、次いで動物試験およびヒト被験者での最終的な薬理学試験を完了する。キャピラリーおよびレザーバをカバーする一回注入値を、好ましくは首尾よい配置に関して試験し、光学的に試す。流体レザーバを、流体成分を空にすることが可能であることを証明するために、好ましく最初に検査する。初期試験は、好ましくはまた、吸着表面上で実施する。さらなる試験を、キャピラリーからの溶液上昇の流れを証明するために、好ましく非吸着表面上で実施する。

10

レザーバおよびキャピラリーの組合せに対する最適流速の測定は、好ましくは、パッチ検出器でのグルコース濃度に基づいて測定する。

【0128】

グルコース検出器パッチ物質を、好ましくは、標準の*in vitro*湿化学反応法を用いて感度に関して試験し、そのセルロースプラットホーム - グルコース検出器物質が、 μm^2 あたり少なくとも10fgグルコースの反射率デンストメトリー検出可能であることを確かめる。

【0129】

3M Incおよびアドヘッジブリサーチ社 (Adhesive Research, Inc.) から得た、FDA承認の生体適合性接着剤および接着膜の (屍体の皮膚を用いた) *in vitro*および*in vivo*動物およびヒト生体機械的試験を、好ましくは、B-FIT器具の閉塞性、流体嚴重接着要件に関する、最適接着成分および皮膚浸透条件を決定するために実施する。B-FITシステムの初期試験の完了の後、前臨床皮膚毒性試験を開始する。これらの試験は、好ましくは器具の生物物理学の証明からなり、ヒト屍体皮膚または動物皮膚を用いて*in vitro*で実施し局所の皮膚効果の評価を行い、ついで生存動物にて実施する。

20

【0130】

皮膚毒性試験を、好ましくはB-FIT器具の生物物理学的特性を示すために実施する。生物物理学的試験は、好ましくは、動物またはヒト屍体皮膚上で実施する。完全な厚さのヒト腹部皮膚標本を、ピトロン社 (Vitron, Inc; Phenix, AZ) または他の供給メーカーより入手することができる。動物組織試料を、好ましくはベースラインおよび低減コストを確立するために使用できる。皮膚試料は、好ましくは熱切除メカニズムを調査し、最適化するためのプラットフォームとして使用される。B-FITシステムは、皮膚を切除するいくつかの異なる方法を持つ。熱/切除段階の目標は、損傷なしで表皮角質を生存表皮まで取り去ることである。実験の第一セットで、好ましくはたとえば温度ピーク、パルス期間、パルスの数などの最適切除状態を決定する。

30

【0131】

最適切除条件を決定する試験は、生存表皮を貫通することなしに、表皮角質の十分な切除を行うように、(a) 切除孔の深さおよび容量、および(b) 表皮細胞構造の完全性を見て測定するために、好ましくは光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて実施し、また原子力顕微鏡を用いて表面プロファイルメトリーする。

40

【0132】

安全性の前臨床評価を得るために、たとえば、毛なしラット、モルモット、またはファジーラット種を用いて、B-FITシステムの*in vivo*動物試験を好ましくは実施する。皮膚炎症、潰瘍形成、および炎症反応の肉眼的な証拠に関する臨床観察が好ましく実施される。光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて試験した皮膚生検により、器具生物物理学的效果により近い試験が行われる。器具の除去に続いて、連続的な臨床的および顕微鏡を用いた観察を行い、熱切除部位に関する回復時間の評価が可能になる。

【0133】

先にバリデート済みの血漿アッセイに比べ、経皮サンプリングを介してグルコース濃度を

50

測定する方法の分析精度および確度を測定するために、臨床薬理学試験を好ましくは実施する。好ましいアッセイ技術は、マイクロマシンキャピラリー内のグルコースオキシダーゼ固定化に基づく。許容可能な検出限界および定量限界、およびバラツキの許容可能な日内および日間係数をもつグルコースのパリデート済み血漿アッセイを使用し、以下で詳細に概略する2つの試験で記述した、臨床設定においてこれらのアッセイと比較した。開示した試験は同一のデザインであり、第一に健常人ボランティアで行い、第二にI I型(成人発症)糖尿病患者で行う。

【0134】

グルコースを測定するための経皮サンプリングの分析感度をバリデートするために、インフォームドコンセントに署名し、一晚絶食し、本試験の組入れおよび除外基準を満たすことを確認した10人の健康な男性および妊娠していない女性をグルコース耐性試験の前および間に、血漿または間質液中のグルコース濃度を測定するための臨床試験に登録した。B - F I Tシステムを、接着テープを用いて右手の甲表面に取り付ける。18ゲージの動脈内カテーテルを、左前腕静脈に挿入した。静脈血試料(およそ5cc、4cc以上)を、血漿グルコース濃度を測定するために、適切な間隔で採取した。血漿グルコース濃度を、臨床現場にて通常使用するパリデート済みアッセイにて測定する。これらの濃度を、B - F I Tシステムを用いた間質液中の濃度と比較する。血漿濃度を2時間にわたり15分間隔で8回測定し、一方間質液中濃度は75gのグルコースを経口投与する前に、同じく2時間にわたって0.5、1、2、5、10および15分の時間にて測定した。これらのデータを使用して、B - F I Tシステムに対するサンプリング時間を最適化する。グルコースの投与後、血漿中濃度およびB - F I Tシステム推定濃度を、さらに2時間、30分間隔で測定する。健康なボランティアにおいて、血漿グルコース濃度は、これらの条件下で80~140mg/dlの範囲であるべきである(Washington Manual of Medical Therapeutics, 28th edition, 1995)。

10

20

【0135】

臨床試験のための組入れ基準は以下である。群1: 21歳以上75歳以下の男性および女性、群2: 21歳以上75歳以下で、委員会認定の内分泌学者によって成人発症糖尿病の診断がなされた男性および女性ボランティア。群1: 市販薬または天然製品を摂取していない。群1: 完全血液計測、血清化学検査(Na、K、Cl、HCO₃、BUN、グルコースおよびクレアチニン)に関して臨床的に正常な検査値および臨床的に正常な肝臓酵素プロファイル、SGOT、SGPT、アルカリホスファターゼおよびビリルビンを示している。本プロトコールで記述した署名済みインフォームドコンセントを理解し、実施する能力のある人。

30

【0136】

以下の被験者を試験より除外した。治験責任医師の意見により、プロトコールの要件に不適合である被験者および妊娠している女性。

【0137】

一旦被験者が本試験に参加することに同意したならば、以下の手順を実施する。スクリーニング手順を試験開始の21日以内に実施し、それには既往歴の聴取および身体検査、組入れおよび除外基準の再確認、および血液および尿試料の採取が含まれる。試験への組入れに続き、被験者に以下の手順を実施する。(1) 一晚の絶食の後朝約9時に、臨床試験の実施機関に到着させる。バイタルサイン(心拍数、呼吸率、血圧および体温)を記録する。

40

【0138】

B - F I Tシステムを右手の甲表面上に置き、テープでしっかりと接着させる。記録を、モニターの下側の目立たない小さな針での皮膚に50ミクロンカテーテル挿入領域を介して実施する。モニターを記録がされているかを確認するために確認する。一旦器具をつけたならば、もう一度バイタルサイン(心拍数、呼吸率、血圧および体温)を記録する。被験者を仰向けに寝かせて、上記スケジュールにしたがってグルコースの測定のために動脈

50

血試料(5ccまたは1ティースプーン)を左前腕動脈内に挿入したカテーテルより採取する。さらなる血液試料を最初から4時間後および8時間後に採取する。B-FITシステムモニターテープおよび器具を取り外す。患者を退院させ、家に帰す。

【0139】

血液サンプリングスケジュールに関して、5mL動脈血試料を以上で記述した様式でバキューテイナー中で採取する。スクリーニング試料を含む、本試験中に採血総数は14である(12試験採血およびそれぞれ血液検査、化学検査および肝臓酵素のための2回のスクリーニング採血)。採血総量は100mLを超えないべきである。バイタルサイン(心拍数、呼吸率、血圧および体温)を、器具、カテーテルの取り付け前後および最後の採血の後に測定し、また器具、カテーテルを取り外す。患者には、器具を取り付けた腕における顕著な炎症を報告するように促す。医者は、本試験に参加している被験者の、静脈内カテーテルまたは複数回の採血による皮膚の挫傷または感染に関連した懸念に絶えず応じられるようにする。さらに多尿症および多渴症の症状に注意し、試験の間、糖尿病患者に注意をはらい、インスリンは必要に応じて医者および看護婦によってすぐに注入可能にする。統計分析には、B-FITシステムを用いて採取した値との比較として、臨床血漿アッセイを用いて測定した血漿グルコース濃度を含む。相関係数が、有意性 $p < 0.05$ で > 0.8 である場合、測定は有効であると判断する。

10

【0140】

糖尿病患者での第二の臨床試験を、同一の試験デザインを用いて実施する。患者に試験の前日に経口血糖降下薬の摂取を許可し、ただし試験の朝は許可せず、試験期間中インスリンを注入しないように指示する。一旦試験期間が終わったならば、患者に食事およびその従来の糖尿病レジメを再開することを許可する。上記安全性考慮に加えて、これらの被験者の試験中には、注意深い臨床モニタリングおよびインスリン利用可能性に対して大きな注意を払う。

20

【0141】

B-FITシステムは、好ましくは、単一バルクマイクロマシンから、より複雑なディープリアクティブイオンエッチング(DRIE)までの範囲の、多くの異なる微細加工技術および戦略を使用する。図5に戻ると、好ましい1つのチャンネルシステム微小器具の断面図が示されており、好ましくは、(1)生理学的に適合性のある流体をサンプリングし、分析するための、それぞれ固有のレザーバチャンネルを持つ、いくつかの湾曲キャピラリーチャンネルを含む本体、(2)湾曲構造の最も下の部分を形成し、実質的な生理学的に適合性のある流体抽出のために、表皮層に熱で穴を開けるためのマイクロ加熱要素を含むための、底部キャッピング部分、および(3)湾曲チャンネルの上部を形成し、必要ならば、湾曲チャンネルの水平部分を通して、電気-浸透くみ出しを用いた、生理学的に適合性のある流体の流れを補助するための電極を含む、上部キャッピング部分、の3つの主要コンポーネントからなる。第一および第二コンポーネントは一緒に、本システムの使い捨てモジュールを形成する。これらの取り替え可能B-FIT要素を、すべての分析キャピラリーが使用された後に、主要連結容器内に挿入する。

30

【0142】

狭い、高観点比ウエハー通過孔を得るために、レザーバおよびキャピラリーチャンネルを、好ましくは、ディープリアクティブイオンエッチングを用いて、標準のシリコンウエハー内で加工する。キャピラリーチャンネルは、好ましくは、直径が $25\mu\text{m}$ 、名目長さが $500\mu\text{m}$ であるように設計し、一方レザーバチャンネルは、直径 $50\mu\text{m}$ であるが、 $500\mu\text{m}$ よりわずかに短くエッチする。湾曲キャピラリーチャンネルの側面部分は、好ましくは、 $25\mu\text{m}$ までのシリコン表面をリセッシングすることで形成させる。この領域はまた、好ましくは、本メカニズムによって、分析物の光学検出を容易にするために、表面上に高反射性金属を含む。シリコンの上部キャッピング部分への結合の後に、湾曲構造が完成する。これらの寸法によって、汗または間質液のような、生理学的に適合性のある流体を、キャピラリーの働きを介して、チャンネルの開放末端内に抜くことができる。さらに、レザーバ内の流体を、好ましくは、キャピラリーの働きに関連して使用し、試験している表皮領域

40

50

を洗浄し、これによって、より小さなチャンネルを介した、生理学的に適合性のある流体の送達を助ける。特異的抗体固定を保持するために、内部キャピラリーチャンネル表面を活性化することによって、流体を好ましく、抗体-抗原鎖形成によって分析することができる。それぞれその固有のレザーパチャンネルを持つ、そのような一連のキャピラリーを、単一器具要素内に含める。それぞれの分析キャピラリーおよびレザーパペアは、好ましく、単一流体分析を実施するために、皮膚表面に対してそのような1つのペアのみを個々に曝露するように配置する。一旦使用したならば、キャピラリーの開放末端を、皮膚に曝露し続ける。

【0143】

湾曲チャンネルの下方構造を形成する役割は別として、底部キャッピングユニットはまた、好ましくは、シリコンを用いて作製され他の主要な機能として役立つ。この区画内に組み込まれたマイクロマシン加熱要素は、好ましくは皮膚表面に熱的に穴を開けるために使用され、これによって、チャンネル内で間質性および生理学的に適合性のある流体がより入手しやすくなる。表皮角質開孔 (poration) 手順の間同時に、マイクロシステムを好ましくは、キャピラリー-レザーパペアをそれぞれ個々に配置するために使用する。まず、皮膚に接触しているチャンネルのすべての開放末端を、単一分析キャピラリーをあらわにするために、「粉碎 (blown)」することができるシールによって覆う。この加熱分解手順は、シリコンマイクロ-抵抗によって提供されるような、シールに最近接した大きな温度勾配を用いて効果的に制御できる。マイクロヒーターを、好ましくはそれぞれのキャピラリー-レザーパチャンネルを囲うシリコン領域に統合する。この区画内の連結マイクロ-キャピラリーは、好ましくはDRIEを用いて形成し、それぞれは、本体からの垂直マイクロ-キャピラリーと並んでいる。

【0144】

2つの先のコンポーネントとはちがい、上部キャッピング層は、好ましくは、プラスチックで作られ、いくつかの課題を達成するために使用する。まず、湾曲チャンネルの上部構造、または側面部分をなす。この領域は、好ましくは、本発明者らのマイクロシステムの検出領域である。第二に、プラスチックを使うことで、内蔵された導波管が、物質内で好ましく加工でき、その方向性は、シリコン表面に対して併行に走り、統合光電子分析システムの基礎をなす。さらに、導波管からの光を検出領域に連結するために、マイクロ鏡が好ましくプラスチック内に統合される。さらに、より効果的な光カップリングおよびより高い効率のために、マイクロレンズを、好ましく、検出領域の直上に配置させたプラスチック内に統合する。マイクロ鏡を、好ましくは、プラスチックを湾入するために三角形態を用いることによって、この上部分内にプレス成分として統合する。得られた湾入は、表面に対して45°の角度である。高反射物質の沈着を行い、導波管下方向からの水平方向光を反射するマイクロ鏡を与える、斜角が得られる。統合マイクロレンズはまた、プラスチック内に直接押し込むことができ、または注入モールディングを用いることによって、プラスチック内に位置する分離ユニットとして組み込むことができる。どちらの場合でも、レンズは、高精度である必要はないが、しかし、単純に、導波管起源の光を発散させるべきである。導波管からの光によって産出される照射は、蛍光に対するタグ化分析物を生み出す可能性がある。次いで、産出された光が、検出領域の底表面より、集光レンズを通してもとに反射される。

【0145】

図6に戻ると、個々のマイクロキャピラリーシステムの3つの可能性のある(制御可能な)状態が示されている。一番左のマイクロ-キャピラリーシステム(#1)は、分析手順に関してすでに使用した、使い果たしたキャピラリーを示している。この第一のペアは、完全な熱切除、微小な流体の流れ、曝露された間質液からのグルコースの捕獲、グルコース検出パッチとの遭遇、およびチップの上部表面での青みを帯びた色反応事象を示している。中央のマイクロ-キャピラリーシステム(#2)は、オンデマンド分析を実施しているところである。最も右のキャピラリーシステムは、オンデマンド分析を実施する準備段階である。

10

20

30

40

50

【0146】

微小器具の目的は、表皮角質の内表面の直下に位置する、生存表皮中の間質液からのグルコースまたは他の浸潤性が低い分析物（群）の分子の、微小器具の上部に位置する検出パッチまでの送達を促進することである。微小器具は、表皮角質の熱微小切除による、マイクロ流体サンプリング流体の、間質液との直接的な接触を可能にする。間質液との直接の界面により、微小器具は、通常近づきにくい極性分子のみではなく、タンパク質のような、不浸透性のより大きな分子のサンプリングをも可能にする。

【0147】

好ましいプログラムされた連続事象の第一は、生理学的に適合性のある流体を含む、密封したレザーバ内に存在する微小水圧を作り出すためのレザーバ加熱要素を通した電流の流れである。第二および第三の段階は、ほとんど一緒に起こり、破壊可能シールおよび微小切除ヒーターを介した、2つの別々の電流からなる。シールは、好ましくは温度が上昇すると破裂する、金属耐電性二重層である。金属シールは、好ましくは、その操作の前に、シールの完全性を折衷する機会を減少させるために、低ストレスシリコン帯電性要素上に表面沈着させる。一旦分析手順の間にシールが壊れたならば、生理学的に適合性のある流体が、好ましくはレザーバからマイクロヒーターによって熱的に切除された領域を流れて落ちる。シールが破裂している間、微小切除ヒーターは好ましくは交流でパルスされており、厚さにして一般的に約30～60 μmである表皮角質の連続層を熱的に切除する。微小切除は、好ましくは表皮角質の非常に制限された容量、およそ50 μm × 50 μm × 30 μmで起こる。レザーバヒーターおよびキャピラリー力の二重活性により、新規空のレザーバからの生理学的に適合性のある流体が間質液と接し、混合液は、検出パッチへと送達される。生理学的サンプリング流体のバルクは、好ましくはレザーバの外に強制的に出され、皮膚表面領域を空にし吸着検出パッチ内に出される。さらに、強力なバンドエイド様接着フィルムが、好ましくは微小器具を皮膚との流体の強力な接触で保持し、分析領域からの間質性および生理学的に適合性の流体の逸脱を防止する。流体は、好ましくは微小器具上のキャピラリーの直上の分析キャピラリーより検出パッチへ強制的に出され、たとえば1つの実施様態において、グルコースの存在を示すために変色を産出する。

【0148】

本発明のマイクロシステムコンポーネントは、好ましくは、間質液からの代謝物の経皮送達の増強、および酵素固定化学反応での結果としての検出を用いる分子スケール操作に基づいている。試料は好ましくは、低侵襲的経皮微小器具を用いて採取し、検出されうる皮膚の最外層（表皮角質）下に存在する間質液からの受動拡散によって、皮膚の表面に達する分析物の量をトレースする。これらの分析物は体の他の部分から来て、血液循環を介して間質液へ送達されるので、これらは環境化学物質または農薬への体曝露、並びに内部代謝を含む種々の生理学的工程を反映している。表皮角質の微小層を、表皮角質の直下に存在する生存表皮からの間質液の汲み上げを可能にするように穏やかに切除する。

【0149】

健康および他の重要な生物学的マーカーの測定のための好ましい検出スキームは、各アッセイに関して同一の表面および生化学物質を使用する。図8に戻ると、検出スキームに関する好ましい手順が示されている。好ましい手順は、タンパク質または被験者の代謝物の抗体を、蛍光タグ化抗原を組み込んでいるキャピラリー壁へ共有接着させることである。タグ化した抗原は、サンプリングされた間質液からの、被験者のタンパク質または代謝物に競合的に結合することによって置換される。蛍光抗原は溶液中に押し出され、光電子コンポーネントによって回収チャンバー内で、下流にて検出される。蛍光団励起および放出特性を光子に適合させ、光子モジュール中で正しく励起し放射を検出するために正しい波長供給源、検出器およびフィルターを統合する。

【0150】

例として、さまざまな分子量の以下の3つのタンパク質、トロポニンI、C-応答性タンパク質およびプレアルブミンを、健康特性をモニタリングするために使用することができる。アミノプロピルトリメトキシシラン（APT S）のシラン表面処理に続いて、キャピ

ラリー壁に抗トロポニン I を共有結合させる。トロポニン I を、蛍光またはローダミンのいずれかを用いて蛍光タグ化し、キャピラリー中に連結した抗体に結合させる。サンプリングからのトロポニン I の競合結合を用いて、蛍光タグ化トロポニン I を溶液中で置換し、下流で検出する。上記手順はまた、これらのタンパク質間の違いを考慮して変更するけれども、C - 反応性タンパク質およびプレアルブミン両方に関して使用することができる。

【0151】

十分な表面コーティングを保証するために、表面化学物質を段階的に特性化する。結合した抗体および競合結合試験の量を、XPS、蛍光プレートリーダー、蛍光顕微鏡、または分離技術のような異なる器具を用いて、試験する。

10

【0152】

他の実施例において、カフェイン代謝物、5 - アセチルアミノ - 6 - ホルミル - 3 - メチル (AFMU) および 1 - メチルキサンチン (1X) に対して作製したポリクローマル抗体を、マイクロマシンキャピラリー上で固定化する。キャピラリー表面上にヒドロキシル部分を導入するために、キャピラリーチューブを、化学処理によって変更する。次いで表面ヒドロキシル基を APTS と反応させ、3 炭素鎖の末端の遊離アミノ部位と、分子連結を産出する。

【0153】

AFMU および 1X に対して作製した抗体の Fc 領域中の糖残基を、過ヨウ素酸塩を用いて酸かし、アルデヒドを産出する。抗体を、抗体上のアルデヒドと、分子連結上のアミン間のシフ塩基形成を介して、マイクロマシンキャピラリーの表面に連結させる。この様式において、抗体結合領域は、マイクロマシンチャンネルの表面からはなれて方向付けられる。

20

【0154】

微小チャンネルの表面上での抗体固定化の量を、好ましくは、微小チャンネルへの曝露の前後に、結合溶液のタンパク質含量の分析によって決定する。固定化抗体の結合活性は、蛍光標識化 AFMU および 1X プローブの置換を用いて測定し、観察された活性を、非固定化抗体の当量濃度の活性と比較し、固定化抗体 mg あたりの結合親和性指数 (BAI) を算出する。

【0155】

カフェイン代謝物に関して、AFMU および 1X 抗体の特異性を評価するために、*in vivo* および *in vitro* 試験を実施する。本発明の器具を用いた、これらの代謝物の比を測定するための能力は、携帯式生体医学的モニタリングシステムを用いて得た比を、従来の HPLC 方法を使用して得た比と比較することで評価する。本アッセイにて変更した器具を、*in vivo* および *in vitro* 両方にて、前臨床評価を実施するために試験する。これらのデータは、ベースラインおよびアルゴリズムを試験するための予備データとして使用する。

30

【0156】

プレアルブミン、CRP、トロポニン I に対する抗体は現在のところ市販されており、そのタンパク質に対するこれらの抗体の特異性を評価するのに使用する。いくつかの市販されている抗体は活性ではないか、または特異的ではないので、このプレスクリーニング試験は、それぞれの被験者タンパク質に対する活性および特異性を決定するために好ましい。特異性を、好ましくは交差反応する可能性がない、構造が同一の他の基質を加えることにより、それぞれの抗体に関して試験する。たとえば、プレアルブミンの評価においてとりわけアルブミンおよびグロブリンのようなタンパク質を加える。カフェイン代謝物の評価においては、キサンチン類およびキサンチン代謝物を加える。抗体、リガンドおよび蛍光標識リガンドを用いたアッセイは、フローインジェクション分析 (FIA) のような技術を用いて好ましく開発する。

40

【0157】

それぞれの完成したアッセイを精度、再現性、線形性に関して評価し、結果を、臨床検査

50

にて現在使用されている既存の手順と比較する。in vivo および in vitro 試験に関する前臨床評価を実施し、データを開発されたアルゴリズム中で使用する。

【0158】

本発明の携帯式生物医学的モニタリングシステムは、好ましくは、マイクロチャネル内での経皮線量測定固定化抗体、流体移動度に対するキャピラリーの働き、および検出のための統合光電子を用いた、代謝物および他の体分析物の増強経皮送達を用いた、分子スケール操作に基づいている。したがって、本発明のマイクロ流体チップインターフェイス技術は、宿主流体からの制御された試料採取（循環および非循環）、および流体（薬物、化学物質）および標的プローブ（抗体、タンパク質、シグナル分子）の制御送達を提供する。さらに、本発明の試料採取プラットフォームは、気体または溶液狭量環境対象分析物をサンプリングするための「外部向き（outward facing）」器具コンポーネント、および皮膚表面または接近可能体液から発散される標的分析物の検出のための、「内向き（inward facing）」構成物を同時に利用することができる。

10

【0159】

本明細書で開示している携帯式生物医学的モニタリングの器具および工程は、広範囲の化学物質に適用可能である。たとえば、本携帯式生物医学的モニタリング器具には、健康（チップ「A」）および疾患または感染（チップ「B」）をモニタリングするチップを含みうる。チップAは、グルコースのような分子を測定し、正常および高ストレス状態での被験者の健康状態のベースラインを確立可能である。これらのベースライン値からの変化は、チップBに対する必要性を示す可能性がある。チップBは、疾患の正確な原因を決定するために設計される。たとえば、チップBは、化学兵器を真似るパラチオンおよびその代謝物にカップリングする抗体を含みうる。マイクロシステムの構造は、薬物代謝および/または「プローブ薬物（probe drugs）」に基づく多くの他の型の化学物質に適合可能である。

20

【0160】

薬物代謝は、酵素触媒反応によって、薬物が尿中および胆汁中に簡単に排泌される産物または代謝物に変換される工程である。薬物代謝物の1つの経路は、第I相反応であり、基質分子中の官能基の作製または改変が含まれる。シトクロームP450依存（CYP）ミクロソーム混合機能オキシダーゼ系が、これらの反応に対してとても重要な酵素系である。第二の主要な経路には、第II相反応が含まれ、そこで、薬物または第I相代謝物は、水溶性内因性基質とカップリングする。第II相反応は、トランスフェラーゼとしてまとめて公知である種々の酵素群を含む。この群には、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ、UDPグルコシルトランスフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、メチルトランスフェラーゼ、およびN-アセチルトランスフェラーゼが含まれる。

30

【0161】

薬物代謝は、食事および環境因子によって影響を受ける。たとえば、アルコール、特定の食物成分およびタバコの煙内の化合物が、工業汚染物および農薬のように、多くの薬物の生体内変換に影響を与えることが観察されてきた。遺伝的因子もまた、薬物代謝の制御において重要な部分を果たしており、個体間での薬物効果の大きな違いが存在する。いくつかの酵素に関して、別々の遺伝的亜群がヒト集団に存在する。これらの遺伝的多型は、酵素発現または活性の減少、増加、または欠失を引き起こす、これらの酵素をコードしている遺伝子内の変異によって産出される。さまざまなCYP類の遺伝的多型が同定されており、その活性は、2つに明確に定義された、そして質的に異なる集団、代謝の速度および量が少ない個体（弱代謝者、PM）、および代謝が早いかまたはより多量である個体（過代謝者、EM）に分けられる。いくつかの第II相酵素の遺伝的多型もまた存在する。たとえば、N-アセチルトランスフェラーゼ-2（NAT-2）は、この方法にて影響を受け、このアセチル化多型は、種々の薬物および発がん物質の代謝に関与する。多くの対立遺伝子が、本酵素の機能の減少に関わっており、二方向分散が観察されている。個体の50~60%が遺伝的に遅延アセチル化性質であり、残りは早いアセチル化性質である。

40

50

【0162】

健康な個体において、代謝遺伝子型は通常、代謝表現型を予測する。すなわち、特定の酵素に関して、遺伝子型的に過代謝者は、この酵素に対する基質である薬物を効率的に代謝することが観察されており、遺伝子型的に弱代謝者は本処理において、欠失している。しかしながら、薬物相互作用、感染、疾患進行および栄養不良は、代謝酵素の相対濃度および活性の変化を起こす可能性がある。したがって、健康な個体において、遺伝子型とその発現（表現型）との間の関係が保たれており、すなわちFAST遺伝子型はFAST表現型を起こし、一方でSLOW遺伝子型はSLOW表現型を産出する。しかしながら、個体の疾患状態は、食事、喫煙、アルコール、環境化学物質、および生物兵器または化学兵器がそうであるように、この関係を変えることができる。この理由のために、代謝表現型（実際の酵素活性の測定）の決定は、非常に重要であり、健康および臨床的状态の、直接のそして感度のよいプローブとして使用することができる。好ましい実施形態において、無害の試験化合物またはプローブ薬物によって産出される特定の代謝物パターンの同定および定量を、被験者の代謝表現型を決定するのに使用することができる。たとえば、カフェインはNAT-2を伴うものを含むさまざまな経路によって代謝される。したがって、2つの代謝物の尿中比、5-アセチルアミノ-6-ホルミルアミノ-3-メチルウラシル（AFMU）対1-メチルキサンチン（IX）はNAT-2活性の指標である。

10

【0163】

多くの実施形態の例を以下に示す。それぞれの実施形態は、単独、または本発明の他の実施形態と組み合わせて実施することができる。

20

【0164】

たとえば、以上で記述したように、グルコース、カフェイン、エタノール、およびデキストロメトロファンのような、ヒトの健康の異なる化学的プローブの検出のための化学物質を含むが限定せず、「ストレス（stress）」の性質または代謝マーカーをモニタリングすることができる。「ストレス」は、インスリン-グルコースパターンの変化、または安全な、一般的に使用されている刺激物（カフェイン）または抗ヒスタミン剤（デキストロメトロファン）の異常肝臓異化作用のような、多くの内部代謝経路の検出可能な変化を介してそれ自身明らかになりうる。

【0165】

酵素N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT-2）は、カフェインを代謝する。本酵素は、高度に多型性である。NAT-2の活性は、薬物副作用、種々の毒素および疾患に対する傾向に関連することが知られている。高速および遅延N-アセチル化型の2つの主要な代謝表現型が同定されている。NAT-2（表現型）の発現活性は、急性および慢性疾患状態によって影響を受けることが示されている。たとえばHIV+およびAIDS患者において、急性疾患の存在によって、NAT-2の発現活性が減少し、急速NAT-2表現型の患者が、遅延NAT-2表現型に変化する。疾患が解決し、患者が初期臨床状態に戻った時に、患者は再び急速NAT-2表現型を発現する。したがって、個体のNAT-2表現型の決定および本表現型の変化のモニタリングは、個体の健康および臨床状態の直接の、そして感度のよいプローブでありうる。この決定により、薬物治療を開始する前に、患者がFASTか、またはSLOW代謝者であるかどうかの予測が可能である。このアプローチは、処置の開始の時点で好ましい投与量で治療を行い、薬物の過剰投与または過少投与を避けるように薬物治療を開始する前にすべての患者をスクリーニングすることを可能にする。

30

40

【0166】

NAT-2表現型は、多くのプローブにより決定できる。好ましい実施形態において、その広範囲分布と比較的安全であることから、カフェインを使用する。プローブとしてカフェインを使用する試験において、酵素の表現型は、2つのカフェイン代謝物の比、AFMU対IXによって決定する。これらの代謝物の比に基づいて、酵素の活性を決定できる。ポリクローナル抗体を代謝物AFMUおよびIXに対して生成し、ついで精製する。これらの抗体は、NAT-2表現型を決定するために、首尾よく使用される。

50

【0167】

好ましい検出スキームは、特定の代謝物または化学抗原の抗体の、キャピラリーの表面への連結からなる。抗体は、ローダミンのような蛍光タグに連結した特異的抗体に結合する。抗原がチャンネル内に流れる時に、下流で検出される蛍光タグを放出する。

【0168】

したがって、他の実施様態において、NAT-2を用いた表現型決定を、感染または疾患状態を示すために構築する。酵素NAT-2は高多型性である。NAT-2の活性は、薬物副作用、種々の毒性および疾患の素因に関連する。この表現型の変化のモニタリングは、兵士の健康および感染状態の直接の、そして感度の高いプローブである。

【0169】

さらなる実施様態において、有機リン系化学（神経）物質を、殺虫剤代理モデル化合物パラチオンを用いてモニタリングする。タブン、サリンおよびソマンのような、「神経ガス（nerve gas）」タイプの化学兵器は、アセチルコリンエステラーゼを阻害することで作用し、有機リン系殺虫剤、パラチオン（またはその代謝物）は、曝露を検出するための優れた「代理（surrogate）」分析物を提供する。したがって、パラチオンモニタは、重要な工業的および社会的適用性を有する。

【0170】

さらなる実施様態において、たとえば、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、および腫瘍壊死因子（TNF）などの、微生物毒素に対する炎症続発症をモニタリングする。循環IL-1、IL-6およびTNFは、本発明にしたがった、浸透増強経皮技術および高等検出システムデザインを用いて採取し、検出可能である候補分析物を与える。

【0171】

たとえば、さらなる実施様態において、アントラキシ、ボツリヌス毒素、エンドトキシンなどの、微生物毒素をモニタリングする。微生物毒素は典型的には大きな分子であるが、微視的力学的バリア改変技術（たとえば熱微小切除）を用いた表面上移動の増加に関連した、これらの非常に高い生物学的力により、毒素応答性成分を組み込んだ検出システムを用いる経皮線量測定が可能になりうる。さらに、抗体タグを、感染剤の同定、および微生物およびウイルス負荷の決定のために使用することができる。さらに、（微生物供給源からの）D-アミノ酸の決定は、抗体治療に対する応答のモニタリングを可能にしうる。

【0172】

さらなる実施様態において、孢子代謝物をモニタリングできる。微生物孢子のリンパ系および肝臓系経路を介した、ヒト異化作用から得られる循環生物化学的代謝物は、本発明の技術および最適化検出システムデザインを用いて採取し、検出する。

【0173】

さらなる実施様態において、以下の表で示したような特定のタンパク質をモニタリングする。

【表1】

タンパク質	濃度 (mg/L)	Mol. Wt. (kD)
プレアルブミン	70~390	54
C-反応型タンパク質	0.06~8.2	115~140
トロポニンI	<0.0001	76

【0174】

プレアルブミン（MW 54,000）は、栄養状態の重要なマーカーとして知られている。0~1ヶ月齢に対する参照範囲は70~390mg/Lである。本実施例の使用には、栄養状態に関する内部都市小児集団のスクリーニング、ならびにとりわけ手術前の、栄

10

20

30

40

50

養状態に関するすべての患者のスクリーニングが含まれるがこれに限定されない。

【0175】

C-反応型タンパク質(MW 115,000~140,000)は、急性相反応物質であり、多くの疾患工程で上昇する。成人での参照範囲は、68~8200 μg/Lである。本タンパク質の測定によって、健康対疾患のよい指標が提供される。C-応答型タンパク質はまた、心臓疾患および切迫心筋梗塞の重要な予測物質でもある。したがって、本アッセイは、心血管の健康に対してスクリーンするためにも使用することができる。

【0176】

トロポニンIは、急性心筋梗塞に対する有用で、特異的なマーカーとして認識されている。成人での参照範囲は、<0.1 μg/Lである。心筋梗塞患者は、>0.8 μg/Lである。本アッセイは、病院の救急室中での、トロポニンIのリアルタイム評価を提供し、患者が集中治療室に対し許容されることが必要であるという、早期認識を提供する。

10

【0177】

モニタリングに加えて、本発明の生物医学的モニタリングシステムは一日を通して特定のレベルで体内の特定の薬剤の濃度を維持するために、in bursts フィードバック制御を伴う薬物送達を提供し、そのレベルは1日ごとに、および1日の間で変化可能である。そのような物質の例には、ホルモンエストロゲンおよびテストステロンが含まれる。年齢にともなうエストロゲン減少は、女性における骨粗鬆症および心臓血管疾患のリスクの増加に密接に関連している。さらに、薬理学的エストロゲンによる置換が、心臓血管疾患による死亡率を改善し、骨粗鬆症骨折のリスクを減少させ、アルツハイマー病から女性を保護する重要な役割を果たす可能性がある。これらの疾患は、非常に大きな社会的インパクトおよび費用を要するが、しかしエストロゲン置換による処置は乳がんおよび子宮ガンの進行を含む副作用の発現のみではなく、皮膚変化、体重変化、鬱を含む他の効果の発現にも関わる。エストロゲンそれ自身のように効果的であると示されている治療薬は存在しないが、骨、乳または他の組織上で選択的に作用する改変エストロゲンを発展させるために、大きな努力が払われてきた(特異的エストロゲンレセプターモジュレーターまたはSERM類)。生理学的に、制御され、モニタされた様式で、効果的なエストロゲンを投与するアプローチが魅力的であり、もっとも効果的な薬物治療であり、それを用いた画期的な治療方法は、大きな利益を保証する。

20

【0178】

制御され、モニタリングされた様式でのテストステロンの送達もまた有用でありうる。HIVを含む、多くの病理学的状態でそうであるように、テストステロンの血清濃度もまた年齢によって減少する。HIVおよびがんによる消耗、男性骨粗鬆症および慢性閉塞性肺疾患の処置のためのテストステロン置換方法が浮上しており、首尾よい回復率および可能性を増強するために、主要な手術の後に、短期間の制御された投与のために有用でもある。これらの実施様態の実現可能性は、Rhesus雌サルおよびヒト女性でのエストラジオール(E2)の経皮検出を介して調査する。原型固相E2検出システム(TED)を、TED中のE2に対する抗体を固定化する経皮パッチ内に組み込むことができ、放射免疫アッセイ手順を用いて、ex-situで分析できる。E2検出システムは、0.125ピコグラム以下で検出可能である。TEDを、部分的または完全に去勢したメスのRhesus雌サル(n=3)の胸上に、24時間備え付けることでまず試験し、プラセボまたは20 μg/kg エストラジオールベンゾエートで処理する。TED測定は、高循環E2濃度を持つサルと、循環E2を持たないサルを区別する。TEDはまた、広範囲の循環E2濃度(48~382 pg/ml)を示している4人の生殖年齢ヒト女性の前腕に塗布することが可能である。TEDにて採取されたE2は0.06~0.5 pgにわたり、循環E2濃度に大まかに比例する。これらのデータは、in vivo浸透係数4.3+/-0.5 x 10⁵ cm/hrと一致する。

30

40

【0179】

さらなる実施様態において、本発明の携帯式生物医学的モニタリング器具は、痛みの管理のために使用可能であり、痛みの制御を実施する一方で、細胞毒性を最小化するために、

50

コデインおよびモルヒネなどの送達の最良の方法を決定する。

【0180】

本発明のさらなる実施様態において、MEMSに基づく物理療法チップを、正常および異常環境状態下でのヒトの機能に関連する基礎的生理学的観点を非侵襲的にモニタリングするために使用できる。体温、パルス率、血圧、および心臓活性（心電図）のような関連する生理学的データの慎重なモニタリングによって、極小変化、または異常な振る舞いが、ヒト系に対するストレスの早期指標を提供可能である。

【0181】

さらなる実施様態において、受動的、または非侵襲的熱線量測定は、正常の皮膚バリアの物理または化学的改変なしに使用される。本実施様態は、溶液および水溶性両方を示している低分子量分析物に関して実用的である。

10

【0182】

実験および臨床試験の以下の記述は、本発明の種々の実施様態が、どのように実施されるかを示すために提供される。本発明のこれらの実施様態の操作を示すための好適な分析物が以下で提供される。しかしながら、本発明のシステムおよび方法は、本発明の種々の実施様態内でのとても広範囲の分析物の組の分析を考慮することを認識すべきである。

【0183】

固定化ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を基本とするHPLC静止相の開発およびこれらの相の、薬物-受容体相互作用のオンライン測定への適用

nAChR-界面活性剤溶液の調製 ラット総前脳またはトランスフェクト細胞を、50 mM Tris-HCl、pH 7.4 (緩衝液A) 中に懸濁し、ブリンクマン ポリトロン (Brinkmann Polyttron) にて30秒間均質化し、40,000 × g にて10分間、4 で遠心する。ペレットを、緩衝液A中の6 mlの2%デオキシコール酸、または2%コール酸中に再懸濁し、2時間攪拌する。混合液を35,000 × g にて30分間遠心し、nAChR-デオキシコール酸溶液を含む上清を採取する。

20

【0184】

MM粒子またはスーパーデックス (Superdex) 200ゲルビーズ上でのnAChRの固定化 乾燥IAM粒子を4 mlの、nAChRサブユニットまたはサブタイプを含む、得られた界面活性剤溶液中に懸濁する。1つのnAChRサブタイプの固定化のために、IAM-界面活性剤-レセプターの混合液を、室温にて1時間攪拌する。この懸濁液を、2 × 1 Lの緩衝液Aに対して、4 にて24時間透析する。次いで、固定化nAChRを含むIAM LC支持体を緩衝液Aにて洗浄し、遠心し、固体を採取する。

30

【0185】

60 mgのL- - レシチン (20% ホスファチジルコリン)、10 mg L- - ホスファチジルセリン、および20 mg コレステロールの乾燥脂質混合物を、4 mlの得られたnAChR-界面活性剤溶液で可溶化する。nAChR-脂質-コール酸塩溶液を、50 mgの乾燥スーパーデックス200ビーズと混合する。懸濁液を、緩衝液Aに対して、4 にて24時間透析する。固定化されなかったリポソームを2,000 × g にて緩衝液Aでの遠心洗浄によって除去する。

【0186】

nAChR-IAM粒子およびnAChR-スーパーデックス200ビーズの懸濁液に対する([³H]-エピバチジン([³H]-EB)結合をアッセイ: 30 mg乾燥物質に相当する、cAChR-IAM粒子、IAM粒子、nAChR-スーパーデックス200ゲルビーズおよびスーパーデックス200ゲルビーズをそれぞれ、緩衝液A 1.25 mlに懸濁する。それぞれの懸濁液250 g lの分液を、250 g lの[³H]-EB [1.5 nM]と共に、最終容量2.5 mlで、24、4時間インキュベートする。

40

【0187】

実験を、100 μlの300 μM (-) - ニコチンあり、およびなしで実施する。結合または遊離リガンドを、0.5%ポリエチレンイミンで処理したウィットマン (Whitman) GF/Cフィルターを介して吸引濾過し、分離する。フィルターに残った放射活

50

性を、溶液シンチレーション計数管にて測定する。特異的結合を、総結合および非特異的結合間の差として定義する。タンパク質の量を、BCA薬剤（ピアス（Pierce, Rockford, IL, USA））を用いて、570nmにて測定して、決定する。

【0188】

nAChR-LAMカラムまたはnAChR-リポソーム-スーパーデックス200カラムに基づくクロマトグラフィー：nAChR-IAM粒子またはnAChR-スーパーデックスゲルビーズを、HR5/2ガラスカラムに詰め、HPLCポンプに連結する。[³H]-EBを、マーカーとして使用し、オンライン流動シンチレーション検出器（525TR）で溶出プロファイルをモニタリングする。すべてのクロマトグラフィー実験は、室温にて0.4ml/分の流速で実施する。

10

【0189】

ゾーナルクロマトグラフィー実験において、100μlループを使用して試料をアプライする。クロマトグラフィーデータを、0.5分間隔で合計し、マイクロソフト エクセル（Microsoft Excel）プログラムを用いて、5点移動平均にてなめらかにする。

【0190】

フロントルクロマトグラムにおいて、50mlの試料スーパーラープを用いて、nAChRカラムを介して[³H]-EB濃度シリーズをアプライし、前部およびプラトー領域を示している溶出プロファイルを得る。クロマトグラムデータを、1分間隔で合計し、10点移動平均にて、マイクロソフト エクセルプログラムを用いてなめらかにする。

20

【0191】

結果：nAChRサブユニットまたはサブタイプの固定化 トランスフェクトした細胞の膜から単離した約63mgのタンパク質、および脳組織から調製した14mgのタンパク質を、それぞれ、IAM粒子またはスーパーデックス200ゲルビーズ、1グラムあたりに固定化する。[³H]-EBを用いる受容体結合アッセイにより、nAChR結合活性が、以下の表中で示したような固定化手順の後に保持されることを示している。併行実験において、[³H]-EBの非特異的結合を、IAM粒子およびスーパーデックス200ゲルビーズ上で検出する。

【表2】

試料	特異的結合 (%)	nAChR 密度 (nmol/g タンパク質)
α4/β2 nAChR-界面活性剤溶液	62	0.14
α4/β2 nAChR-IAM ¹	49	0.81
α3/β4 nAChR-界面活性剤溶液 ²	100	8.57
α3/β4 nAChR-IAM2	97.8	5.09
α3/β4 nAChR-リポソーム スーパーデックス200 ²	29.4	1.45

30

¹界面活性剤デオキシコール酸にてラット前脳より調製

40

²界面活性剤コール酸にてトランスフェクト細胞より調製

【0192】

3/4 nAChR-IAM静止相でのフロントルクロマトグラフィー：[³H]-EBの保持容量は、60pMの濃度にて23mlである。この遅延は主に、[³H]-EBの濃度が450pMまで上昇するとき（図X、プロファイルB）、8mlまで保持容量が減少したことによって示されるように、受容体の飽和可能部位への特異的結合のためである。[³H]-EBの3/4 nAChR-IAM静止相の結合は、移動相中で公知の3/4 nAChRリガンドを用いた競合置換実験にて減少可能である。た

50

例えば、60 pM [³H]-EBの保持容量は、60 nM濃度のnAChR-リガンド(-)-ニコチンを移動相に加えた時に、23 mlから18 mlまで減少し、(-)-ニコチン濃度が1000 nMまで増加したときに、0.9 mlまで減少する。ディスプレイサーの移動相濃度に対する、[³H]-EBの保持容量の減少は、受容体に対するディスプレイサーの結合親和性を反映する。本技術を用いて、ニコチン薬物の、3/4 nAChRの相対親和性を、規定のレベルまでの[³H]-EBの保持容量を減少するのに必要な濃度を測定することにより簡単に分類する。

【0193】

3/4 nAChRカラム(0.5×1.25 cm)上において60 pM [³H]-EBの保持容量を9.5 mlから6 mlに減少させるために、それぞれ0.12 nMの(±)-EB、1.7 nMのA85380、45 nMの(-)-ニコチン、1,200 nMのカルバコール、または21,000 nMのアトロピンの濃度の移動相を必要とする。本方法によって決定された、これらの薬物のa3/(34 nAChRに対する相対親和性は、したがって、(±)-EB > A85380 > (-)-ニコチン > カルバコール > アトロピンであり、このことは膜ホモジネートを用いたリガンド結合アッセイの結果と一致している。相対親和性は、以下の表中の得られたデータより計算された関連定数によって分類可能である。

【表3】

リガンド	K _d ¹ (nM)	K _d ² (nM)
(±)-エピバフィン	0.27±0.05	0.38±0.07
A85380	17.2±0.5	73.6±6.3
(-)-ニコチン	88±33	475±52
カルバコール	1,280±t30	3,839±276
アトロピン	14,570±2600	—

¹ a3/(34-IAM静止相でのフロントalkロマトグラフィー(0.5×1.3 cm)

² 細胞膜ホモジネートを用いた結合アッセイ

【0194】

これらの解離定数(K_d)値は、膜ホモジネートを用いた結合アッセイにて測定された値と同一のランクオーダーを示している。アトロピンの低親和性(K_d:17,200 nM)もまた文献値と一致する。

【0195】

固定化nAChRサブタイプの異なる特異的結合活性の決定に関するゾーナルクロマトグラフィー:[³H]-EBの結合をまた、3サブユニットのみ、4サブユニットのみ、2つの細胞型の混合物、または3/4 nAChRを含むカラム上で、ゾーナル形式にて測定する。3 nAChR-IAM(ピーク1、図23a)、4 nAChR-IAM(ピーク2、図23A)、および3/4 nAChR-IAM(ピーク3、図23A)上での[³H]-EB保持は低く、ディスプレイサー、(-)-ニコチンが移動相に含まれる時には保持容量の有意な変化は認められず、[³H]-EBは固定化3/4 nAChR-IAMを含むIAMカラム上で保持される(ピーク4、図23A)。保持容量は、[³H]-EBの濃度が上昇したとき、または(-)-ニコチンが移動相(ピーク4図23Bの破線)に含まれる時に、減少する。

【0196】

固定化nAChRサブタイプの特異的結合活性。

固定化受容体に対する結合の結果は、[³H]-EBおよび(-)-ニコチンが、nAChR 4/2サブタイプにおいて、3/4サブタイプよりも高い結合親和性を持

【0200】

上清（受容体 - コール酸懸濁液）を、200 mg の乾燥 IAM - PC パッキング物質と混合し、1 時間、25 にて穏やかに攪拌し、透析チューブ内に移し、TRIS - HCl 緩衝液 [50 mM、pH 7.4] 中の 5 mM EDTA、100 mM NaCl、0.1 mM CaCl_2 および 0.1 mM PMSF を含む、3 x 600 ml の透析緩衝液に対して、4 にて 48 時間透析する。

【0201】

受容体 - IAM - PC を、2,000 rpm にて、4 で、3 分間遠心する。上清を捨てる。ペレットを TRIS - HCl 緩衝液 [50 mM、pH 7.4] にて洗浄し、上清が透明になるまで遠心する。得られたペレットを使用してカラムに充填する。

10

【0202】

フロンタルクロマトグラフィーを用いた、固定化 GABA A 受容体 (GR) に対する結合親和力の測定： GR - IAM 粒子を、HR5 / 2 ガラスカラムに充填し、HPLC ポンプに連結する。GABA A 受容体リガンドである、[^3H] - フルニトラゼパム ([^3H] - FTZ) をマーカーとして使用し、オンラインフローシンチレーション検出器 (525 TR) にて溶出プロファイルをモニタリングする。すべてのクロマトグラフィー実験は、室温にて、0.4 ml / 分の流速で実施する。フロンタルクロマトグラフィーにおいて、50 ml の試料のスーパーブを使用して、GR カラムを通して、[^3H] - FTZ 濃度シリーズにアプライし、前方およびプラトー領域を示している溶出プロファイルを得る。クロマトグラフィーデータを 1 分間隔で合計し、マイクロソフトエクセルを用いて、10 点移動平均でなめらかにする。

20

【0203】

GABA A 受容体リガンドジアゼパム (DAZ) を移動相に加えた場合、[^3H] - FTZ の保持容量が、移動相中の DAZ の濃度に比例して減少する。これらの結果は、GR - IAM 上での FTZ の保持が、固定化 GABA A 受容体との特異的相互作用によるものであることを示している。FTZ および DAZ の解離定数 (K_d) を GR - IAM 上で測定する。フロンタルクロマトグラフィーによって得られた FTZ および DAZ の計算された K_d は、以下の表で示すように、古典的な結合アッセイによって測定されたものと一致する。

リガンド	フロンタルクロマトグラフィー	結合アッセイ
フルニトラゼパム	1.3	1.7
ジアゼパム	1.0	1.3

30

【0204】

ER - LBD の産出および精製 エストロゲン受容体 (ER) は、細胞核受容体スーパーファミリーの一部である。これらは 5 つの異なる領域、A、B、C、D、および E からなる。リガンド結合ドメイン (LBD) として知られている E 領域は、アゴニストおよびアンタゴニストが結合する場所である。ER - LBD は、タンパク質 A と LBD との間の融合産物を介して、酵母または微生物にて発現される。組換えエストロゲン受容体タンパク質の産出を記述する。ヒトエストロゲン受容体タンパク質のリガンド結合領域をコードしている DNA 配列 (アミノ酸 302 ~ 595) を、テンプレートとして全長 cDNA を用いて PCR によって得る。PCR 反応の産物をタンパク質の N - 末端上の 6 ヒスタジンタグとインフレームで、pRS30プラスミド内にサブクローン化する。His タグが、微生物タンパク質からのタンパク質の精製のために使用される。プラスミドを BL21 コドン + 微生物内に形質導入する。微生物を、標準の LB 培地内で、 $X = 600$ の光学密度が ~ 1.5 になるまで増殖させる。

40

【0205】

微生物を遠心により採取し、さらなる精製まで - 80 にて冷凍する。微生物ペレットを、音波処理によって尿素 / HEPES 溶解緩衝液で溶解し、遠心および濾過により精製する。溶解物を、尿素 / HEPES 溶解緩衝液にて先に平衡化した、5 ml の Ni - NTA ニッケル親和カラム上にのせる。Ni - NTA カラムは 6 - His タグにて、タンパク質

50

に選択的に結合する。タグ化していないタンパク質を、尿素/HEPES緩衝液にてカラムより洗浄して切除する。エストロゲンレセプターを、緩衝液をPBS(リン酸緩衝化食塩水)緩衝液に徐々に変更することで、カラム上でリホールドさせる。最後に、エストロゲン受容体タンパク質を、Ni-NTAカラムに結合することに関して、Hisタグと競合する、イミダゾールを含むPBS緩衝液にて溶出する。エストロゲン受容体タンパク質を含む画分を、ゲル電気泳動およびゲルコードブルー(Gelcode Blue)での染色によって、およびヒトエストロゲン受容体に対する抗体を用いたウエスタンブロット解析によって、測定する。精製されたタンパク質の濃度を、ビシンコニニック酸(BAC)タンパク質アッセイを介して測定する。

【0206】

ER-LBDの結合活性 融合タンパク質の活性を測定するために、結合アッセイを実施する。デキストランコートチャコールを用いた、古典的方法をまず使用し、タンパク質の活性を与える。しかしながら、本方法を、融合タンパク質を単離するために、ニッケル-NTAアガロースビーズを用いて改良する。およそ200pモルのタンパク質をチューブ毎に入れる。総結合に関して、種々の濃度の $[^3\text{H}]$ -エストラジオールを加え、非特異的結合に関しては、放射標識エストラジオールの添加の前に、200倍過剰の冷エストラジオールを加える。溶液を室温にて2時間インキュベートする。インキュベートの後、ニッケル-NTAを加える。1回洗浄したのち、タンパク質をイミダゾールで置換する。 K_d はおよそ3.4nM(数回の実験の平均 K_d)であると測定する。エストラジオールは、天然のER(0.2nM)に対して、わずかに強い親和性を持ち、これで十分である。

【0207】

ER-LBDの固定化 単離した融合タンパク質の初期固定化を、シリカを基にした固定化人工膜、IAM-PCを用いて実施する。本膜は、シリカコアを含み、これは極性頭基で、疎水性スパーサーに連結する。これらの膜上へのタンパク質の固定化に関する手順は、本技術分野で公知である。種々の濃度のIAMを使用し、固定化に関する最適条件を決定する。25mgのIAMが35%取り込みで、最適であることが決定される。

【0208】

しかしながら、活性の試験において、 $[^3\text{H}]$ -エストラジオールは、タンパク質に結合するのみではなく、膜の疎水性層にも結合することが明らかになっている。溶液中のエタノール濃度を増加させることでは、膜への結合を有意に減少させることはできない。より親水性である改変IAM静止相、IAM-MGを用いることでのみ、非特異的結合を減少させることができる。

【0209】

ついで、ER-LBDを、シリカ骨格および疎水性スパーサーを含む新規カラムフォーマットにて固定化する(C10)。ER-LBDを固定化し、その結合活性を維持し、一方で $[^3\text{H}]$ -エストラジオールの非特異的結合は、カラムの効果な使用のため未だに高い。C10スパーサーを、親和性スパーサーに置換し、 $[^3\text{H}]$ -エストラジオールの非特異的結合を切除し、ER-LBD-SPカラムを合成する。

【0210】

次いで、エストラジオールマーカリガンドの K_d を、ER-LBD-SPカラムを用いて、オンラインで測定する。ER-LBD-SPカラムを、オンラインフローシンチレーションモニタリング(kadiometric FLOW-ONE Beta 500 TR 器具、パカードインストルメント社(Packard Instrument Co., Meridien, CT)に連結し、室温にて97.5分間、0.2mL/分の流速で行う。システムのセットアップは、Zhang, et al., 「薬物-受容体親和性のオンライン溶液クロマトグラフィー測定のための固定化ニコチン性受容体静止相(Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase For On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug-Receptor Affinities)」、Anal. Biochem. 264, 22(1998)にて記述されたよう

10

20

30

40

50

なものである。冷エストラジオール (0 ~ 7 nM) の濃度範囲を含む、0.5 nM [³H] - エストラジオール ([³H] - E2) の18 mL 試料を、フロントアルクロマトグラフィーにかける。溶出容量データを使用して、リガンドの解離定数を計算する。エストラジオールの K_d 値を、一部位結合式： $Y = B_{max} [E2]_{total} / (K_d + [E2]_{total})$ を用いて、プリズム (Prism) (グラフパッドソフトウェア (GraphPad Software)) での非線形回帰によって計算する。エストラジオールの K_d 値を、先に (0.189 ± 0.06) nM であると記述されたように計算する。放射活性シグナルを、オンラインフローシンチレーション検出器によって6秒間ごとに記録する。

【0211】

10

ER - LBD の調製： 組換え ER - LBD を上述したようにして得て、精製する。

【0212】

ER - LBD の固定化： 次いで ER - LBD をマイクロマシンキャピラリー内に固定化する。固定化は、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いた、シリカチップ上のシラノール基の活性化、ついで活性化した表面への、遊離カルボキシル基での C2 スペースのカップリングによって行う。ついで ER - LBD を、シリカゲルビーズからなる溶液クロマトグラフィー静止相での先行試験において開発した手順を用いて、誘導した表面に結合させる。微小チャンネルの表面上に固定化されたタンパク質の量を、微小チャンネルへの曝露前および後に結合溶液のタンパク質含量の分析によって測定する。

【0213】

20

ER - LBD の固定化に対する初期実験アプローチが首尾よくいかない場合、以下の手順を調査する。1) シリカ表面でのシラノール基の活性化の間に問題がある場合、DCC を、ジメチルアミノピリジン (DMAP) に置換する、2) 問題が C2 スペースより発生する場合、C3 ~ C4 スペースを試験する、3) 問題が、新規表面への固定化にて存在する場合、エポキシド活性化アプローチを、J. B. Wheatley et al., 「エポキシド活性化支持体上へのアフィニティリガンドの塩誘導固定化 (Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports.)」、J. Chromatogr. A, 849, 1 (1999)、D. Zhou, et al., 「バイオポリマーの分析および精製に関する膜アフィニティクロマトグラフィー (Membrane affinity chromatography for analysis and purification of biopolymers)」、Chromatographia, 50, 27 (1999) にて記述されたような方法、または L. A. Paige, et al., 「エストロゲン受容体 (ER) モジュレーターは、それぞれ、ER および ER における異なる立体配座変化を誘導する (Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER and ER)」、Proc. Nat. Acad. Sci., 96, 3999 (1999) にて記述されたようなストレプトアビジン - ビオチン化を用いるアプローチによって調査する。

30

【0214】

40

固定化 ER - LBD の結合活性： 固定化 ER - LBD の結合活性を、[³H] - エストラジオール (リン酸緩衝液 [0.1 M、pH 7.4] 中で 0.005 nM) (リン酸緩衝液 [0.1 M、pH 7.4] 中で 0.001 ~ 0.0050 nM の範囲を産出する濃度範囲の冷エストラジオールを含む、[³H] - E2) を用いて測定する。[³H] E2 を含む溶液を、固定化 ER - LBD、固定化支持体 (ER - LBD なし、陽性対照) および露出マイクロチャンネル (陰性対照) を含むマイクロチャンネルにアプライする。マイクロチャンネルを含む溶液を、室温にて30分間インキュベートする。次いでこのチャンネルを、リン酸緩衝液 [0.1 M、pH 7.4] にて3回洗浄し、洗浄液を採取し、シンチレーション検出器を用いて [³H] - E2 含量に関してアッセイする。E2 の K_d 値を、一部位結合式： $Y = B_{max} [E2]_{total} / (K_d + [E2]_{total})$ を用いて、Pri

50

s m (グラフパッドソフトウェア) にて、非線形回帰によって計算する。観察された結合親和性および結合の含量を、非固定 ER - LBD の当量濃度を用いて実施した併行結合試験からのデータと比較する。これらの試験により、固定化受容体を特性化するのに使用する、結合親和性 / mg 固定化 ER - LBD 指数 (BAI) が産出される可能性がある。

【 0 2 1 5 】

固定化の最適化および再現性： ER LBD の固定化を、ER - LBD 濃度、反応時間、温度および固定化で使用した化学物質の効果を調査することで最適化する。変数のそれぞれを、段階的最適化アプローチにて独立して調べる。それぞれの反復結果を、BAI を用いて評価する。一旦最適固定化手順が決定されたならば、本手順の日内および日間再現性を測定する。10% 以下のバラツキが許容可能であると判断される。もし初めに決定された「最適」条件下でこのバラツキが満たされない場合、他の規定の状態を、変数を選択する時に BIA を用いて調べる。

10

【 0 2 1 6 】

固定化 ER - LBD チップの定量および検出の限界の決定： エストラジオールリガンドを、フルオレセイン - 5 - マレイミドにて誘導化し、臨床パッチにて使用するフルオレセント - リガンド { E 2 - FM } を産出する。このフルオレセント - タグが十分な感度を産出しない場合、他の薬剤を使用する。固定化 ER - LBD チップを懸濁させ、次いで E 2 を含む溶液との表面接触に使用する。E 2 溶液の濃度を、初期濃度 0 . 0 5 0 n M から、E 2 - FM の置換が観察されなくなるまで段階希釈する。 $e x = 4 8 8 n m$ および $e m = 5 2 0 n m$ にて測定された光学密度を、試験溶液の E 2 濃度に対してプロットして、標準曲線を構築する。標準日内および日間バリデーション試験を行い、測定の再現性、定量の下限および検出の下限を確立する。一旦これが確立されたならば、本チップは臨床試験に対して準備ができる。

20

【 0 2 1 7 】

AR - LBD の調製： アンドロゲン受容体リガンド結合ドメイン { AR - LBD } 融合タンパク質を、公知の手順にしたがって産出し、精製する。一旦タンパク質が発現し、精製したならば AR - LBD の結合親和性を、ER - LBD に関して記述した手順にしたがって従来の方法によって測定する。

【 0 2 1 8 】

固定化 AR - LBD チップの調製およびその活性のバリデーション： AR - LBD の固定化、固定化 ER LBD の結合活性の測定、定量限界および検出限界の決定および初期の臨床的バリデーションを ER - LBD で得られた結果に基づいて行う。

30

【 0 2 1 9 】

タンパク質を ER - LBD と同様の方法で固定化し、 K_d 値をフロンタルクロマトグラフィーにより測定する。カラムの安定性の測定も行う。

【 0 2 2 0 】

これらのレセプターの固定化により、エストロゲンおよび / またはアンドロゲンレセプター上における、生物学的に活性 / 非活性な化合物の存在を速やかにスクリーニングし、決定することが可能になる。

【 0 2 2 1 】

組換え ER - LBD を上記のように得て、精製する。

40

【 0 2 2 2 】

ER - LBD の固定化： ER - LBD について上記した手順にしたがって AR - LBD を固定化する。

【 0 2 2 3 】

本明細書に記載の臨床試験により、バリデート済みの血漿アッセイと比較した、経皮的なサンプリングによるエストロゲンおよびテストステロンの測定法の分析精度および確度を測定する。許容可能な検出限界および定量限界、ならびに許容可能なバラツキの日内および日間係数を持つ、エストロゲンおよびテストステロンのバリデート済みの血漿 ELISA アッセイを、以下に詳述した 4 つの試験において述べた臨床状況におけるアッセイと比

50

較するために用いた。

【0224】

臨床試験1：閉経前および閉経後の女性における、血漿中および間質液中エストロゲン濃度相関のパイロット試験

エストロゲン測定のための経皮サンプリングの分析感度をバリデートするために、エストロゲン含有する薬剤を服用していない月経のある健常女性8人および閉経後の健常女性8人について、血漿中または間質液中エストロゲン濃度を2ヶ月間測定する。血漿中エストロゲン濃度を、臨床現場でルーチンに用いられているバリデート済みの臨床ELISAアッセイにより測定する。これらの濃度をHWモニタリング装置を用いてエストロゲンレセプターベースのアッセイにより測定した間質液中濃度と比較する。血漿中および間質液中濃度を、月経のある女性については月経の終わりから10日後までの期間、閉経後女性については任意の10日以上期間、毎日測定する。

10

【0225】

2つの群の女性を採用する：閉経前で、月経歴からみて月経周期が正常である女性8人からなる群、および閉経期を過ぎた女性8人からなる群。

【0226】

組入れ基準 群1：21歳以上40歳未満の女性。群2：55歳以上75歳未満の女性。全ての女性が以下の要件を満たすこととする。(1)エストロゲン様作用を引き起こすような処方薬剤または天然製品(例えばチョウセンニンジン、black kohosh)を服用していないこと、(2)完全血球計測、血清化学検査(Na、K、Cl、HCO₃、BUN、グルコース、およびクレアチニン)に関して臨床的に正常な検査値を持つこと、および臨床的に正常な肝臓酵素プロファイル、SGOT、SGPT、アルカリホスファターゼおよびビリルビンを示すこと、(3)本プロトコールに記載のインフォームドコンセントを理解し、署名する能力があること。

20

【0227】

除外基準 以下の者は本試験から除外する。(1)喫煙者、(2)血清SGOT、SGPTまたはビリルビンが正常な臨床検査値範囲を超えること、または血清クレアチニンが1.5mg/dLを超えることで示される肝機能障害または腎機能障害をもつ者、(3)尿薬物スクリーニング検査で陽性を示す者、(4)ヒト免疫不全ウイルスまたは肝炎に対し陽性である被験者、(5)試験開始30日以内に治験薬を摂取した被験者、(6)投薬前30日以内に、メディケーションを誘発または阻害するような任意の酵素(例、ラファンピン、フェニトイン)を摂取している被験者、および(7)治験責任医師の意見において、プロトコールの要件に不遵守の被験者。

30

【0228】

制限としては、被験者に以下のことを禁止する(1)投与前2週間、任意の処方薬剤を服用すること、(2)少なくとも試験第1日目の48時間前から最終の採血後まで、カフェインおよび/またはキサンチン含有製剤およびアルコールを摂取すること、(3)喫煙、(4)測定装置のズレを防ぐために、試験実施中の激しい運動。

【0229】

被験者が一旦試験に参加することに同意すれば、以下の手順を実施する。スクリーニング手順は試験開始から21日以内に実施し、それには病歴の聴取および身体検査、組入れ基準および除外基準の確認、血液および尿試料採取、血液検査、血清化学検査、肝臓酵素、HIVおよびB型肝炎およびC型肝炎に関する血液分析、および薬物濫用スクリーニングのための尿試料分析が含まれる。

40

【0230】

本試験への組入れに続いて、被験者に以下の処置を行う。被験者は朝約9時に試験実施機関に集合する。閉経後の女性に関しては正確な日付は重要でないが、月経がある女性に関しては各自の規則的周期の最終日についての報告を求める。この時点ではエストロゲン値は低く、分析の検出限界をおおまかに検査できる。バイタルサイン(心拍数、呼吸数、血圧および体温)を記録する。携帯式の生物医学モニタリング装置を前腕に取り付け、テ

50

ブでしっかりと接着する。モニタの下側の、目立たない小さな針で皮膚に50ミクロンのカテーテルを挿入し、そこから記録する。記録している間モニタを確認する。バイタルサイン（心拍数、呼吸数、血圧および体温）を記録する。

【0231】

エストロゲン測定のために、被験者が仰臥位にて、静脈血の一試料（5ccまたはティースプーン1杯）を前腕から採血する。最適時間を試験するために、0.25、0.5、1、1.5、2、3、6、および8時間でエストロゲンを測定するように装置を設定する。最初の採取から4時間後、および8時間後に、さらに血液試料を採取する。テープと装置を外す。そこで患者は退院し、次の日の朝9時に再集合するまで家に帰ってよい。この手順を続く9日間繰り返し、被験者それぞれに対し計10日行う。

10

【0232】

血液サンプリング日程 1日目～10日目に、上記の方法でEDTAを含むバキューテナー中に5mLの静脈血を採取する。スクリーニングおよびエグジット試料を含む本試験過程に採取した血液の総量は、35（30は試験のための採血、5は血液検査、清化学検査、肝臓酵素、HIVおよび肝炎それぞれのスクリーニングのための採血）であり、採血の総量は200mL以下である。

【0233】

バイタルサイン（心拍数、呼吸数、血圧および体温）は、装置の装着前後、および1日目～10日目の採血の前後に測定する。

【0234】

患者には、装置を装着している腕に顕著な刺激があるときは報告することを奨励する。担当医は、本試験に参加している被験者の、複数回の採血による皮膚の挫傷または感染に懸念に絶えず応じられるようにする。

20

【0235】

血漿ELISAを用いて測定したエストロゲン濃度を、携帯式生物医学的モニタを用いて得られた値と比較する。有意性 $p < 0.05$ で相関係数が > 0.8 であれば、測定値を有効とする。

【0236】

男性の血漿中および間質液中テストステロン濃度相関のパイロット試験

21歳～70歳の、薬剤を何も摂取していない健康男性10人について、バリデート済みの血漿アッセイと携帯式生物医学的モニタリング装置を用いた経皮的サンプリングの両方の方法で、5日間続けて血漿中および間質液中テストステロン濃度を測定する。

30

【0237】

組入基準 21歳以上75歳未満の男性。全ての男性は以下の要件に従っていなければならない。（1）テストステロン様作用を引き起こす任意の処方薬剤または天然製剤（例えば、アンドロステジオンまたはDHEA）を服用していないこと、（2）完全血球計測、血清化学検査（Na、K、Cl、 HCO_3 、BUN、グルコース、およびクレアチニン）に関して臨床的に正常な検査値を持つこと、および臨床的に正常な肝臓酵素プロファイル、SGOT、SGPT、アルカリホスファターゼおよびビリルビンを示すこと、および（3）本プロトコールに記載のインフォームドコンセントを理解し、署名する能力があること。

40

【0238】

除外基準 以下の者は本試験から除外する。（1）喫煙者、（2）血清SGOT、SGPTまたはビリルビンが正常な臨床検査値範囲を超えること、または血清クレアチニンが 1.5 mg/dL を超えることで示される肝機能障害または腎機能障害をもつ者、（3）尿薬物スクリーニング検査で陽性を示す者、（4）ヒト免疫不全ウイルスまたは肝炎に対し陽性である被験者。

【0239】

制限として、被験者に以下のことを禁止する。（1）喫煙、および（2）測定装置のズレを防ぐために、試験期間中の激しい運動。

50

【0240】

被験者が一旦試験に参加することに同意すれば、以下の手順を実施する。スクリーニング手順は試験開始から21日以内に実施し、それには病歴の聴取および身体検査、組入れ基準および除外基準の確認、血液および尿試料採取、血液検査、血清化学検査、肝臓酵素、HIVおよびB型肝炎およびC型肝炎に関する血液分析、および薬物濫用スクリーニングのための尿試料分析が含まれる。

【0241】

本試験への組入れに続いて、被験者に以下の処置を行う。被験者は朝約9時に試験実施機関に集合する。バイタルサイン（心拍数、呼吸数、血圧および体温）を記録する。携帯式生物医学モニタリング装置を前腕に取り付け、テープでしっかりと接着する。モニタの下側の、目立たない小さな針で皮膚に50ミクロンのカテーテルを挿入し、そこから記録する。記録している間モニタを確認する。バイタルサイン（心拍数、呼吸数、血圧および体温）を記録する。

10

【0242】

テストステロン測定のために、被験者が仰臥位にて、静脈血の一試料（5ccまたはティースプーン1杯）を前腕から採血する。最適時間を試験するために、0.25、0.5、1、1.5、2、3、6、および8時間でエストロゲンを測定するように装置を設定する。最初の採血から4時間後および8時間後に、さらに採血する。テープと装置を外す。そこで患者は退院し、次の日の朝9時に再集合するまで家に帰ってよい。この手順を続く4日間繰り返し、被験者それぞれに対し計5日行う。

20

【0243】

1日目～5日目に、上記の方法でEDTAを含むバキューテナー中に5mLの静脈血を採取する。スクリーニングおよびエグジット試料を含む本試験過程に採取した血液の総数は、20（15は試験のための採取、5は血液検査、清化学検査、肝臓酵素、HIVおよび肝炎それぞれのスクリーニングのための採血）であり、採血の総量は200mL以下である。

【0244】

バイタルサイン（心拍数、呼吸数、血圧および体温）は、装置の装着前後、および1日目～5日目の採血前後に測定する。

【0245】

患者には、装置を装着している腕に顕著な刺激があるときは報告することを奨励する。医師は、本試験に参加している被験者の、複数回の採血による皮膚の挫傷または感染に關した懸念に絶えず応じられるようにする。

30

【0246】

血漿ELISAを用いて測定したテストステロン濃度を、携帯式生物医学的モニターを用いて得られた値と比較する。有意差 $p < 0.05$ で相関係数が > 0.8 であれば、測定値を有効とする。

【0247】

第3臨床試験の目的は、健常ボランティアの閉経後女性に対して適切な濃度のエストロゲンを投与し、その結果としての濃度を測定することである。エストロゲンは、以上で定義したようなモニタの最適なマシン設定を用いたベースライン値測定のために3日作動させた後、3日間にわたってマイクログラムパルスで投与する。

40

【0248】

第4臨床試験の目的は、55歳～75歳の、健常ボランティアの男性に適切な濃度のテストステロンを投与し、その結果としての濃度を測定することである。テストステロンは、投与前に男性のベースライン時テストステロン濃度を測定するのに3日作動させた後、5日間にわたりマイクログラムパルスで投与する。得られる濃度は以上で定義した分析規格を用いて測定する。

【0249】

上記で引用した患者、公表論文、および参考文献は、本明細書でそのそれぞれの全体が、

50

参考文献にて組み込まれている。

【0250】

本明細書の教義を考慮して他の実施様態をすぐに企図してよいことは、当業者にとって明白であろう。そのような他の実施様態は、特別に記載しなくとも、本発明の範囲および精神内に含まれる。このように、本発明は上記の特別な実施様態に限定されると解釈されるべきではなく、単に以下の請求項により定義される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のマイクロシステムの全体的構造の概略図である。

【図2】

図2は、単一レーザーキャピラリーペアの断面図を例示している。

【図3】

図3は、血中アルコールに関する手の甲の比色計検査に対して得られた試験結果を示している。

【図4】

図4は、(a)底から、および(b)断面図の視点でのシール構造を示している。

【図5】

図5は、非侵襲的サンプリング手順を例示している、本発明の器具の断面図である。

【図6】

図6は、バイオ流体統合経皮(Bio-Fluidic Integrable Transdermal: B-FIT)マイクロシステムの連続する操作を例示している断面図である。

【図7】

図7は、断面図で示した、システムの3つの主要なコンポーネントに関する、基本的な加工段階を概要例示している。

【図8】

図8は、蛍光標識タンパク質または代謝物を用いた検出スキームの概要例示である。

【図9】

図9は、他の導波管および試料チャンバーの構造を、横断面より例示している。

【図10】

図10は、B-FITマイクロシステムを例示している。

【図11】

図11は、検出スキームを例示しているC型の断面図を例示している。

【図12】

図12は、ELISAマイクロシステム情報コンポーネントの全体像を例示している。

【図13】

図13は、外部チューブリングをシリコンキャピラリーに連結している、マイクロ流体内部連結を示しているCI型の断面図を例示している。

【図14】

図14は、ウエハー通過孔として加工したシリコンキャピラリーと外部チューブリングを連結させ、外部チューブリングがシリコンキャピラリーと連結している、シリコンスリーブマイクロ流体内部連結を示している、DRIEキャピラリー孔周辺でシリコンスリーブを用いた代替物の断面図を例示している。

【図15】

図15は、キャピラリーの働きによってDRIEキャピラリーウエハー通過孔を通して吸い上げられた、分析物に対する回収チャンバーを組み込んだ第三のベッド構造の断面図を例示している。

【図16】

図16は、回収チャンバーおよび流体内部連結を組み込んでいる、CIC型と呼ばれる、第四のベッドの断面図を例示している。

10

20

30

40

50

【図17】

図17は、(a)シリコンスリーブのフォトレジスト(PR)パターン化、(b)スリーブの酸化パターン化、(c)PRの再適用、(d)穴孔のDRIEのためのパターン、(e)PRおよびDRIEスリーブの切除、および(f)酸化物の切除を示すC I型アレイの一般的加工工程を例示している。

【図18】

図18は、C C型(およびC I C型)器具を加工するために必要な二重側面処理を示す断面図を例示している。

【図19】

図19は、シリコンキャピラリー中の連結スピロピランの拡大図を例示している。

10

【図20】

図20は、単一レーザーキャピラリーペアを例示している。

【図21】

図21は、単一レーザーキャピラリーペアを例示している。

【図22】

図22は、ウエハー#2に関する加工段階を例示している。

【図23】

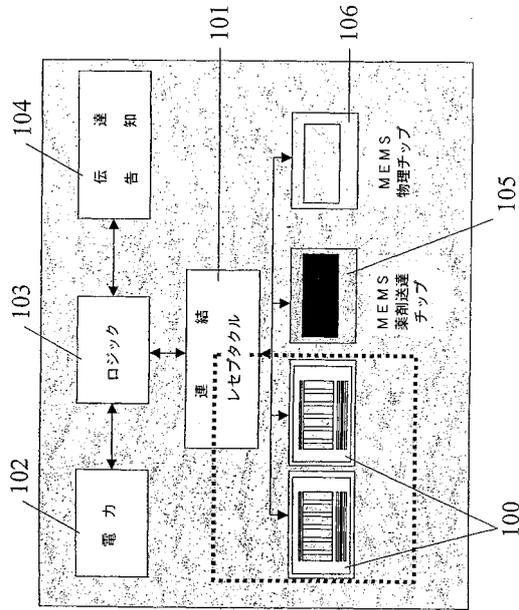
図23は、種々の濃度の[3H]-EBでの、保持容量を例示している。

【図24】

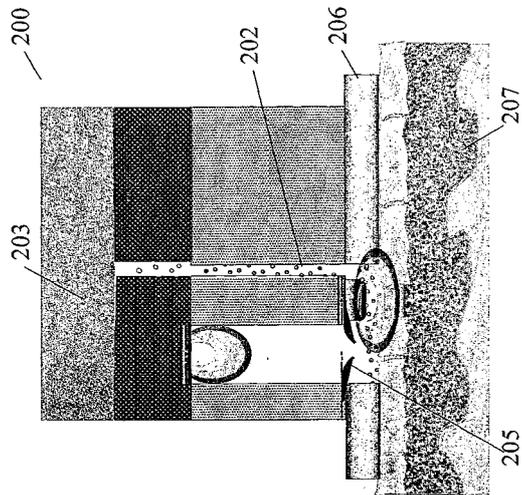
図24は、種々のpHおよびイオン強度での、保持容量を示している。

20

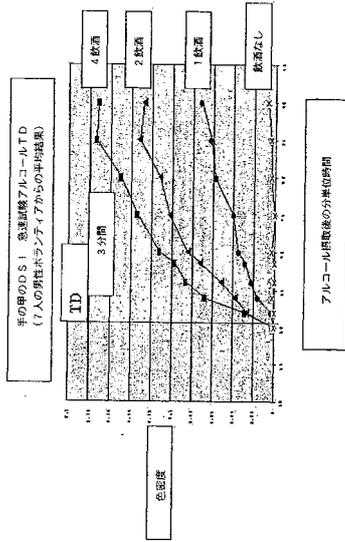
【図1】



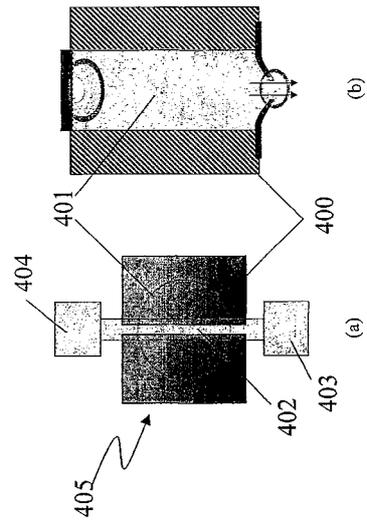
【図2】



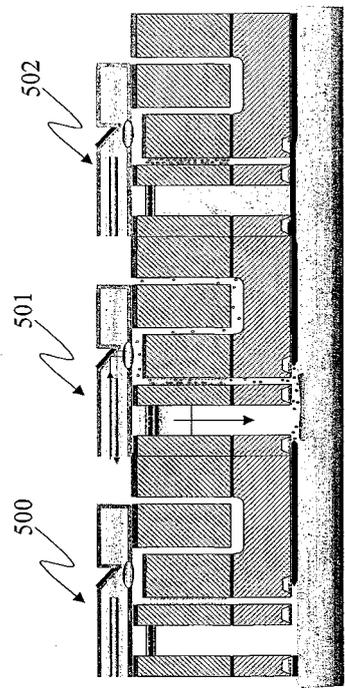
【 図 3 】



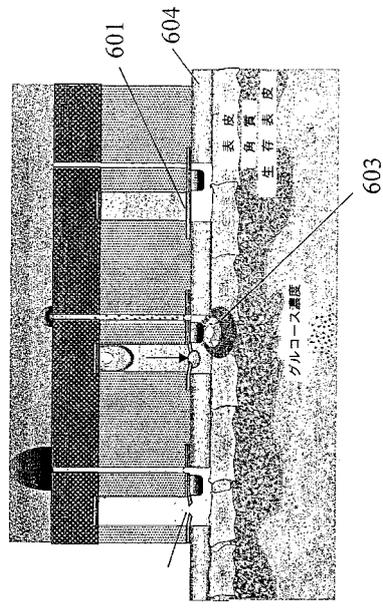
【 図 4 】



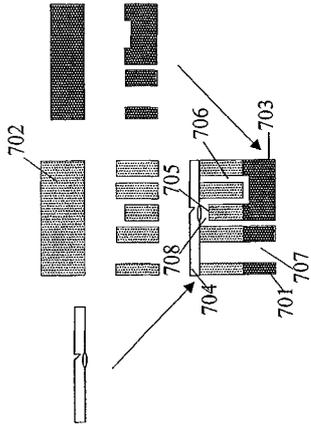
【 図 5 】



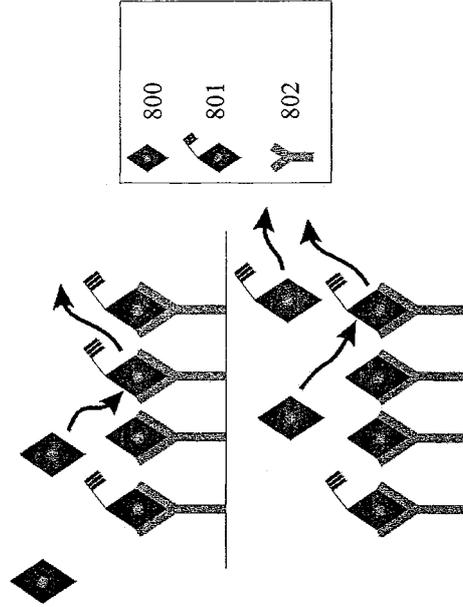
【 図 6 】



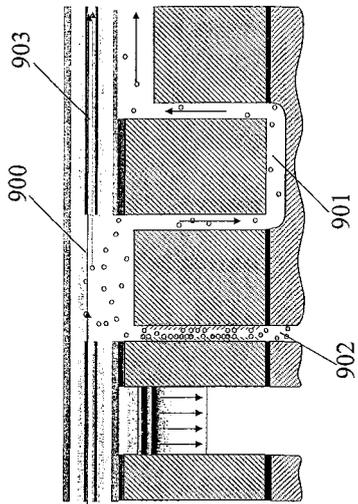
【 図 7 】



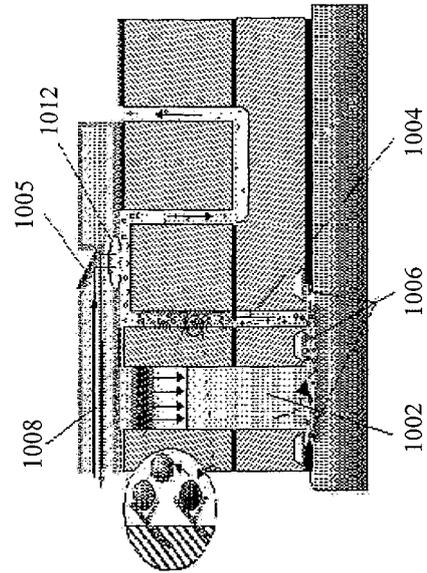
【 図 8 】



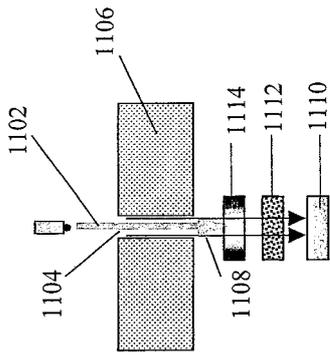
【 図 9 】



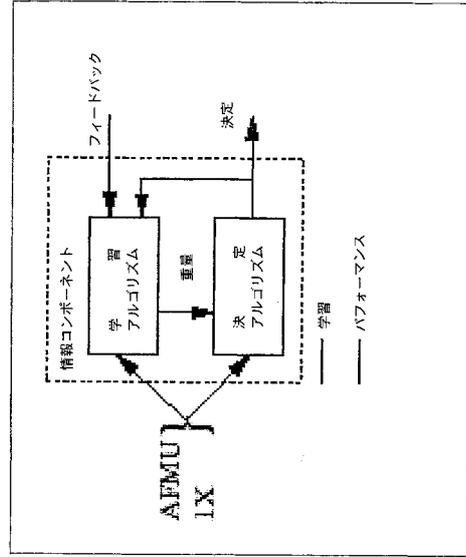
【 図 10 】



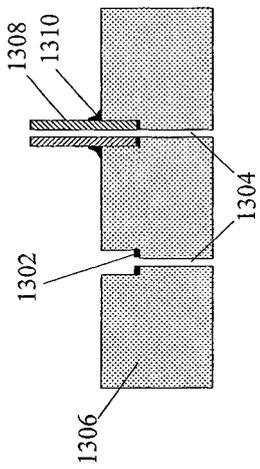
【図 1 1】



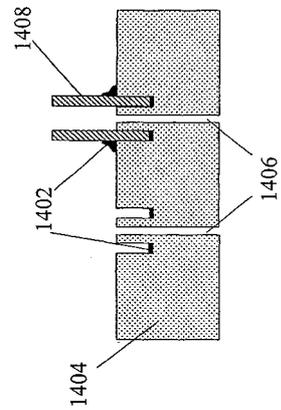
【図 1 2】



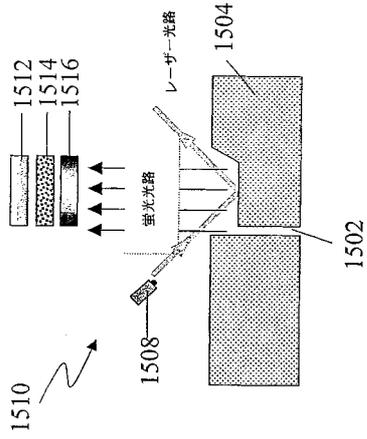
【図 1 3】



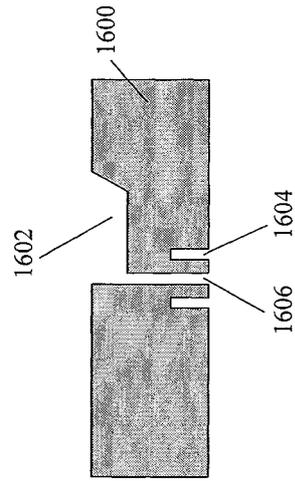
【図 1 4】



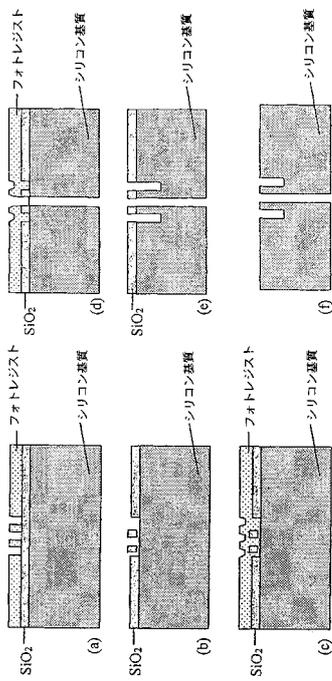
【 図 1 5 】



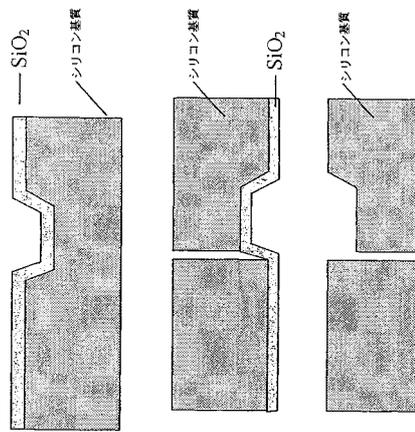
【 図 1 6 】



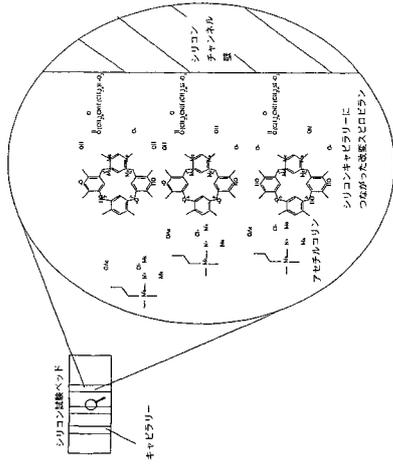
【 図 1 7 】



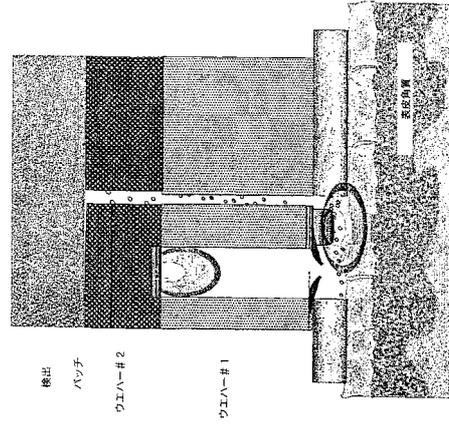
【 図 1 8 】



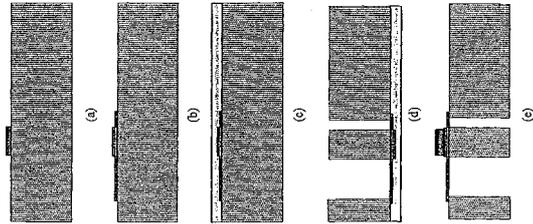
【 図 19 】



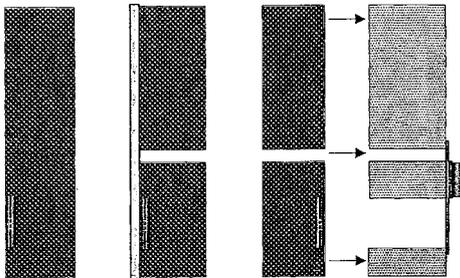
【 図 20 】



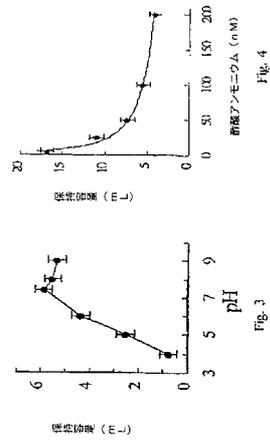
【 図 21 】



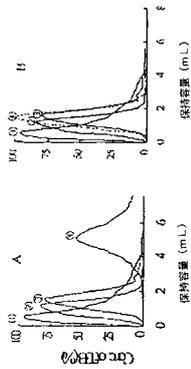
【 図 22 】



【 図 24 】



【 図 23 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2001 (06.12.2001)

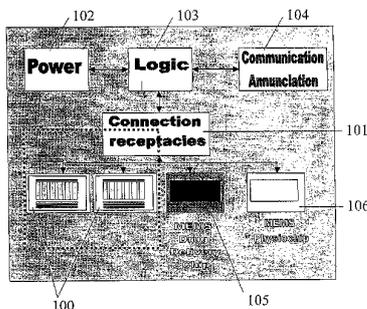
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/91626 A2

- (51) International Patent Classification: **A61B** #503-1530 North Key Boulevard, Arlington, VA 22209 (US). **PECK, Carl, C.**, 6219 Poindexter Lane, Rockville, MD 20852 (US). **WHITE, Robert, C.**, 4715 Pickett Road, Fairfax, VA 22032 (US). **SCHNEIDER, Thomas, W.**, 8136 Crabapple Lane, Gaithersburg, MD 20879 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/17081
- (22) International Filing Date: 30 May 2001 (30.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/208,327 1 June 2000 (01.06.2000) US
- (71) Applicants: **SCIENCE APPLICATIONS INTERNATIONAL CORPORATION** [US/US]; 10260 Campus Point Drive, San Diego, CA 92121 (US). **GEORGETOWN UNIVERSITY** [US/US]; 37th and O Streets, N.W., Washington, DC 20057 (US). **DERMAL SYSTEMS INTERNATIONAL, INC.** [US/US]; 213 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors: **CURRIE, John, F.**; 6523 Fallwind Lane, Bethesda, MD 20817 (US). **PARANJAPE, Makarand**,
- (74) Agent: **GEORGE, T., Marcou**; Kilpatrick Stockton LLP, 607 14th Street, N.W., Suite 900, Washington, DC 20005 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: SYSTEMS AND METHODS FOR MONITORING HEALTH AND DELIVERING DRUGS TRANSDERMALLY



(57) Abstract: The present invention pertains to a system and method for transdermal sampling, comprising: at least one sampler for retrieving and transferring at least one analyte obtained transdermally from the skin of a subject; at least one detector system for identifying and quantifying said at least one analyte; and at least one logic module for: (i) receiving and storing input data from said at least one detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least one detector.



WO 01/91626 A2

WO 01/91626 A2



Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

**SYSTEMS AND METHODS FOR MONITORING HEALTH
AND DELIVERING DRUGS TRANSDERMALLY**5 CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to and incorporates by reference in its entirety
provisional application serial no. 60/208,327, filed June 1, 2000 entitled
"TRANSDERMAL HEALTH MONITORING AND DRUG DELIVERY
10 SYSTEM".

BACKGROUND OF THE INVENTIONField of the Invention:

The present invention relates generally to portable biomedical
15 monitoring. More specifically, this invention relates to non-invasive and
minimally invasive molecular monitoring, and optionally the implementation of
protective feedback measures and remote monitoring through telemetry.

Description of the Related Art

20 Non-invasive transdermal sampling of body fluids has long been a goal
in medical research. The notion that valuable diagnostic information comprising
the concentrations of key analytes within the bloodstream could be obtained
without breaching the skin has spurred many lines of research. With such
technology, long-term convenient health monitoring and screening without
25 needles or outpatient care would become a reality: diabetics could monitor
blood glucose without drawing blood; markers for microbial, fungal or viral
infections could be monitored; and environmental exposure to toxins could be
assessed non-invasively.

1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Biomarkers have been utilized effectively to detect, measure, and assess exposure levels to environmental chemicals deemed hazardous and toxic to human life. The sensitivity of biomarkers allows them to act as early warning indicators to subtle alterations in the environment. Their specificity can be used to establish the nature of the imposing chemical agent, determine exposure level and define a suitable course of action. Environmentally induced diseases affect everyone to one degree or another, however individual susceptibilities can predispose the degree of toxic reaction of one group over another. It is worthwhile noting that in 1996, there were 86,912 cases of pesticide exposures reported to American Association of Poison Centers, of which 26 were fatalities. In particular, individuals in their developmental stages, ranging from the embryonic phase to adolescence, are particularly susceptible to such environmental stresses since key body functions have not matured to a level where they can tolerate, process and handle such exposures. The use of biomarkers for determination of children's environmental health will allow for the early detection of toxins, prevention of impairment in their physical condition, and determine a course of treatment for children who have been exposed to a toxic environment.

Especially important in the field of pediatrics is the use of health evaluation tools that are minimally intrusive.

Many transdermal sampling techniques have been reported, but all to date suffer from one or more serious drawbacks. Conventional techniques have disadvantages of being grossly invasive (and potentially injurious) and sweat or interstitial fluid dependent, except for the passive, non-sweat dependent transdermal analyte collection and detection techniques.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

One approach to transdermal sampling has employed the collection of sweat. For example, M. Philips and M.H. McAloon. Alcohol Clin. Exp. Res. 4 391 (1980) disclose an adsorbent patch which is a salt-impregnated, cellulose pad under an occlusive, adhesive cover. However, such a method of transdermal sampling is dependent upon the sweat rate, requires sweat extraction by centrifugation, and calls for external chemical analysis. S. Balabanova and E. Schneider. Beitr. Gerichtl. Med 48, 45 (1990) disclose Pilocarpine-induced sweat secretion, but the system requires Iontophoresis-induced infusion of pilocarpine and analyte dilution. U.S. Patent No. 5,203,327, issued to Schoendorfer et al., discloses an absorbant pad under a water vapor-permeable, occlusive, adhesive cover, but the system is sweat rate dependent and requires chemical extraction and external chemical analysis. F.P. Smith and D.A. Kidwell, Forensic Sci. Int. 83, 179 (1996) discloses a cotton sweat wipe, but this system is sweat volume-dependent and requires extraction and external chemical analysis. G.L. Henderson and B.K. Wilson, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 5, 1 (1973) discloses the collection of liquid sweat following exercise, but the system requires vigorous exercise, is sweat volume-dependent, and requires extraction and external chemical analysis.

C.C. Peck, D.P. Conner, et al. Skin Pharmacol 1, 14 (1988) discloses a gel with an analyte binding reservoir under an occlusive adhesive cover. However, this reference requires extraction and external chemical analysis.

U.S. Patent No. 4,909,256, issued to Peck discloses a dry binding reservoir under an occlusive adhesive cover. However, this reference requires extraction and external chemical analysis.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

U.S. Patent No. 4,821,733, issued to Peck discloses a collection and detection system under an occlusive adhesive cover. However, this reference requires highly sensitive detection components.

5 U.S. Patent No. 4,775,361, issued to Jacques discloses enhanced migration of analyte to a skin surface. However, this reference requires introduction of light energy into the body.

U.S. Patent No. 5,362,307, issued to Guy discloses iontophoretic enhanced analyte collection across skin. However, this reference requires the introduction of electrical energy into the body.

10 U.S. Patent No. 5,722,397, issued to Eppstein discloses ultrasound enhanced analyte collection across skin. However, this reference requires the introduction of sonic energy and chemicals into the body.

U.S. Patent No. 5,885,211, issued to Eppstein, discloses micropore formation using heated water vapor, physical lancet, sonic energy, high pressure jet of fluid, or electricity. However, this reference requires puncture of the skin using heat, sonic, or electrical energy, physical or hydraulic force.

15 The website www.spectrx.com discloses the application of vacuum to laser-induced dermal micropores for harvesting of interstitial fluid. However, this reference requires introduction of sonic energy into body, as well as physical energy to harvest interstitial fluid and may cause an inflammatory reaction.

20 There is, therefore, a need within the transdermal sampling field for a minimally invasive sampling technique and apparatus suitable for rapid, inexpensive, unobtrusive, and pain-free monitoring of important biomedical markers and environmental toxin exposure. These properties and advantages of

WO 01/91626

PCT/US01/17081

the present invention will become apparent to those of skill in the art upon reading the following disclosure.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

5 The present invention pertains to a transdermal sampling system, comprising: at least one sampler for retrieving and transferring at least one analyte obtained transdermally from the skin of a subject; at least one detector system for identifying and quantifying said at least one analyte; and at least one logic module for (i) receiving and storing input data from said at least one
10 detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least one detector.

 The present invention also pertains to a microfabricated device for
15 allowing remote monitoring of a subject, comprising: at least one sampler unit body for retrieving and transferring at least one analyte obtained transdermally from the skin of a subject; at least one detector system connected to said at least one sampler unit body for identifying and quantifying at least one analyte obtained from a subject; and a transmitter/receiver for transmitting data relating
20 to at least one analyte detected by said detection system to a logic module for processing thereby, and for allowing control of the microfabricated device by a logic module

 The present invention also pertains to a microfabricated device for
 sampling analytes from the skin of a subject, comprising: a detection chamber
25 for receiving analytes retrieved from the skin of a subject; a photonic detection

WO 01/91626

PCT/US01/17081

system, comprising a photonics source located attached to said microfabricated device in association with said detection chamber, and detectors associated with said detection chamber for detecting analytes received in said detection chamber.

5 The present invention also pertains to a microfabricated device for sampling analytes from the skin of a subject, comprising: a detection chamber for receiving analytes retrieved from the skin of a subject; a patch which changes color when contacted by predetermined analytes, located attached to said microfabricated device in association with said detection chamber; and
10 detectors associated with said detection chamber, for detecting a change of color of the patch indicating the presence of a predetermined analyte.

 The present invention also pertains to a microfabricated device for sampling and detecting analytes retrieved from the skin of a subject, comprising: at least one conduit for retrieving and transmitting an analyte from
15 the skin of a subject to a detector; and means for enhancing permeability of the skin of a subject for retrieving said at least one analyte therefrom.

 It is an object of the present invention to provide a transdermal sampling system.

 It is another object of the present invention to provide an integrated
20 detection system using patch type detector.

 It is still another object of the present invention to provide an integrated detection system using integrated photonics.

 It is a further object of the present invention to provide a microfluidic perfusion system for enhancing transdermal transfer of biological molecules.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

It is yet another object of the present invention to provide a thermal ablation mechanism by resistive heating for removal of the stratum corneum.

It is still another object of the present invention to provide a laser ablation mechanism for removal of stratum corneum.

5 It is a further object of the present invention to provide a microfluidic transfer of fluids utilizing capillary action.

It is another object of the present invention to provide an adhesive for holding transdermal sampling system on skin

10 It is another object of the present invention to provide a chemical modification of channel surfaces with antibodies containing fluorescently labeled antigens that are expelled from the surface and detected down stream by competitive binding.

A greater understanding of the present invention and its concomitant advantages will be obtained by referring to the following figures and detailed description provided
15 below.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a schematic illustration of the overall architecture of the microsystem of the present invention.

20 Figure 2 illustrates in cross-section a single reservoir capillary pair.

Figure 3 shows test results obtained for a back of the hand colorimetric test for blood alcohol.

Figure 4 shows the seal structure as viewed (a) from the bottom, and (b) in cross-section.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Figure 5 is a cross-section of a device of the present invention illustrating the non-invasive sampling sequence.

Figure 6 is a cross-sectional view illustrating the sequence of operation of the Bio-Fluidic Integrable Transdermal (B-FIT) microsystem.

5 Figure 7 schematically illustrates the basic fabrication steps for the three main components of the system, shown in cross-section.

Figure 8 is a schematic illustration of a detection scheme using fluorescently labeled proteins or metabolites.

10 Figure 9 illustrates in transverse section an alternative waveguide and sample chamber configuration.

Figure 10 illustrates a B-FIT microsystem.

Figure 11 illustrates a cross-sectional view of type C bed illustrating the detection scheme.

15 Figure 12 illustrates an overview of the ELISA microsystem informational component.

Figure 13 illustrates a cross-sectional view of type CI showing the microfluidic interconnect, coupling the external tubing with the silicon capillary.

20 Figure 14 illustrates a cross-sectional view of an alternative which uses a silicon sleeve around the DRIE capillary hole, showing the silicon sleeve microfluidic interconnect, coupling the external tubing with the silicon capillary fabricated as wafer through-holes, and external tubing connected to silicon capillary.

Figure 15 illustrates a cross-section view of a third bed structure incorporating a collection chamber for the analyte, which has flowed up through DRIE capillary through-wafer hole by capillary action.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Figure 16 illustrates a cross-sectional view of a fourth bed, designated type CIC, incorporating collection chamber and fluidic interconnect.

Figure 17 illustrates the general fabrication process for the type CI array, showing, (a) photoresist (PR) patterning for silicon sleeve, (b) oxide patterning of sleeve, (c) re-application of PR, (d) pattern for DRIE of bore hole, (e) remove PR and DRIE sleeve, and (f) remove oxide.

Figure 18 illustrates a cross-section showing the double sided processing necessary to fabricate the type CC (and type CIC) device.

Figure 19 illustrates a magnified view of anchored spiropyrans in a silicon capillary.

Figure 20 illustrates a single reservoir capillary pair.

Figure 21 illustrates a single reservoir capillary pair.

Figure 22 illustrates fabrication steps for wafer #2.

Figure 23 illustrates retention volumes at varying concentrations of [3H]-EB.

Figure 24 illustrates retention volumes at varying pH and ionic strengths.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides an enhanced system and method for monitoring the health of an individual and delivering drugs to an individual transdermally. Specifically, the present invention provides an integrated, cost-effective, rapid and unobtrusive assessment of a subject' medical condition. The invention further provides means for transdermal delivery of drugs in response to the aforementioned assessment of a subject's medical condition. Embodiments include, for example, monitoring a subject for pesticide exposure, monitoring the stress status of a war-fighter; phenotyping using the enzyme

WO 01/91626

PCT/US01/17081

N-acetyl transferase to indicate an infected or diseased state; monitoring external exposure and internal contamination of a person with either organophosphate nerve agents (tabun, sarin, soman) or organophosphate insecticides (parathion and metabolites thereof); monitoring inflammatory sequeli in response to microbial infection (interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor); monitoring microbial toxins (anthrax, botulinum, endotoxin); monitoring spore metabolites arising from human catabolism via lymphatic or hepatic pathways; monitoring stimulants such as caffeine, antihistamines (dexamethorphan, caffeine); monitoring stress through alterations in blood glucose concentration or altered metabolism of insulin/glucose.

An overall architecture of a preferred embodiment of the present invention is shown in Figure 1. The disposable B-FIT 100 is adapted to detect analytes of interest and is mounted in a receptacle 101 to provide mechanical support and electrical connections, including electrical connections to the thermal heaters of the B-FIT. The connection receptacle 101 also accurately aligns the B-FIT with respect to a switchable photonic backplane. The connection receptacle also preferably contains a power source 102; logic control 103; and electronic circuits for power management, electronic storage of results, electronic circuits for processing biochemical analysis data, electronic circuits for timing events, and means for communicating results 104 either directly or via telemetry. Optical components are provided, preferably located within B-FIT 100 or MEMS physiochip 106. In one embodiment, fluorescence measurements are made sequentially upon each of a plurality of analysis chambers contained in the B-FIT. Drug delivery chips 105 are also optionally provided by the present invention and are used to deliver potent drugs

WO 01/91626

PCT/US01/17081

transdermally, for example, drugs used to counteract nerve gas may be delivered. In addition, a physiochip 106 is optionally provided that gathers continuous basic vital information, including blood pressure and pulse rate.

5 The transdermal subsystem, located within the B-FIT and drug delivery chip, functions to contact the skin with a physiologically compatible solution or a physiologically compatible solution containing a drug. The B-FIT is organized into a dense array of somewhat independent single reservoir capillary pairs. The capillary pairs each comprise a reservoir capillary 211 for retaining a
10 physiologically compatible solution, the reservoir having a breakable seal 215 (illustrated in a ruptured state), and an adjacent transport capillary 212 for transporting physiologically compatible solution, which has contacted skin, to an analyte measuring site. An adhesive layer 216 is provided upon the lower surface of the B-FIT. In use, the adhesive layer is interposed between the lower surface of the B-FIT and the skin, and attaches the B-FIT to the skin.

15 In a preferred embodiment, a thermal perforation subsystem functions to ablate a microscopic portion of the stratum corneum, the topmost layer of skin, so that the interstitium can be exposed. The thermal perforation subsystem is preferably comprised of a micro-heater in close proximity to the skin surface, together with electrical components that control current to the micro-heaters.

20 A capillary array subsystem is preferably provided microfabricated into silicon wafers that comprise the B-FIT. The invention preferably provides a plurality of capillary-array subsystems, each of which comprises a fluid delivery chamber or reservoir chamber 201 to deliver a fluid to the skin surface, a capillary channel 202 to recover fluid from the skin surface, and at least one
25 transverse capillary channel in which the analyte or analytes are detected. The

WO 01/91626

PCT/US01/17081

B-FIT 200 is preferably comprised of a multilayered assembly of micromachined silicon wafers: a first wafer 204, a second wafer 206, and a detection layer 203. The detection layer preferably comprises a photonics system for visible or fluorescence measurements, or a layer that comprises colorimetric reagents that develop a color change in the presence of an analyte, or other means for detection of an analyte. The capillary subsystem thus preferably comprises capillaries for storage, passage and analysis of physiological fluids. The diameter and surface coatings of the capillaries are preferably optimized for controlling flow of the fluid and to prevent non-specific adsorption of fluid components onto the capillary walls.

An optional integrated photonics system is provided by the present invention to determine, either qualitatively or quantitatively, the presence of one or more analytes. The integrated photonics system comprises waveguides, lenses, mirrors, light sources, and light detectors. Preferably, the integrated photonics system is housed within connection receptacle 101, which is attached to a surface of B-FIT 100 that faces away from the skin. In some embodiments, the integrated photonics subsystem is replaced by a colorimetric analyte sensitive region, wherein a color change, perceived directly by an observer, indicates the presence of an analyte.

Each of these subsystems and the interactions between the subsystems is described in greater detail below.

The B-FIT preferably contains an array of somewhat independent analyte sensing devices, termed "single reservoir capillary pairs" 200. As used herein, the term "physiological fluid" represents a fluid that is biologically compatible with living tissue, and is, therefore, isotonicity and otherwise

WO 01/91626

PCT/US01/17081

physiologically (for example, pH) suitable as a medium for contacting, for example, viable epidermal cells or cells of the stratum corneum. An example of a physiological solution within the current meaning is physiological saline solution. Each single reservoir capillary pair preferably contains a reservoir capillary 201 that stores and releases a physiological fluid to irrigate the skin surface or a small region of the stratum corneum and recover analytes. A breakable seal 205 is preferably provided to control the timing of the release of the fluid to irrigate the skin. The fluid is preferably recovered into a capillary channel 202 that carries the fluid to an analysis location, for example a detection patch 203. The transdermal subsystem preferably utilizes single reservoir capillary pairs to ensure that the analyte of interest, if present, is accessible to the fluid.

As the term is used in the present application, "transdermal dosimetry" refers to the collection and detection of trace quantities of analytes that reach the surface of the skin by passive diffusion from interstitial fluid underlying the outermost layer of skin, the stratum corneum. It will be appreciated that, in one embodiment of the present invention, the interstitial fluid is sampled for the presence of analytes of interest. It will further be appreciated that, in another embodiment of the present invention, ablation of a microscopic portion of stratum corneum enables the physiologic solution from the reservoir to come into contact with the upper region of the underlying viable epidermis, enabling analytes in interstitial fluid to migrate into the physiologic solution via passive diffusion for analysis.

"Non-invasive transdermal detection," as the term is used in the present application, means detection of substances below the skin that is achieved

WO 01/91626

PCT/US01/17081

without physical or chemical modifications of the normal skin barrier. Small molecular weight analytes that exhibit both water and lipid solubilities can be sampled by non-invasive techniques.

5 For example, sweat can be sampled from the surface of the skin and analyzed for alcohol content by a colorimetric test indicative of blood alcohol concentration, as illustrated in Figure 3. In this example of non-invasive detection, alcohol is detected in sweat obtained from the backs of the hands of seven male subjects who have ingested 0-4 alcoholic drinks prior to the test. Alcohol contained in the sweat reacts with reagents contained within a reactive
10 layer, resulting in a quantitative measure of alcohol content of the blood.

However, non-invasive techniques are not practical where the analyte has a high molecular weight (for example, protein), is highly polar (for example, glucose), or is poorly soluble. The outward flux of such molecules across the skin can be greatly enhanced by ablation of the stratum corneum. Ablation is
15 performed to a typical depth of 30-60 μm , exposing the underlying viable epidermis, from which fluid can be collected and analyzed for analytes that only poorly penetrate unablated stratum corneum. This technique is herein termed "minimally invasive" because only the stratum corneum is ablated while the underlying viable epidermis is not breached. In one preferred embodiment of
20 the present invention, minimally invasive transdermal detection is achieved by microscopic heat ablation of the stratum corneum layer. In another preferred embodiment of the present invention, minimally invasive transdermal detection is achieved by laser ablation of the stratum corneum layer.

An adhesive layer preferably provides an interface between the device of
25 the present invention and the skin. The adhesive layer is affixed to the lower

WO 01/91626

PCT/US01/17081

surface of the B-FIT assembly and functions to attach the B-FIT assembly to a suitable portion of skin surface, thereby minimizing motion of the B-FIT assembly relative to the skin for efficient sampling. Gaps in the adhesive layer are provided over each capillary pair to permit the physiological solution to contact the skin. The adhesive layer prevents leakage of fluid laterally, and is preferably comprised of a Band-Aid-type adhesive that is relatively water impermeable.

It will be appreciated that that portion of the B-FIT that interfaces with the dermis preferably functions to firmly and occlusively place the B-FIT system in direct contact the external surface of skin (stratum corneum) or uppermost region of the viable epidermis. Occlusive contact are preferably such that prevent lateral or vertical movement of the B-FIT from its initial position on the skin, that limit release of B-FIT materials externally, and preclude entry of external materials. Movement preventive properties include preferably an adhesive element located peripherally on the lowermost surface of the B-FIT and/or covering the entire B-FIT and adjacent skin surface. Additionally, the lowermost surface of the B-FIT can be adhered to the dermis to prevent sheer forces that would displace the B-FIT from its initial position. The occlusive nature of the attachment of the B-FIT to the skin serves to confine all substances migrating from the body or skin within the B-FIT, including water vapor. This captured water vapor facilitates transdermal permeation by hydrating the stratum corneum, rendering it more permeable to a wide variety of analytes or therapeutic drugs.

In one preferred embodiment of the present invention, minimally invasive heat ablation of the stratum corneum is employed to achieve significant

WO 01/91626

PCT/US01/17081

enhancement of the efflux of certain analytes. In preferred embodiments, thermal ablation is used to remove the stratum corneum over a microscopic region of the skin through a mechanism of resistive heating. A micro-ablation unit containing a micro-heater is preferably fabricated upon the surface of the B-FIT adjacent to each capillary pair, and provides a conductive heat path to the stratum corneum. The micro-heater preferably comprises a pair of electrodes connected by a conductive pathway that is arranged, either by the use of a resistive material or by a serpentine conductive pathway, to provide sufficient resistance to the flow of electricity such that an effective amount of heat is produced so as to locally ablate an appropriate portion of the stratum corneum. Electrical connections are also provided to each of the two electrodes to connect the micro-heating unit to a controller that controls the application of an electrical current source to the electrodes. In preferred embodiments, it is advantageous that the micro-heater protrude from the surface of the silicon substrate of the B-FIT to provide improved heat transfer to the stratum corneum and reduce the power consumption of the micro-heater. In one embodiment, a heat-sink material is incorporated on top of the micro-heater to direct the thermal flow towards the skin barrier rather than through the bulk silicon material. In another embodiment, the micro-heater is fabricated onto a silicon mesa that protrudes from the main silicon substrate of the B-FIT. Such an embodiment may preferably require non-planar fabrication of electrical connections to provide conducting pathways from the silicon mesa to the contiguous bulk silicon substrate. Such non-planar fabrication techniques are known to those of skill in the art, as illustrated in Paranjape et al., Technical Digest, 1997 International Conference on Solid-State Sensors and Actuators,

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Chicago, Illinois, Vol. 1, pp. 397 (1997), herein incorporated in its entirety by reference.

The thermal ablation micro-heater is pulsed with a suitable alternating or direct current to provide local ablation. Control of the duration and intensity of the heating pulse is preferably carried out to effect ablation of the correct area and depth. The micro-ablation preferably occurs in a confined volume of the stratum corneum of approximately $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$.

Figures 4(a) and 4(b) illustrate the seal structure as viewed (a) from the bottom and (b) in cross-section.

A physiological compatible solution that may or may not contain one or more drugs is retained within the reservoir capillary 401 by a breakable seal 405 prior to use. The seal preferably provides an electronically addressable means for opening the reservoir capillary and contacting the skin surface or exposed stratum corneum to the physiological solution. The seal comprises a closure at the bottom end of the reservoir capillary and a means for opening the reservoir capillary. In a preferred embodiment, the seal comprises a thin membrane 400 that is preferably a dielectric bilayer that ruptures at elevated temperatures and a metal conducting path. Preferably, any thin, non-toxic, membraneous material that is sufficiently tough not to tear prior to intended use, is not electrically conducting, and ruptures at elevated temperatures is a suitable material for use as the seal closure. A preferred material is low-stress nitride. Control of the film stresses of the membrane is required during fabrication. Kinard et al., IEEE Trans. on Inst. Meas., 46(2), 347 (1998), which is herein incorporated in its entirety by reference. To fabricate the seal, a metal conducting path 402 is surface deposited upon a low-stress silicon dielectric 400. Preferred metals for

WO 01/91626

PCT/US01/17081

microheating elements include evanohm. Since the heat used to rupture the seal is optionally also used to ablate the skin in certain embodiments, a careful balance of film stresses, thickness and resistance is preferably achieved so as to provide both the desired heating and rupture properties. Deposition of the metal upon the film also requires deposition of metal upon an irregular topography. Such techniques are known to those of skill in the art. Geist et al., NIST Journal of Research 95(6), 631 (1990), which is herein incorporated in its entirety by reference. The conductive path preferably terminates at two electrical contact pads 403, 404, to facilitate passage of electricity through conductive pathway 402. In a preferred mode of operation, an electrical current passing through the thin conductive pathway heats the metal of conductive pathway 402 and causes the rupturing of the underlying dielectric layer, thus, opening the reservoir capillary. It should be noted that an advantage of this preferred embodiment of the present invention and this preferred seal, in particular, is that mechanical moving parts are absent, thereby enhancing reliability.

In certain preferred embodiments, the seal seals both the reservoir capillary and the capillary channel, and both are thereby opened simultaneously.

Figure 5 illustrates a B-FIT device cross-section, showing details on the non-invasive/minimally invasive sampling sequence. An exemplary unused capillary pair 502 has an intact seal wherein the physiological solution is retained within the reservoir capillary; upon application of a suitable electric current, the seal 501 is ruptured and the physiological compatible solution first contacts the skin and is then recovered into the transport capillary; and finally a used capillary with a ruptured seal 500 is illustrated. In this preferred

WO 01/91626

PCT/US01/17081

embodiment, each capillary pair functions as a single-use unit so as to utilize the seal and physiological solution.

Similarly, Figure 6 illustrates the sequence of operations of a minimally invasive embodiment of a B-FIT system to determine blood glucose concentration. A micro-heater 603 preferably operates to ablate a portion of the stratum corneum located below a gap in the adhesive layer 604 at the same time, or immediately prior to, rupture of the seal 601. Such a device provides an "on-demand" analysis. A physiological solution is preferably expelled onto the exposed viable epidermis and recovered into the transport capillary. The transport capillary preferably conducts the solution to a detection patch where the glucose is detected in a colorimetric reaction that produces a blue reaction. Note that in this preferred embodiment, the current pulses delivered to the micro heater and the seal may be the same or different; the heater and seal may, therefore, be electrically connected either in series or parallel.

Capillaries within the silicon body of the B-FIT device can preferably be fabricated by several techniques, for example by micro-machining, or by etching in place using deep resistive ion etching (DRIE) techniques. Referring now to Figure 7, construction of a preferred embodiment of the B-FIT is illustrated. The device comprises three main parts: the main body 700 which is preferably made of silicon 702, and contains several serpentine capillary channels 706, each with its own reservoir channel 707; a bottom capping section 701 that forms the lower part of the serpentine structure and contains the micro-heating elements 703; and a top capping section 704, which forms the upper part of the serpentine channel 706, and which optionally contains electrodes for assisting the flow of physiological fluids using electro-osmotic

WO 01/91626

PCT/US01/17081

pumping through the horizontal segments of the serpentine channel. The top-capping section 704 is, in some embodiments, bonded to the main body: an advantage of such an arrangement is good coupling of light into the capillary that is thereby achieved. The main body is preferably made of silicon. The main body 700 and the bottom capping section 701 are preferably permanently affixed to each other to comprise a sensor 705, that can, in certain embodiments, be detached from the top capping section 704 after use and replaced with a fresh array.

The reservoir and capillary channels are preferably fabricated within a standard silicon wafer. The dimensions of the capillaries are selected to facilitate the transport of sweat, interstitial fluid, or other physiological fluid, out of the open end of the reservoir under the force of gravity, and into a capillary channel through capillary action. In a preferred embodiment, the capillary channels are 25 μm in diameter and are approximately 500 μm in length, and the reservoir channels are 50 μm in diameter but are etched slightly shorter than 500 μm in length to provide a back wall. A lateral portion of the serpentine capillary channel 708 is provided, which provides for a region of fluid flow that is parallel and adjacent to the upper surface of the main body of the device for optical detection of analyte. The lower inside surface of the lateral portion is optionally provided with a reflective surface, such as a reflective metal coating, to facilitate optical detection. The lateral portion of the serpentine capillary is, in a preferred embodiment, completed by a surface of the top capping section. In use, the transport of physiological fluids and the recovery of analyte is enhanced by rinsing the skin with fluid previously

WO 01/91626

PCT/US01/17081

maintained within the reservoir channel and then recovering the same into the corresponding capillary channel.

The surface of the capillary array system is preferably functionalized to improve the properties of the surface, for example to prevent adsorption of protein, and/or to attach biomolecules such as antibodies to the surface.

5 Molecules that bind specific analytes are used to immobilize analytes for subsequent detection and quantitative analysis. Suitable biomolecules include, but are not limited to, antibodies, antibody fragments, artificial antibodies, lectins, hybridizable nucleic acids, nucleic acid binding proteins, proteins that
10 bind nucleic acids, proteins that bind other proteins, proteins that bind cofactors, cofactors (for example, flavins, pterins, thiamine, pyridoxals, quinone), and other reagents that specifically bind biological analytes.

Capillary tubes are preferably modified by either chemical or plasma treatment. This step aids surface cleaning of organic contaminants and
15 introduces surface hydroxyl groups on the capillary surface, which are preferably reacted with a silane such as aminopropyl trimethoxysilane (APTS) to provide a free amine group as an anchor for coupling reagents such as antibodies. In a preferred embodiment, polyethylene glycol (PEG) silane derivatives are used to provide a surface coating that prevents adsorption of
20 protein.

In one embodiment, a solution containing antibodies directed to an analyte of interest is exposed to mildly oxidizing conditions known to those of skill in the art, which provides aldehyde groups upon the surface of the antibodies. The aldehyde functionality is then coupled to a free amine on the

WO 01/91626

PCT/US01/17081

capillary tube surface via a Schiff base reaction, thus immobilizing the antibody to the capillary tube surface.

In a preferred embodiment, detection of the analyte of interest is by done by means of fluorescence. A substance that is capable of specifically binding an analyte (for example, an antibody) 802 is covalently attached to the surface of the capillary, as described previously. The binding sites of the immobilized substance 802 are filled with fluorescently labeled analyte 801, prior to use of the invention. When analyte, 800, is present, it competes for the specific binding sites, displacing a portion of the labeled analyte molecules into the solution. The degree of displacement of labeled analyte depends upon the concentration of analyte in the solution. Therefore, measurement of the amount of fluorescence displaced into the solution, when suitably calibrated, provides a quantitative measure of the concentration of analyte 800.

By preferably immobilizing a plurality of antibodies of different binding specificity, the binding sites of which are separately filled with their respective analytes tagged with fluorophores with distinct emission and excitation spectra, multiple analyte determinations can preferably be made within a single capillary pair. The use of spectral filters and/or alternative light sources is used in a preferred embodiment to photoexcite and detect fluorescence from the different fluorophores, and thereby, determine the contribution of each fluorophore to the total fluorescent properties of the sample.

Preferred fluorophores for the present invention include rhodamines, fluoresceins, Texas red, Oregon green, Bidipy dyes, and aminonaphthalenes.

In one embodiment, N-acetyl transferase, isozyme 2, (NAT-2) activity is measured as a marker of adverse drug effects, toxicity and predisposition to

WO 01/91626

PCT/US01/17081

disease. The NAT-2 phenotype can be detected, for example, by detecting the ratio of two metabolites of caffeine produced by NAT-2, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyl uracil (AFMU) and 1-methylxanthine (1X). Utilizing the ratio of AFMU to 1X, the activity of NAT-2 can be determined. Polyclonal antibodies can be raised to these two metabolites and then purified. These antibodies can also be used to detect AFMU and 1X in urine samples by ELISA.

In a preferred embodiment of the present invention, the reservoir capillary is provided with a micro-heating element located at the opposite end of the capillary to the seal. The micro-heater is activated to provide local heating of the physiological fluid so as to produce a bubble, thereby forcibly expelling the physiological solution from the capillary once the seal is ruptured. Note that the micro-heater functions as a pump means, but that the pumping is achieved without mechanically moving parts, thereby assuring increased reliability.

The micro-heating elements are preferably comprised of a resistive conducting pathway deposited by conventional deposition methods upon the surface of the silicon. Unlike the breakable seal, the heating elements are designed to withstand elevated temperatures without destruction of the conductive pathway. The conductive pathway is, in one preferred embodiment, a serpentine pathway, in which a high-resistance pathway and localized heat generation are achieved through the use of a serpentine pathway comprised of thin conductive pathways densely arranged upon within a small surface area.

Another preferred aspect of the present invention is an integrated photonics analysis subsystem. The integration of photonics components into the B-FIT system permits increased density of assays, reduced size, lower power

WO 01/91626

PCT/US01/17081

consumption, and decreased cost. In a preferred embodiment, the photonics components are housed within a plastic housing that comprises the top capping section of the device. Note that other detection methods are envisaged in the present invention and are discussed below.

5 In such an integrated photonics analysis subsystem, photonics sources, for example LED's or lasers, are combined with detectors, waveguides, couplers, and mirrors, to provide a fully-integrated optical detection system for detecting analytes in the present invention. The photonics components are preferably located upon, and attached to, the top surface of the main body of the B-FIT device in a top capping section.

10 Polymer waveguides with couplers for source and detector arrays are fabricated as integrated "flex circuits" for mounting. Fully integrated waveguide structures are fabricated by means known to those of skill in the art, such as monolithic fabrication of the waveguide by dry resist processes. Low η waveguide material ($\eta < \eta_{\text{water}} = 1.33$) is preferred.

15 Figure 9 illustrates a preferred embodiment of a waveguide and sample chamber. In a preferred embodiment, capillary fluorescence is used to detect the analyte within the capillary. LED sources emitting green, blue, yellow, or red light, can be used to excite fluorophores. The choice of exciting wavelength is dictated primarily by the excitation spectrum of each fluorophore. In other 20 embodiments, laser sources can be used to provide specific excitation wavelengths, although the cost, size, and power consumption of lasers is generally higher than for LED's.

In a preferred embodiment, the upper inner surface of the lateral portion 25 of the serpentine capillary is completed by a surface of the top capping section

WO 01/91626

PCT/US01/17081

900. Optical detection is preferably performed within the lateral portion. Light is conducted to and from the lateral portion by an integral waveguide fabricated within the, preferably plastic, top capping section. The orientation of the waveguide runs parallel to the silicon surface.

5 In another embodiment, the transverse capillary interrupts the path of the waveguide 903, so that the light conducted by the waveguide passes directly through a portion of the solution contained in transverse capillary 900. This embodiment has the advantage of simplicity: lenses and mirrors are not required to divert and collate the lightbeam. Fluorescence or absorbance measurements
10 are preferably made within the portion of the transverse conduit that interrupts the waveguide. A preceding conduit portion 902 preferably contains the binding reagents that give rise to the displacement into the solution of fluorophore when analyte is present. Subsequent conduit 901 preferably conducts the solution out of the light path.

15 In an alternative embodiment of the present invention, light measurements are made within a capillary that is constructed of a material having an index of refraction lower than that of water. This embodiment also eliminates the need for lenses and mirrors and offers superior signal to noise properties.

20 Figure 10 illustrates a preferred embodiment of the B-Fit system platform. To facilitate the coupling of light from the waveguide 1008 into the lateral portion, and from the lateral portion into the waveguide, a micro-mirror 1005 is preferably provided. The mirror is integrated as a pressed component in the top capping section, or is a separate component placed within the plastic
25 housing by injection molding, or is fabricated by any other appropriate means.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Preferably the micro-mirror 1005 is oriented at approximately 45° relative to the silicon surface of the lateral portion of the capillary, and is positioned directly above the lateral section. A highly reflective surface coating, such as a metal coating, is preferably deposited upon the surface of the mirror to reflect light from the horizontal waveguide downwards into the lateral portion of the capillary. A lens is preferably provided to collate the fluorescence excitation and emission light beams. Micro-lens 1012 is, in one embodiment, convex to provide divergence of the light beam entering the lateral section from the waveguide, and convergent with respect to light leaving the lateral portion and entering the waveguide 1008. In embodiments in which fluorescence detection is used, light from spectral region capable of exciting the fluorophore is conducted along the waveguide, strikes the divergent mirror and enters liquid contained within the lateral conduit. A fluorophore within the lateral conduit is preferably excited and emits light of a longer wavelength. The emitted light strikes the mirror, which converges the light, and re-enters the waveguide.

Bandpass or notch filters may preferably be interposed in the light path to optimize the signal-to-noise ratio of the detected fluorescence, depending on the bandwidth sensitivity of photodetector embodiment.

Light sources for the integrated photonics analysis subsystem include LED's, which have recently become available in light-emission colors from blue to green, thus essentially covering at least a portion of the excitation spectra of most commonly used fluorescent probes. See, for example, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*, Second Ed. W.T. Mason, ed. Academic Press (1999). Alternatively, microelectronic lasers can preferably be used

WO 01/91626

PCT/US01/17081

where specific wavelengths are required. Any light detection means can be used to detect the emitted fluorescent light. Photodiodes, phototransistors, Darlington pair phototransistors, or photoresistors can be fabricated onto the silicon surface of the main body, or can be provided as separate components.

5 Standard low power CMOS fabrication is preferably used to power the microsystem, to provide sequential logic control, and to permit storage of data in memory and its manipulation.

10 It should be noted that, despite the foregoing disclosure of fluorescence detection of analytes, the present invention is not restricted to fluorescence measurements. Other detection methods that are advantageously used in the present invention include, but are not limited to, Raman, UV-VIS, and FTIR spectroscopy, including two-dimensional techniques, and fluorescence correlation spectroscopy. Furthermore, radiation sensors and magnetic field sensors are also useful as the basis of detection in certain embodiments. For 15 monitoring radiation workers and the like, a preferred sensor embodiment is an optical random access memory (ORAM) material. These materials are composed of a photochromic molecule such as spirobenzopyran embedded in a poly(methyl methacrylate) matrix. The measurement approach is based upon measurement of radiation-induced tracks in optical memory media.

20 An optical deflection magnetic field sensor is preferably utilized where magnetic field monitoring is desired. The microsensor comprises an aluminum beam that is suspended above a micromachined silicon substrate using four aluminum support arms. These arms hold the beam at its nodal points, which are points of zero displacement when the beam vibrates at the fundamental resonant 25 frequency. A sinusoidal current is forced to flow through one support arm,

27

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

through the length of the beam, and out through the other support arm. The frequency of the sinusoidal current is essentially identical to that of the mechanical resonant frequency of the beam. In the absence of a magnetic field, the beam is unaffected. However, in the presence of a magnetic field oriented perpendicular to the beam, a magnetic force causes deflection of carriers, which in turn causes the beam to vibrate at its resonant frequency. The amplitude of the vibration is directly proportional to the magnetic field strength, which can be measured using a laser.

Figure 10 illustrates the operation of an embodiment of the B-FTT system with respect to analyte detection. The physiological solution preferably contacts the exposed viable epidermis following operation of microheaters 1006 to ablate a portion of the stratum corneum, rupture the seal, and expel the physiological solution from the reservoir channel 1002. Solution containing analyte recovered from the interstitial fluid bathing the viable epidermis preferably enters the capillary channel 1004. Within the capillary channel, analyte displaces fluorescently labeled analyte from analyte binding molecules affixed to the capillary walls. Displaced fluorescently labeled analyte is preferably carried to the lateral portion where it is excited by light conducted by the waveguide 1008, micro-mirror 1005, and micro-lens 1012. Light of a longer wavelength that is emitted by the fluorophore is, in one preferred embodiment, conducted back into the waveguide 1008 by the reversed optical pathway, and propagates to a detector.

The integration aspect of the present invention also preferably includes the aspect that real-time monitoring of a subject permits the use of adaptive control algorithms to optimize the conditions (for example, heating pulse

WO 01/91626

PCT/US01/17081

characteristics, sampling rate, among others), and drug delivery regimen, in response to data obtained. In this preferred embodiment of the invention, data machine-learning techniques are preferably employed to derive or learn some function that relates one measure of the health of a subject to analyte measurements, thereby possibly acquiring the ability to predict the health measure from subsequent analyte measurements. Adaptive control algorithms utilized in the present invention embody the steps of learning, adaptation, feedback, and decision-making. Since the body is a dynamic system, these steps occur simultaneously and continuously throughout the life of the device of the present invention.

Figure 12 illustrates an overview of the ELISA microsystem informational component. A preferred aspect of the present invention is the large number of individual measurements that are possible over an extended time period. With extended periods of measurement, baseline drift must be accounted for so that significant deviations are accurately detected. The present invention preferably provides computational means for accounting for baseline drift, and for thereby detecting deviations from a current baseline. This means is illustrated for an embodiment directed to monitoring health in a subject. With improved monitoring techniques, day-to-day variations in metabolism are preferably established in the healthy individual, and limits set to detect early stages of infection, disease progression, and exposure to toxins.

The metabolism of exogenous compounds such as drugs is mediated by a series of enzymes. The type and amount of these enzymes in each individual is reflected in the person's genotype and, based upon the genetic information, individuals can be classified as more efficient metabolizers (FAST) and others

WO 01/91626

PCT/US01/17081

as less efficient metabolizers (SLOW). In healthy individuals, the relationship between genetic makeup (genotype) and its expression (phenotype) is conserved, i.e. FAST genotypes produce FAST phenotypes, while SLOW genotypes produce SLOW phenotypes. However, a disease state of the, individual can alter this relationship, as can diet, smoking, alcohol, environmental chemicals, and biological or chemical warfare agents, among other factors. The determination of a person's NAT-2 genotype and the monitoring of that individual's NAT-2 phenotype can be used as a direct and sensitive probe of health and clinical status.

In this approach, polyclonal antibodies are preferably developed against the caffeine metabolites AFMU and 1X, and are used to determine NAT-2 phenotypes in an embodiment of the present invention. Blood glucose levels, cytokine levels, and dextromethorphan metabolite levels, can also be monitored.

Machine-learning algorithms are preferably used to acquire a metabolic baseline and to indicate when an individual's body begins to enter a state of distress or disease. The Winnow and Weighted-Majority Algorithms (Littlestone & Warmuth, Information and Computations 108, 212, (1994) can preferably be used. These algorithms, with well-understood formal properties, are capable of learning and performing in non-stationary environments (i.e., in the presence of baseline drift).

The readings of the two caffeine metabolites, AFMU and 1X, are preferably provided as inputs for computation, and the computation preferably proceeds in two alternating and cooperative modes: a learning mode and a performance mode. In the learning mode, the device preferably continually calibrates itself to the wearer's body chemistry using an adaptive algorithm,

WO 01/91626

PCT/US01/17081

which adjusts a set of weights, with the aid of feedback. User interaction is necessary only if the body is stimulated in such a way that the levels of the metabolites are not indicative of normal body function (i.e., the user will provide feedback only for false-negatives). In the performance mode, the device preferably takes the readings of the caffeine metabolites and, using the current concept descriptions (i.e., weights), makes a decision about the body's state of health, which is then communicated to the user. Since the body is a dynamic system, this process of learning, adaptation, feedback, and decision-making preferably occurs continuously and throughout the life of the device.

The device also preferably acquires a model of the wearer's healthy state, and uses this model to predict states of health in the future. Formally, machine-learning methods derive or learn some function f_n from a set of x, y pairs, such that $y = f(x)$. Naturally, f_n is an approximation to the true function, which is unknown.

However, when levels of, say, troponin I begin to increase (suggesting an imminent heart attack), then the device will preferably need to sample more frequently, as the rate of change from one measurement to the next will be increasing. In this situation, adaptive control algorithms are preferably employed, powerful enough to properly control the sampling rate, but simple enough to be realized in micro-hardware.

Thus, in a preferred embodiment, adaptive control algorithms can be used to task the transdermal component to sample its wearer for the target substances, and machine-learning algorithms can be used to acquire a model, which may change, of the wearer's healthy state.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Referring back, Figure 10 illustrates a preferred embodiment of a B-FIT microsystem. This total modular system preferably includes: (1) the fluid transport system including reservoir channel 1002, and capillary channel 1004; (2) micro-heater(s)1006, (3) the photonics system including waveguide 1008, micro-mirror 1005, and micro-lens 1012, and (4) the chemistry for analysis of selected analytes. The interstitial fluid containing molecules indicative of biomarkers are preferably obtained using a minimally invasive technique employing controlled thermal micro-ablation of the stratum corneum. The micro-heater(s)1006 used for this are preferably incorporated directly into the silicon-based subsystem that is part of the B-FIT microsystem. For optimal transport of interstitial fluids or analytes through the analysis capillary, a second reservoir capillary, containing a physiologically compatible fluid, is preferably used to drive all fluids towards the upper surface of the module. The driving force is preferably provided by microheater(s)1006 that produce bubbles to force the liquid to flow out of the reservoir capillary and over the thermally ablated region of the skin. Once the interstitial and physiological appropriate liquids containing tagged and untagged molecules reach the top holding-cavity, analysis can begin. The top of this total transdermal detection platform can preferably be integrated with optical waveguides, comprising micro-mirror(s)1005 and micro-lenses 1012 for properly directing the light within the holding-chamber. The light that strikes the analysis region of the holding-cavity is used to excite the fluorescently tagged molecules. The intensity of this fluorescence is preferably picked up through the return path by the same optical waveguide.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The modular nature of the microsystem provides an excellent platform that can be easily adapted for many innovative applications by applying new chemistries for the detection of selected analytes. For example, one analyte or biomarker that is especially important to children exposed to pesticides is acetylcholine. Acetylcholine is located throughout the body and when it is released, it acts as an excitatory neurotransmitter to propagate nerve conduction in the peripheral and central nervous systems, or to initiate muscle contraction. Exposure to organophosphorus pesticides causes inhibition of acetylcholinesterase activity resulting in an accumulation of acetylcholine. This increase in acetylcholine concentration will act as a biomarker, measured using the device by first establishing a baseline in an unexposed child. The MEMS-based patch is small and unobtrusive, permitting a child to live his/her daily life while being continuously monitored for exposure to pesticide contamination and providing early warning diagnostics.

Thus, one embodiment of the portable biomedical monitoring device of the present invention is as a pediatric micro patch system (PμP). In providing such a PμP device there are three tasks. Task 1 is the fabrication of silicon bed structures that function analogous to the B-FIT Microsystem. As described above, the bed functions to deliver fluids to the interior of the capillaries and to the collection chamber. In addition, the bed mirrors the B-FIT microsystem with regard to the integration of the chemistry. Task 2 is the chemistry to detect acetylcholine. This task includes chemically modifying a flat sample of silicon, which enables a functioning method for integrating chemistry to the bed. Task 3 involves the testing and validation phase, where the chemistry protocol is

WO 01/91626

PCT/US01/17081

adopted for the capillary bed. Detection limits of acetylcholine are established and sample bodily interstitial fluid is tested.

With regard to the B-FIT system, the fabrication of the capillary bed structures relies, in one embodiment, on bulk micromachining of silicon, accomplished through either deep reactive ion etching (DRIE) or wet chemical etching. The DRIE process preferably enables the fabrication of high aspect ratio through-wafer holes that form narrow micro-capillaries of varying diameters. Wafers with a nominal thickness of 500 μm are used; however, a preferred thickness can be established through surface modification testing.

For the exemplary bed structure shown in Figure 10, (type C), an array of capillaries with varying diameters are preferably formed using lithographic patterning and DRIE. This type of structure enables selection for the optimal dimensions required for capillary action to allow liquids to be drawn up and inside the channel, because wet chemistries are involved in both capillary-wall surface modifications and during fluorescence validation using a test solution containing acetylcholine. Once the capillaries have been chemically modified, testing for fluorescence is preferably accomplished using a laser source at the top-side entrance port of the silicon capillary, and a detector located at the exit port on the bottom-side.

Returning to Figure 11 illustrating this preferred detection scheme, the spot size of the laser light path 1102 can preferably be adjusted to match the diameter of silicon capillary hole 1104 etched in silicon substrate 1106, while its excitation wavelength is preferably held at 430 nm, to match the frequency required to excite the fluorophore causing it to emit fluorescent light 1108. The detector preferably includes photomultiplier 1110, and monochromator 1112 is

WO 01/91626

PCT/US01/17081

preferably used to tune the detector to the fluorescence wavelength of 567 nm.
In addition, notch filter 1114 is preferably used to greatly attenuate the
unwanted laser light frequency from reaching the photomultiplier.

5 A second exemplary bed structure, termed type CI, is similar to the basic
capillary array with a modification to the entrance port that is fitted with a
microfluidic interconnect. This design is preferably used as an alternative to
type C, in a situation where capillary action perhaps does not function
appropriately. In such circumstances, type CI provides an interconnect
mechanism allowing for external tubing or syringe ports to be directly coupled
10 to the silicon capillary for surface modification and testing purposes.

Figure 13 illustrates a cross-sectional view of a type CI bed structure
showing the microfluidic interconnect, coupling the external tubing with the
silicon capillary. Typically, a hole produced by DRIE can preferably be made so
that its inner and outer diameters match that of the interconnect tubing, which is
15 inserted into the opening and held in place with adhesive 1302. Thus, DRIE
microcapillaries fabricated as wafer through holes 1304 are in silicon substrate
1306. The holes are preferably produced such that the inner and outer diameters
match that of external tubing connected to silicon capillary 1308, wherein the
tubing is held in place with adhesive 1310. However, care must be taken such
20 that the adhesive used to hold the tubing does not seep into the capillaries
blocking the flow.

Figure 14 illustrates a cross-sectional view of an alternative embodiment
which uses a silicon sleeve around the DRIE capillary hole, showing the silicon
sleeve microfluidic interconnect, coupling the external tubing with the silicon
25 capillary. The sleeve preferably provides enhanced mechanical integrity for the

WO 01/91626

PCT/US01/17081

external fluidic component, but also prevents adhesive 1402 from seeping and plugging the capillary hole. Once the external tubing is attached to the silicon substrate, chemicals and analytes can preferably be injected using either pressure gradients or syringes. The external tubing is then removed, having fulfilled its purpose of introducing fluids into the narrow capillary channel, and the verification procedure to detect fluorescence can start, as for the type C device. Figure 14 thus shows adhesive 1402, silicon substrate 1404, DRIE microcapillaries fabricated as wafer through-holes 1406, and external tubing connected to silicon capillary 1408.

Figure 15 illustrates a cross-sectional view of a third bed structure incorporating a collection chamber for the analyte, which has flowed up through DRIE capillary through-wafer hole 1502 by capillary action. For this microstructure, called type CC, the silicon capillary is preferably fabricated using DRIE followed by an anisotropic wet silicon etch to create the collection chamber on the front-side of silicon substrate 1504. With this bed, it is sufficient to chemically modify only the surface of this chamber. The analyte preferably flows up the capillary channel and reacts with the immobilized chemistry in the chamber to produce fluorescence light path 1506.

Figure 15 also illustrates preferred excitation laser 1508 and fluorescence light path 1510 detection set-up. The excitation and detection method preferably makes use of excitation laser 1508, photomultiplier 1512, and monochromator 1514, respectively, as before, however, now the setup is preferably only on the front-side of the bed structure. The photomultiplier 1512 and monochromator 1514 are preferably set directly above the collection reservoir to act as the fluorescence detector. In this situation, the impinging

WO 01/91626

PCT/US01/17081

laser light can preferably be directed towards the collection chamber at an angle such that its reflection does not contribute to photomultiplier 1512 detection. Nevertheless, notch-filter 1516 can preferably be used between the detection unit and the chamber to eliminate any stray light from excitation laser 1508.

5 Figure 16 illustrates a cross-sectional view of a fourth preferred bed, designated type CIC, incorporating collection chamber 1602 and fluidic interconnect. In addition to the silicon capillary channel and collection chamber of type CC, this bed preferably also includes a fluidic interconnect mechanism on the back-side of the wafer. As before, this design can preferably serve as a
10 fallback mechanism if the capillary action does not provide enough capillary force to draw the fluid up to the collection chamber. The fluidic interconnect preferably makes use of the silicon sleeve 1604, as described in the type CI test-bed structure. DRIE capillary through-wafer hole 1606 and silicon substrate 1606 are also shown.

15 For each variation in bed structure, fabrication of the through-wafer capillary arrays is made on single-sided polished, <100>-type 4 inch silicon wafers. The array of capillary holes preferably consists of four diameter values (25 μm , 50 μm , 75 μm , and 100 μm) with a nominal length of 500 μm , which corresponds to the wafer thickness. For the type C design, the patterns for the
20 holes are preferably formed in a photoresist layer, which acts as an ideal masking layer to the DRIE process. A single (standard) photolithographic step preferably produces patterns on the front-side of the polished silicon surface. Although the DRIE process renders an anisotropically etched cavity, some undercutting of the mask takes place. Thus, the pattern of the mask takes into
25 account this unavoidable lateral etch to achieve the desired diameters for the

WO 01/91626

PCT/US01/17081

capillaries. Depending on the type of DRIE system used, the ratio of vertical-to-lateral etch is better than 50-to-1. That is, for every 50 μm of etch depth, there is approximately 1 μm of under-etch beneath the masking layer. The masking dimensions are therefore dependent on this etch parameter, which

5 can be determined through prior testing. DRIE services can be obtained, for example, through one of the National Nanofabrication Facilities, or through the MEMS Exchange program.

Figures 17(a) to (f) illustrate a preferred general fabrication process for the type CI array, showing, (a) photoresist (PR) patterning for silicon sleeve, (b) oxide patterning of sleeve, (c) re-application of PR, (d) pattern for DRIE of bore hole, (e) remove PR and DRIE sleeve, and (f) remove oxide. The initial step, prior to lithography, is to grow a thin layer of thermal silicon dioxide over the entire silicon surface. Photoresist is applied, and the oxide is patterned and etched to delineate the locations of the silicon sleeves that are located around

10 each capillary hole providing for microfluidic interconnections. This step is followed by another application of photoresist, and the capillary locations are patterned into both photoresist and oxide. Through-wafer holes are again formed using DRIE, as with the type C device. The photoresist is subsequently removed, leaving the pre-patterned layer of thermal oxide on the front-side of

15 the silicon surface. A much shorter DRIE step is performed, with the oxide layer acting as the masking layer, to create the silicon sleeve.

For both type CC and CIC the fabrication process preferably requires the wafers to be double-sided polished since back to front alignment is required. For the type CC device, the collection chamber is preferably bulk micromachined

20 into the front-side of the wafer using an anisotropic wet chemical etchant.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Subsequently, a thin thermal oxide is grown only on the front-side to act as a passivation layer, while the back-side is coated with photoresist. The DRIE procedure for the capillaries is performed from the back-side so the capillary hole aligns with one side of the collection chamber.

5 Figure 18 illustrates a cross-section showing the double sided processing necessary to fabricate the type CC (and type CIC) device. The wafer is then inverted so that subsequent processing of the capillaries and silicon sleeve interconnects on the back-side follows the same procedure as that for the type CI device.

10 With regard to a preferred surface modification aspect of the present invention, the technical approach to providing a surface bound fluorescent probe specific for the biomarker acetylcholine is preferably accomplished by modifying the method developed for liquid phase detection set forth in Inouye, M. et al., Nondestructive Detection of Acetyl Choline in Protic Media: Artificial
15 Signaling Acetylcholine Receptors, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 5517 (1994). In a preferred embodiment, the method utilizes spiropyrans, which are inexpensive and readily available from commercial sources. They are known for their spectral properties and are very robust, especially compared with molecules used for standard ELISA detection methods. The spiropyrans are synthetically
20 surface immobilized on the silicon bed, in either a collection chamber or in a capillary, using silane chemistry and standard coupling chemistry.

 Figure 19 illustrates a magnified view of anchored spiropyrans in a silicon capillary. A spiropyran (for example, C-methylcalix[4]resorcinarene) is preferably modified to incorporate a carboxylic acid cross-linking group that
25 can be coupled to a free amino-silane modified silicon surface. Stoichiometric

WO 01/91626

PCT/US01/17081

addition of base to the spiropyran allows for the reaction of an ω -bromocarboxylic acid (for example, 5-bromopentanoic acid). The length of this molecule is related to its solubility and reaction efficiency. Longer carbon chain-lengths are more soluble, but harder to couple to the surface, while longer carbon chain-lengths are less soluble and more likely to couple to the surface.

5 The synthesis can be followed by NMR spectroscopy as needed to examine and characterize reaction products.

The spiropyran or resorcinol/acetaldehyde tetramer preferably forms a tetraphenolate in alkaline media that arranges in a bowl shaped cavity and can complex alkylammonium cations. When complexed with a pyrene modified N-alkyl pyridinium cation (PPC), no fluorescence is observed. The PPC may be purchased or synthesized depending on the selected method. One preferred method of incorporation of PPC is by solution complexation with the spiropyran. After anchoring the spiropyran, PPC is introduced and the complex is formed. The competitive binding of acetylcholine kicks off PPC and produces a fluorescent complex. This complex is detected using the laser/detector scheme described above in the microfabrication approach. PPC can also be incorporated by forming mixed monolayers of the spiropyran and the PPC. In this way, complexes are formed at the solution surface interface. Another preferred way of making PPC complex with the spiropyran is by synthetically attaching PPC to the spiropyran as describe by Inouye et al., supra. This method allows for intramolecular quenching of the fluorescence as opposed to intermolecular quenching as described in the first two methods.

10
15
20

Upon completion of synthesis, silicon substrates are preferably derivatized with silanes such as 3-aminopropyltrimethoxysilane. The reaction

25

WO 01/91626

PCT/US01/17081

provides a free amino group on the silicon surface that can be coupled using a water-soluble carbodiimide, such as EDC, to the carboxylic acid of the modified spiropyran. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and contact angle measurements can be employed to analyze the progress of varying surface attachment reactions. In a preferred embodiment, the highest surface coverage is achieved. In addition to surface coverage, the fluorescence efficiencies is examined using a fluorescence microscope. This aids in qualifying the activity of the attached spiropyran. A simple experiment monitoring the qualitative fluorescence intensity before addition of acetylcholine and after the addition of acetylcholine provides a baseline. At this point, the method is transitioned into bed devices for testing.

During the microfabrication task, DRIE and wet chemical etch rates are preferably determined using test samples in order to produce the proper bed structures. In addition, preferably samples are cleaved and viewed through a scanning electron microscope to determine whether the proper cross-sectional geometry of the through-wafer capillaries has been achieved. For the chemistry task, surface modification and chemical synthesis is preferably used to validate the immobilization protocol on a flat sample of silicon. This determination requires the detection of fluorescence after excitation on a relatively large sample; thus, a fluorescence microscope is used during this testing procedure.

Once the chemical synthesis and surface modification tasks are completed through rigorous large sample testing, the chemistry is then tested on the small-scale capillary bed structures. For this phase, a photonics-based test set-up is preferably employed based on the excitation and emission of fluorophores. Excitation is through direct absorption from an external laser

WO 01/91626

PCT/US01/17081

source. Several preferred sources are available for various testing strategies, including tunable continuous wave (CW) argon ion pumped dye laser, an air-cooled argon ion laser, a Nd:YAG nanosecond pulsed laser which pumps an optical parametric oscillator, and several smaller HeNe lasers with both red (632.8 nm) and green (543 nm) wavelength outputs. The Ar ion pumped dye laser has outputs from the pump laser at wavelengths of 488 nm and 514 nm, with a maximum power of 9W. The maximum power from the CW dye laser is 3W, and is tunable in the ranges of 590 nm. to 600 nm and 610 nm to 630 nm, with an additional output at 577 nm. The air-cooled Ar ion laser has a single output at 514 nm and provides approximately 70 mW of power. The Nd:YAG laser has a fundamental wavelength of 1064 nm, along with the doubled (532 nm) and tripled (355 nm) outputs achieved with internal harmonic generators (KDP crystals). The pulse width is 5 to 7 nanoseconds, with peak pulse powers of over 200 mJ. However, since the fluorophore being immobilized on the silicon surface needs to be excited at 430 nm, the power from the tripled output Nd:YAG laser can be used to pump an optical parametric oscillator (OPO), based on a beta Barium borate crystal (BBO). This is essentially a resonant optical cavity containing the nonlinear BBO crystal. The pump beam is converted to the so-called signal and idler beams, where the wavelengths following the relation:

$$\frac{1}{\lambda_{\text{pump}}} = \frac{1}{\lambda_{\text{idler}}} + \frac{1}{\lambda_{\text{signal}}}$$

which arises from the photon energy conservation requirement. The ratio between the two output wavelengths is governed by the angle of the BBO crystal with respect to the incident beam. Using this, the output wavelength can be tuned by changing the crystal angle. Either the signal or idler output can be

WO 01/91626

PCT/US01/17081

eliminated using a high- or low-pass optical filter at the output port of the OPO. This output is tunable in different ranges from about 400 nm. to 2200 nm. The ranges are set by the resonant cavity mirror properties and the output filters. Peak pulse energies in these ranges are on the order of 10 mJ.

5 The output fluorescence is preferably detected either in the forward direction or at some angle depending on the microstructure geometry. In either case, the incident laser light is preferably blocked using both a holographic notch filter and a monochromator. The notch filter, commonly used in Raman spectrometers, cuts all light at the wavelength of the excitation light, whether
10 coming directly from the laser or from Rayleigh scattering. The monochromator provides further rejection of unwanted light, both ambient and from the laser. The monochromator also allows tuning to the maximum of the emission spectrum, for optimization of the signal-to-noise ratio. Finally, detection is preferably accomplished using a photomultiplier and a boxcar-integrator
15 detection scheme, with gating from the laser electronics. Alternately, the signal is detected with a silicon avalanche photodiode, providing higher detection efficiency.

 With the type C bed, capillary action is preferably tested in order to, first, modify the internal silicon surface wall of the capillary hole, and then,
20 second, to draw up analyte, which reacts with the immobilized sidewall chemistry. If the capillary forces are not sufficient to draw up significant amounts of fluid for the capillary dimensions being tested, then the type CI test-bed is preferably used. This allows direct physical insertion of fluids within
25 the capillary using a pressure gradient or a syringe pump connected to the microfluidic interconnects. In either case, the photonic detection system is

WO 01/91626

PCT/US01/17081

preferably used to test the feasibility of performing in-capillary fluorescence measurements. In contrast, the type CC test-bed requires chemical modification only within the silicon surface of the collection chamber. Therefore, this device can also be used to test capillary action as well as the photonic detection system situated on the front-side of the wafer. Again, the device can preferably be tested physically by inserting the analyte into the capillary array, using bed type CIC.

Once a particular bed is selected, further testing preferably relates to determining the selectivity and sensitivity of the biomarker to the immobilized chemistry within the capillary array. This type of testing is preferably conducted, for example, by introducing a solution containing acetylcholine at varying concentration levels. By determining the amount of fluorescence variation, using the output from the photomultiplier, with corresponding changes in acetylcholine concentration levels, a quantitative indication of the lower limit of detection of acetylcholine, and therefore device sensitivity, is obtained. To determine selectivity, another series of tests are preferably performed to introduce other neurotransmitters in various concentrations within the analyte solution and to determine their relative fluorescence with respect to that obtained for acetylcholine. The more common neurotransmitters that can be used in this testing phase, other than acetylcholine, include adrenaline, dopamine, serotonin, tryptamine, histamine, and glycine. For comprehensive testing of selectivity, the device is preferably tested for other neurotransmitters such as noradrenaline, tyramine, glutamic acid, aspartic acid, taurine, and proline that could introduce an unwanted cross-sensitivity fluorescence response. Finally, in vitro testing of the device preferably using traditionally

WO 01/91626

PCT/US01/17081

extracted interstitial fluid from human donors is conducted. Samples are taken from individuals exposed to high levels of pesticides, and a control set is taken from those who were not exposed to toxic environments.

5 A sample result of this fabrication and testing process is preferably a silicon-based capillary array bed (PμP) with a chemical immobilization protocol for the detection of acetylcholine, which is a biomarker for organophosphate type pesticide exposure. In addition, a sensitivity profile is established. The PμP microstructure design allows it to be readily interfaced and integrated as a module to the B-FIT transdermal sampling platform. The transdermal sampling process is preferably initiated using a minimally invasive micro-thermal ablation heater to reach the stratum corneum/viable epidermis interface, allowing for extraction of interstitial fluid. The B-FIT microsystem makes use of silicon fabricated capillary arrays to allow for interstitial fluid transport to a glucose-sensing patch situated on top of the array. The basic capillary array structure of the PμP microdevice can be incorporated into the B-FIT. The detection mechanism for the biomarker acetylcholine in PμP preferably consists of the synthesis of a fluorescent spiroopyran that is surface immobilized. With the chemistry identified, surface modification of the bed is carried out, allowing for ease of manufacture of low-cost, minimally-intrusive chip scale detection.

10 20 The chemistry developed relies upon an alternate preferred embodiment of the B-FIT microsystem device, incorporating a photonics component instead of a glucose patch. This system is preferably fitted with waveguide technology on the top of the array, which is used to transmit and detect excitation and fluorescence light, respectively. Again, the PμP microdevice is ideally suited as a module to the B-FIT, in view of the fluorescence detection of acetylcholine.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Testing of simulated body fluid and human serum can preferably be done on the test bed to determine the sensitivity and the specificity of the chemistry.

The present invention allows for the fabrication and chemical immobilization of any number of biomarkers, thereby creating a set of modules to be "plugged into" the B-FIT platform. Numerous examples, possibilities, and applications exist, ranging from a vast number of molecular biomarkers for health monitoring through enzyme and metabolite detection, to hormones. For pesticide detection some of the other key biomarkers would be acetylcholinesterase, acetic acid, and choline. It is also important to detect other analytes, aside from organophosphates, made possible through the use of the P μ P microdevice. These include anticholinesterase insecticides (phosphorothionates), organochlorine insecticides (DDT, Dieldrin, Lindane), pyrethroid insecticides (Permethrin, Fenvalerate), herbicides (TCDD, Paraquat), and rodenticides (Warfarin, Diphacinone, sodium fluoroacetate, strychnine). Other key biomarkers to trace would be the antidotes such as atropine and pralidoxime.

Processing steps and the respective equipment in the fabrication of the P μ P preferably include the following: (1) lithography: a front-side mask aligner capable of 1 μ m line resolution with UV and deep-UV photolithography; a fixture capable of two sided alignment; a photo-resist spinner, pre- and post-bake ovens and associated processing chemicals; (2) deposition: a magnetron sputtering system capable of depositing metals (Al, W, Ni, Ti, Pt, etc.), and magnetron reactive sputtering of oxides which can be provided in the fabrication; an e-beam evaporator with three hearths for low energy deposition of metals; and deposition apparatus for PECVD oxides and nitrides for coating

WO 01/91626

PCT/US01/17081

surfaces to adjust for stresses and adhesion; (3) film treatment, to adjust the stresses and strengths of films and membranes using rapid thermal annealing capability; (4) photo-mask design and fabrication; (5) etching: deep reactive ion etcher (DRIE), RIE equipment and wet TMAH etching; (6) diffusion and heat
5 treatment: high temperature furnaces capable of wet and dry oxide growth and furnace soak annealing which can be required for heaters comprised of doped silicon; and (7) measurement: a thin film stress tester and a Leitz thin film analyzer or a Nanometrics Automatic Film Thickness measuring apparatus for measuring film thickness. Microscopic examination is available with a high
10 quality Leitz microscope and a Zeiss SEM with EDS.

The transdermal transfer system (TTS) is preferably manufactured using various standard processing and fabrication technologies. The TTS microdevice fabrication also relies on several micromachining steps, from simple bulk micromachining to deep reactive ion etching (DRIE) procedures.

15 The fabrication process steps of the TTS microdevice preferably involve silicon processing of two wafers, as indicated in Figure 20. Wafer #1 preferably comprises the reservoir channel, capillary channel, micro-ablation unit, and breakable seal. The micro-ablation unit contains the micro-heater along with a heat-sink to provide a highly conductive thermal path towards the stratum
20 corneum. By incorporating a heat-sink on the micro-heater, the heat transfer is more favorably directed towards the stratum corneum. Wafer #2 preferably contains the reservoir micro-heater, which is preferably aligned to mate with the top of the reservoir channel.

Figure 21(a-e) provides cross-sectional fabrication diagrams of the wafer
25 processing steps for wafer #1. Double-sided polished, 300 μm thick silicon

WO 01/91626

PCT/US01/17081

wafers are preferably used in the processing steps because working will be done on both the front and back sides. Initially, in one embodiment, the microablation heater is formed by depositing and patterning a metal layer onto a patterned silicon dielectric layer to form a serpentine heating element through which current is passed. The dielectric is preferably patterned as square region where the heating element resides. A preferred heater material can be selected through thermal simulation. In addition to the heating element, a temperature sensor can preferably be integrated alongside to monitor the local temperatures generated by the current through the heating coil. This is indicated in Figure 21a, where processing occurs on the top-side of the wafer, but will eventually be inverted to become the bottom. In this version of the design, all bonding pads and traces are located in the plane of the heating element. The metallic traces and heating elements are preferably insulated and protected by depositing a layer of low-stress silicon nitride across the wafer. Although stress-free nitride is not required for this passivation purpose, it can find an application in the subsequent step.

Referring back to Figure 4 (a-b), the second step is preferably to fabricate the breakable seal. The seal is preferably composed of a bilayer formed by the low-stress silicon nitride layer, deposited in the earlier step, and a metal that can weaken at elevated temperatures. The area where the metal is deposited determines the location of the reservoir capillary. Since the capillary dimension is preferably on the order of 75 μm , the breakable seal must be situated in this 75 μm region in order to open the reservoir capillary. Figure 4 shows the bottom view design of the breakable seal. It consists of two low-stress silicon nitride flaps bridged by the seal metal. By passing large

WO 01/91626

PCT/US01/17081

enough currents through this metal strip, the heat is sufficient to weaken the metal seal thereby releasing the nitride flaps. Although the nitride layer is low in stress, preferably there is some controllable tensile or compressive strain. By adjusting the deposition conditions of the silicon nitride, it can be made in slight compression so that when the seal ruptures, the nitride flaps crudely act as unidirectional valves.

The preferred third major processing step is to form the heat-sink on top of the micro-ablation heating element. As discussed above, a heat-sink preferably directs the heat towards the stratum corneum instead of within the bulk silicon material. Without the heat-sink, the majority of the heat travels through the silicon, because its thermal conductivity is higher than air. By depositing an aluminum heat-sink on the heater, the resulting heat flow is approximately divided evenly between silicon and aluminum. This is because the thermal conductivities of both silicon and aluminum are comparable, but by selecting a metal with a higher thermal conductivity than that of silicon and aluminum, a more efficient heat transfer can be achieved. In a preferred embodiment, aluminum is used as the heat-sink material, however additional materials can be applicable. In addition to increasing thermal flow towards the stratum corneum, the placement of a heat-sink preferably reduces the overall distance between the source of heat and the skin barrier, thereby reducing power consumption. The aluminum is preferably patterned using a lift-off procedure. However, since a thick metal layer may be needed, preferably either a thick photoresist is used or the aluminum is deposited over the entire wafer. This may cause problems with the metal seal, therefore a thin protective isolating layer is preferably deposited prior to the aluminum. The aluminum is then

WO 01/91626

PCT/US01/17081

lithographically patterned after the fourth step, to remain only on the micro-ablation heater. The patterning is done at a later stage in order to keep the surface planar for subsequent processing steps.

5 The fourth preferred processing step involves inverting the double-sided polished wafer to reveal the as yet unprocessed side. A photoresist masking layer is preferably deposited in order to pattern the openings where both reservoir and thin capillaries are formed simultaneously. These capillaries are both fabricated using deep reactive ion etching in order to obtain narrow, high aspect ratio through-wafer holes. The thin capillary is preferably designed to be 10 25 μm in diameter while the reservoir capillary is about 75 μm in diameter, both with nominal lengths of 300 μm . During the DRIE process, the silicon is anisotropically etched until holes are made through the wafer. However, for the reservoir capillary, the etching process terminates on the silicon-nitride that is already present on the wafer backside. This is because the nitride acts as an 15 etch-stop for the DRIE etch process. As all processing of wafer #1 is now complete, the aluminum heat-sink can be defined and the isolating layer can be removed.

The preferred processing steps for wafer #2 can also be outlined by a cross-sectional fabrication diagram, as shown in Figure 22. The sequence of 20 steps is far less laborious, however some alignment issues still exist. The first step in this preferred process is to fabricate the reservoir heating element on the front side of the silicon wafer. This is preferably done, as before, by depositing a heater material onto a silicon dielectric surface. The material is preferably patterned in the form of a heating coil, and is subsequently covered by a 25 protective silicon nitride passivation layer. The preferred next step is to deposit

50

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

on the surface an etch-stop dielectric layer. Next, the wafer is inverted and patterned using DRIE to form the connecting capillary opening. Once complete, the third step preferably involves depositing a layer of silicon dioxide onto the side containing the reservoir heater. This allows for the final step, anodically bonding wafer # 1 with wafer #2. Care and attention preferably is taken to ensure that the reservoir heater mates with the reservoir capillary opening, and also to ensure that the capillary from wafer # 1 connects properly with the capillary formed in wafer #2.

Each capillary and reservoir pair is preferably addressed individually so as to expose only one such pair to the skin surface in order to perform a single fluid analysis. Once employed, the open end of the capillary continues to remain exposed to the skin, but is not addressed for any further use.

A preferred embodiment includes additional considerations regarding the timing for signals to open seals and control heaters. The total amount of energy imparted to the heaters that affect the ablation of the stratum corneum and the time over which that energy is imparted are also considerations. The system is designed and tested for minimal ablation energy. That is, the minimum energy for the minimum duration is a significant parameter for operation, resulting in minimal damage of the underlying viable epidermis, and therefore minimizing the invasive nature of the process.

Other timing issues are also considerations, including the timing of the ablation process (heaters) with relation to the opening of a capillary seal. During the time the seal for a given capillary is being ruptured, the micro-ablation heater is preferably pulsed with an appropriate alternating current to thermally remove successive layers of the stratum corneum.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Another timing consideration is the heater pulses associated with the reservoir emptying process. The timing of heater pulsing is a consideration to keep the reservoir flowing, and not taking up fluid from the stratum corneum. The heater at the top of the fluid reservoir preferably forces out the liquid contents. Control of this heater permits control of the flow of liquid during the reservoir/capillary analysis lifetime.

Preferably tests of the various subsystems are done to establish the dermatotoxicological and clinical pharmacological advantages. The test sequence is preferably sequential, starting with simple tests on various materials, progressing to in vitro tests on human cadaver skin or animal skin, then to complete animal testing and finally clinical pharmacological testing with human subjects. One shot valves covering the capillary and reservoir are preferably tested and optically examined for successful deployment. The liquid reservoir is preferably initially tested to prove that it can be emptied of liquid contents. Initial tests are preferably also done on adsorbent surfaces. Further testing is preferably done on a nonabsorbent surfaces to prove flow of liquid up the capillary. Determination of the optimal flow rate for the reservoir and capillary combination is preferably determined based on glucose concentration at the patch detector.

The glucose detector patch material is preferably tested for sensitivity using standard in vitro wet chemistry methods, to assure that its cellulose platform-glucose detector material is capable of reflectance densitometric detection of at least 10 fg of glucose per μm^2 .

In vitro (using cadaver skin) and in vivo animal and human biomechanical tests of FDA approved biocompatible adhesives and adhesive

WO 01/91626

PCT/US01/17081

membranes obtained from 3M, Inc and Adhesives Research, Inc, are preferably conducted to determine optimal adhesive components and skin preparation conditions for occlusive, fluid tight adhesion requirements of the B-FIT device.

5 Upon completion of initial tests of the B-FIT system, preclinical dermatotoxicological testing begins. These tests preferably consist of a demonstration of the biophysics of the device, done in vitro using human cadaver skin or animal skin, and evaluation of local dermatological effects, done on live animals.

10 Dermatotoxicological testing is preferably undertaken to demonstrate the biophysical properties of the B-FIT device. Biophysical testing is preferably conducted on animal or human cadaver skin. Full thickness human abdominal skin specimens can be obtained commercially from Vitron, Inc. (Phoenix, AZ) and other vendors. Animal tissue samples can preferably be used to establish a baseline and mitigate costs. The skin samples preferably serve as a platform to
15 investigate and optimize the thermal ablation mechanism. The B-FIT system has several different ways to ablate skin. The goal of the heat/ablation step is to remove the stratum corneum with no damage to the viable epidermis. The first set of experiments preferably determines the optimal ablation conditions, for example, temperature peak, pulse duration, number of pulses, among others.

20 Tests to determine the optimum ablation conditions are preferably accomplished using optical and electron microscopy and surface profilometry using an atomic force microscope in order to view and measure (a) depth and volume of ablation hole, and (b) the epidermal cell structural integrity so as to provide sufficient ablation of the stratum corneum without penetrating the
25 viable epidermis.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

To obtain a preclinical evaluation of safety, *in vivo* animal testing of the B-FIT system is preferably undertaken, utilizing, for example, a hairless rat, guinea pig, or fuzzy rat specie. Clinical observations for gross evidence of skin irritation, ulcer formation, and inflammatory reactions are preferably made.

5 Skin biopsies, examined using light and electron microscopy provide a closer examination of the device biophysical effects. Serial clinical and microscopic observations following removal of the device enable assessment of the healing time for the thermal ablation lesions.

Clinical pharmacological testing is preferably undertaken to determine the analytical precision and accuracy of methods to determine glucose levels via transdermal sampling relative to previously validated plasma assays. A preferred assay technology is based on glucose oxidase immobilization in micromachined capillaries. A validated plasma assay for glucose with acceptable limits of detection and quantification and with acceptable intra- and inter-day coefficients of variation is used to compare with these assays in the clinical settings described in the two trials outlined in detail below. The disclosed trials are of identical design: the first in normal volunteers, and the second in patients with Type II (Adult Onset) diabetes mellitus.

10
15
20
25 In order to validate the analytical sensitivity of transdermal sampling to measure glucose, ten healthy men and non-pregnant women who have signed an informed consent, fasted overnight, and have been screened to satisfy the inclusion and exclusion criteria of the study are enrolled in a clinical trial to measure glucose concentrations in their plasma or interstitial fluid before and during a glucose tolerance test. The B-FIT system is attached to the dorsal surface of the right hand using adhesive tape. An 18-gauge intravenous catheter

WO 01/91626

PCT/US01/17081

is inserted in a forearm vein in the left arm. Venous blood samples (approximately 5 cc, and not less than 4 cc) are taken at appropriate intervals for the determination of plasma glucose concentrations. Concentrations of glucose in the plasma are determined by a validated assay, routinely used in clinical settings. These concentrations are compared to those determined in interstitial fluid using the B-FIT system. Plasma concentrations are measured on 8 occasions at 15 minute intervals over two hours, while interstitial fluid concentrations are measured for 0.5, 1, 2, 5, 10 and 15 minute periods over the same 2 hours before the administration of 75 grams of glucose by mouth. These data are used to optimize the sampling time for the B-FIT system. After the administration of glucose, plasma concentrations and B-FIT system-estimated concentrations are measured at 30 minute intervals for a further two hours. In healthy volunteers, the glucose plasma concentrations should range from 80 to 140 mg/dl under these conditions (Washington Manual of Medical Therapeutics, 28th edition., 1995.)

Inclusion criteria for the clinical trial are, as follows: Group 1: men and women who are over the age of 21 years and under the age of 75 years, Group 2: male and female volunteers who are over the age of 21 and under the age of 75, and who carry the diagnosis of adult-onset diabetes by a board-certified endocrinologist. Group 1: taking no prescription medications or natural products. Group 1: showing clinically normal laboratory values for complete blood counts, serum chemistries (Na, K, Cl, HCO₃, BUN, glucose and creatinine) and clinically normal liver enzyme profiles: SGOT, SGPT, alkaline phosphatase and bilirubin; ability to understand and carry out a signed informed consent describing this protocol.

55

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The following subjects are excluded from the trial: subjects who, in the opinion of the investigator, is noncompliant with the protocol requirements; and women who are pregnant.

5 Once a subject has consented to participate in the study, the following procedures are conducted. Screening procedures are conducted within 21 days of study initiation and include: medical history and physical examination; review of inclusion and exclusion criteria; and blood and urine specimen collection. Subsequent to inclusion in the study, subjects undergo the following procedures: (1) subjects arrive at the location of the clinical trial at
10 approximately 9a.m. in the morning after an overnight fast. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded.

The B-FIT system is placed on the dorsal surface of the right hand and attached securely with tape. Recording occurs via a 50 micron cauterized lesion in the skin made by a small needle on the underside of the monitor that is not
15 visible. The monitor is checked to ensure that it is recording. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded once the device has been attached once more. Samples of venous blood (5 cc or one teaspoon) are drawn from a catheter inserted in the a left forearm vein for the measurement of glucose according to the above schedule while the subject is
20 supine. Additional blood samples are drawn four hours and eight hours after the first. The B-FIT system monitor tape and device is removed. Patients are discharged and allowed to return home.

With regard to the blood sampling schedule, five mL venous blood samples are collected in vacutainers in the manner described above. The total
25 number of blood draws during the course of the study including the screening

WO 01/91626

PCT/US01/17081

samples is 14, (12 study draws and 2 screening draws for hematology, chemistry, and liver enzymes, respectively.) The total volume of blood drawn should not exceed 100 mL. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are taken before and after placement of the device and catheter and after the last blood draw has been taken and the device and catheter has been removed. Patients are encouraged to report any notable irritation on the arm where the device is placed. A physician is constantly available to subjects enrolled in the study for concerns related to bruising or infection in the skin due to the intravenous catheter or multiple blood draws. In addition, symptoms of polyuria and polydypsia are carefully noted and paid attention to during the study with diabetic patients, and insulin is available for immediate injection by physicians and nurses should the need arise. Statistical analysis include plasma glucose concentrations determined using the clinical plasma assay as compared with the values obtained using the B-FIT system. If the correlation coefficient is > 0.8 with a significance $p < 0.05$, the measurements are deemed valid.

The second clinical trial with diabetic patients is conducted using an identical study design. Patients are allowed to take oral hypoglycemic medications on the day before, but not on the morning of the study, and are asked not to inject insulin during the study period. Once the study period is over, patients are allowed to eat and to resume their routine diabetic regime. In addition to the safety considerations described above, careful clinical monitoring and the availability of insulin is paid great attention to while these subjects are under study.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The B-FIT system preferably utilizes many different microfabrication technologies and strategies, ranging from simple bulk micromachining to the more complicated deep reactive ion etching (DRIE). Referring back to Figure 5, a cross-section of a preferred one channel system microdevice is shown, preferably comprising of three main components: (1) the main body containing several serpentine capillary channels, each with its own reservoir channel, to sample and analyze physiologically compatible fluid; (2) a bottom capping section to form the lower part of the serpentine structure and to contain micro-heating elements to thermally porate the epidermal layer for substantial physiologically compatible fluid extraction; and (3) a top capping section which forms the upper part of the serpentine channel, and, if necessary, to contain electrodes for assisting the flow of physiologically compatible fluids using electro- osmotic pumping through horizontal segments of the serpentine channel. The first and second components together form the disposable modules of the system. These interchangeable B-FIT elements are inserted into the main connection receptacle after all analysis capillaries have been used.

The reservoir and capillary channels are preferably fabricated in a standard silicon wafer using deep reactive ion etching in order to obtain narrow, high aspect ratio through-wafer holes. The capillary channels are preferably designed to be 25 μm in diameter with a nominal length of 500 μm , while the reservoir channels are 50 μm in diameter, but etched slightly less than 500 μm . The lateral portion of the serpentine capillary channel is preferably formed by recessing the silicon surface by 25 μm . This region also preferably has a highly reflective metal deposited on the surface to facilitate the mechanism for optical detection of the analyte. After bonding the silicon with a top capping section,

58

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

the serpentine structure becomes complete. With these dimensions, physiologically compatible fluids, such as perspiration or interstitial fluids, can be drawn into the open ends of the channels through capillary action.

Furthermore, the fluid within the reservoir is preferably used in conjunction with capillary action, and washes over the dermal region being tested, thereby assisting in the transport of the physiologically compatible fluids through the smaller channel. By activating the internal capillary channel surfaces to sustain a specific antibody immobilization, the fluids can be preferably analyzed by antibody-antigen complexation. A series of such capillaries, each with its own reservoir channel, is contained within a single device element. Each analysis capillary and reservoir pair is preferably addressed individually to expose only one such pair to the skin surface in order to perform a single fluid analysis. Once employed, the open end of the capillary continues to remain exposed to the skin.

The bottom capping unit is also preferably made using silicon and serves two other major functions, aside from the role of forming the lower structure of the serpentine channel. Micromachined heating elements incorporated within this section are preferably used to thermally porate the skin surface, allowing greater availability of interstitial and physiologically compatible fluids within the channels. Simultaneously occurring during the stratum corneum poration procedure, the micro-systems are preferably used to individually address each of the capillary-reservoir pairs. Initially, all open ends of the channels in contact with the skin are covered by a seal that can be "blown" to reveal a single analysis capillary. This cracking procedure can be effectively controlled using large thermal gradients in close proximity to the seal, such as those afforded by

WO 01/91626

PCT/US01/17081

silicon micro-resistors. The micro-heaters are preferably integrated in the silicon region surrounding each of the capillary-reservoir channels. The connecting micro-capillaries in this section are preferably formed using DRIE, each being aligned with the vertical micro-capillaries from the main body.

5 Unlike the two previous components, the top capping layer is preferably made out of plastic and used to accomplish several tasks. Firstly, it completes the upper structure, or lateral portion, of the serpentine channel. This area, preferably, is the detection region of our microsystem. Secondly, by using plastic, an imbedded waveguide can preferably be fabricated within the
10 material, with its orientation running parallel to the silicon surface and forming the basis of the integrated photonics analysis system. In addition, to couple the light from the waveguide into the detection region, a micro-mirror is preferably integrated within the plastic. In addition, for more effective light coupling and better efficiency, a micro-lens is preferably integrated within the plastic located
15 directly above the detection region. The micro-mirror is preferably integrated as a pressed component within this top section by using a triangular form to indent the plastic. The resulting indentation preferably has a 45° angle with respect to the surface. Deposition of a highly reflective material is made on the resulting beveled angle to render a micro-mirror that reflects the horizontally-directed
20 light from the waveguide downward. The integrated microlenses can also be stamped directly into the plastic or can be incorporated as separate units placed within the plastic by using injection molding. In either case, the lens does not need to be of high quality, but should simply be able to diverge light originating from the waveguide. The illumination produced by the light from the waveguide
25 will cause the tagged analytes to fluoresce. The light produced is then reflected

60

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

from the bottom surface of the detection region back through the now converging lens.

Returning to Figure 6, the three possible (controllable) states of the individual microcapillary systems are shown. The leftmost micro-capillary system (# 1) shows an exhausted capillary pair that has already been used for an analysis procedure. This first pair shows the completed thermal ablation, microfluid flow and capture of glucose from exposed interstitial fluid, encounter with the glucose detection patch, and bluish color reaction evident at the upper surface of the chip. The middle micro-capillary system (#2) is performing an on-demand analysis. The rightmost capillary system is ready for a future, on-demand analysis.

A purpose of the microdevice is to facilitate the transfer of molecules of glucose or other poorly permeable analyte(s) from interstitial fluid in the viable epidermis, located just beneath the inner surface of the stratum corneum, to the detection patch situated on top of the microdevice. The microdevice enables contact of the microfluidic sampling fluid directly with interstitial fluid by thermal micro-ablation of the stratum corneum. By direct interface with interstitial fluid, the microdevice enables sampling of, not only the normally-inaccessible polar molecules, but also impermeable larger molecules such as proteins.

The first in a preferred programmed sequence of events is the flow of electrical current through the reservoir heating element to create a minute hydraulic pressure in the sealed reservoir containing physiologically compatible fluid. The second and third steps occur almost in unison, and comprise two separate currents through both the breakable seal and the micro-ablation heater.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The seal preferably is a metal-dielectric bilayer that ruptures at elevated temperatures. The metal seal is preferably surface deposited on a low-stress silicon dielectric element to reduce the chances of compromising the seal integrity prior to its operation. Once the seal is broken during an analysis procedure, the physiologically compatible fluid preferably flows down from the reservoir and across the region that has been thermally ablated by the micro-heater. During the time the seal is being ruptured, the micro-ablation heater is preferably being pulsed with alternating current to thermally remove successive layers of the stratum corneum, which is typically about 30-60 μm in thickness. The micro-ablation preferably occurs in a highly confined volume of the stratum corneum, approximately 50 μm x 50 μm x 30 μm . The physiologically compatible fluid from the now-open reservoir interfaces with the interstitial fluid and, due to the dual actions of the reservoir heater and capillary force, the mixture is transported towards the detection patch. The bulk of the physiological sampling fluid is preferably forced out of the reservoir, emptying over the skin surface region and into the absorbent detection patch. In addition, a strong, Band-Aid-like adhesive film preferably keeps the microdevice in fluid-tight contact with the skin, preventing escape of interstitial and physiologically compatible fluids from the analysis region. The fluids are preferably forced up the analysis capillary to the detection patch, directly above the capillaries on the microdevice and, for example, in one embodiment, generate a color change to indicate the presence of glucose.

The microsystem component of the present invention is preferably based on molecular scale manipulation using enhanced transdermal transfer of metabolites from interstitial fluids, and resultant detection with enzyme

WO 01/91626

PCT/US01/17081

immobilized chemistries. Samples are preferably collected using a minimally non-invasive transdermal microdevice and trace quantities of analytes, which reach the skin surface by passive diffusion from interstitial fluid underlying the outermost layer of skin (the stratum corneum) can be detected. Since these
5 analytes originate from other parts of the body, transported to the interstitial fluid via blood circulation, they reflect a variety of physiological processes including body exposure to environmental chemicals or microbes, as well as internal metabolism. Micro-layers of the stratum corneum are gently removed enabling uptake of interstitial fluid from the viable epidermis, which lies just
10 beneath the stratum corneum.

A preferred detection scheme for determination of health and other important biological markers utilizes similar surface and biochemistry for each assay. Returning to Figure 8, a preferred procedure for the detection scheme is shown. A preferred procedure is to covalently attach antibodies of the protein or
15 metabolite of interest to a capillary wall that incorporates a fluorescently tagged antigen. The tagged antigen is replaced by competitive binding with the protein or metabolite of interest from the interstitial fluid sampled. The fluorescent antigen is kicked off into solution to be detected down stream in the collecting chamber by the photonics component. The fluorophore excitation and emission
20 characteristics are matched to the photonics and, *visa versa* for integrating the right wavelength source, detector and filters to properly excite and determine emission in the photonics module.

As an example, the following three proteins of various molecular weights can be used for monitoring health properties: troponin I, C-reactive
25 protein, and prealbumin. Anti-troponin I is covalently attached to the capillary

63

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

wall following a silane surface treatment of aminopropyltrimethoxysilane (APTS). Troponin I is fluorescently tagged using either fluorescein or rhodamine and bound to the antibody attached in the capillary. Using competitive binding of troponin I from sampling, the fluorescently tagged troponin I is replaced into solution and detected downstream. The above procedure can also be used for both C-reactive protein and prealbumin, albeit modified to take into account differences between these proteins.

The surface chemistry is characterized stepwise to ensure sufficient surface coating. The amount of bound antibody and competitive binding studies is tested using a variety of different instruments such as XPS, fluorescent plate reader, fluorescent microscope, or separation techniques.

In another example, polyclonal antibodies raised against the caffeine metabolites 5-acetylamino-6-formyl-3-methyl urea (AFMU) and 1-methylxanthine (IX) are immobilized on the micromachined capillaries. The capillary tubes are modified by chemical treatment in order to introduce hydroxyl moieties on the capillary surface. The surface hydroxyl groups are then reacted with APTS, producing a molecular tether with free amine moieties at the end of the three-carbon chain.

The sugar residues in the Fc region of the antibodies raised against AFMU and IX are oxidized using periodate to generate aldehydes. The antibodies are anchored to surface of the micromachined capillaries through Schiff base formation between the aldehydes on the antibodies and the amines on the molecular tether. In this manner, the antibody binding regions is directed away from the surface of the micromachined channels.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The amount of antibody immobilization on the surface of the microchannel is preferably determined by analysis of the protein content of the binding solution before and after exposure to the microchannels. The binding activity of the immobilized antibodies is determined using displacement of the fluorescent-labeled AFMU and 1X probes and the observed activity is compared to the activity of equivalent concentrations of non-immobilized antibodies to yield binding affinity per mg of immobilized antibody indices (BAI).

For the caffeine metabolites, in vivo and in vitro testing is conducted to assess the specificity of the antibodies AFMU and 1X. The ability to measure the ratio of these metabolites using the device of the present invention is assessed by comparing the ratio obtained using the portable biomedical monitoring system with the ratio obtained employing conventional HPLC methods. Devices modified with this assay are tested both in vivo and in vitro for provide a preclinical evaluation. These data are utilized as a baseline and preliminary data for testing the algorithm.

Antibodies for prealbumin, CRP, troponin I are currently available on the market and are used to assess the specificity of these antibodies to their protein compliment. As some commercial antibodies are not active or specific, this prescreening test is preferred to determine activity and specificity for each protein of interest. Specificity is preferably tested for each antibody by adding other substances similar in structure, which should not cross-react. For example, in assessing prealbumin the proteins such as albumin and globulins, among others, are added. In assessing caffeine metabolites, xanthines and xanthine metabolites are added. Assays using the antibody, the ligand and the

65

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

fluorescently labeled ligand are preferably developed using techniques such as flow injection analysis (FIA).

Each completed assay is assessed for accuracy, reproducibility, linearity, and results are compared with those of existing procedures currently used in the clinical laboratory. A preclinical evaluation for in vivo and in vitro testing is done and the data is utilized in the algorithm developed.

The portable biomedical monitoring system of the present invention is preferably based on molecular scale manipulation using enhanced transdermal transfer of metabolites and other body analytes using transdermal dosimetry immobilized antibodies in microchannels, capillary action for fluidic mobility, and integrated photonics for detection. Thus, the micro-fluidic chip interface technologies of the present invention provide controlled sample collection from host fluids, (circulatory and noncirculatory) and for the controlled delivery of fluids (drugs, chemicals) and target probes (antibodies, proteins, signal molecules). In addition, sample collection platforms of the present invention can simultaneously employ an "outward facing" device component for sampling air or liquid borne environmental target analytes and an "inward facing" component for detection of target analytes emanating from the skin surface or accessible body fluid.

The apparatus and process of portable biomedical monitoring disclosed herein is adaptable to a wide variety of chemistries. For example, the portable biomedical monitoring device can include chips which monitor health (Chip "A") and illness or infection (Chip "B"). Chip A can measure molecules like glucose to establish a baseline of the subject's health state in both normal and high stress situations. Changes from these baseline limits will signal a need for

66

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Chip B. Chip B is designed to determine the exact cause of illness. For example, Chip B can contain antibody conjugates for parathion and its metabolites that emulate a chemical warfare agent. The structure of the microsystem is adaptable for many other types of chemistries based upon drug metabolism and/or "probe
5 drugs".

Drug metabolism is the process by which drugs are converted, by enzyme-catalyzed reactions, to products or metabolites which are readily excreted in the urine and bile. One pathway of drug metabolism are phase I reactions, which involve the creation or modification of a functional group in
10 the substrate molecule. The cytochrome P450 -dependent (CYP) microsomal mixed function oxidase system is a very important enzyme system for these reactions. A second major pathway involves phase II reactions, in which the drug or a phase I metabolite is conjugated with a water soluble endogenous substrate. Phase II reactions involve a diverse group of enzymes known
15 collectively as transferases. This group includes UDP-glucuronyltransferase, UDPglycosyltransferase, glutathione-S-transferase, sulphotransferase, methyltransferase, and N-acetyltransferase.

Drug metabolism is affected by dietary and environmental factors. For example, alcohol, certain food constituents and compounds in cigarette smoke
20 have been observed to affect the biotransformation of many drugs, as have industrial pollutants and pesticides. Genetic factors also play an important part in the control of drug metabolism and it has been observed that there is much variation in drug effects between individuals. For some enzymes, discrete genetic subgroups are present in the human population. These genetic
25 polymorphisms are generated by mutations in the genes coding for these

WO 01/91626

PCT/US01/17081

enzymes which cause decreased, increased or absent enzyme expression or activity. Genetic polymorphisms of several CYPs have been identified and their activity falls into two clearly defined and qualitatively different populations: individuals whose rate and extent of metabolism is poor (poor metabolizers, PMs) and those who have faster or more extensive metabolism (extensive metabolizers, EMs). Genetic polymorphisms of some phase II enzymes also exist. For example, N-acetyltransferase-2 (NAT-2) is affected in this way and this acetylation polymorphism relates to the metabolism of a variety of drugs and carcinogens. Numerous alleles are associated with decreased function of this enzyme and a bimodal distribution is observed: 50-60 % of individuals are genotypically slow acetylators and the rest of the population are fast.

In healthy individuals, the metabolic genotype normally predicts the metabolic phenotype. That is, for a particular enzyme, genotypically extensive metabolizers are observed to efficiently metabolize drugs that are substrates for that enzyme, and genotypically poor metabolizers are deficient in that process. However, drug interactions, infection, disease progression and malnutrition may produce changes in the relative levels and activities of metabolizing enzymes. Thus, in healthy individuals the relationship between genotype and its expression (phenotype) is conserved; i.e. FAST genotypes produce FAST phenotypes, while SLOW genotypes produce SLOW phenotypes. However, a disease state of the individual can alter this relationship, as can diet, smoking, alcohol, environmental chemicals, and biological or chemical warfare agents. For this reason, the determination of metabolic phenotype (the measure of actual enzyme activity) is of great importance and can be used as a direct and sensitive probe of health and clinical status. In a preferred embodiment,

68

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

identification and quantification of specific metabolite patterns produced by innocuous test compounds or probe drugs can be utilized to determine the metabolic phenotype of a subject. For example, caffeine is metabolized by several routes including one involving NAT-2. Thus the urinary ratio of 2
5 metabolites, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU) to 1-methylxanthine (IX) is an index of NAT-2 activity.

Examples of numerous embodiments follow. Each embodiment can be practiced alone or in conjunction with other embodiments of the invention.

For example, as mentioned above, dispositional or metabolic markers of
10 "stress" can be monitored, including but not limited to, chemistries for the detection of different chemical probes of human health, such as glucose, caffeine, ethanol, and dextromethorphan. "Stress" can manifest itself via detectable alterations of many internal metabolic pathways, such as in altered insulin-glucose patterns or aberrant hepatic catabolism of safe, commonly used
15 stimulants (caffeine) or antihistamines (dextromethorphan).

The enzyme N-acetyl transferase (NAT-2) metabolizes caffeine. This enzyme is highly polymorphic. The activity of NAT-2 is known to be associated with adverse drug effects, diverse toxicities and predisposition to disease. Two major metabolic phenotypes have been identified: fast and slow N-acetylators.
20 The expressed activity of NAT-2 (phenotype) has been shown to be affected by acute and chronic disease states. For example, in HIV+ and AIDS patients, the presence of an acute illness reduces the expressed activity of NAT-2, changing a patient with a fast NAT-2 phenotype into one with a slow NAT-2 phenotype. When the illness is resolved and the patient is returned to the initial clinical
25 state, the patient again expresses a fast NAT-2 phenotype. Thus, the

WO 01/91626

PCT/US01/17081

determination of an individual's NAT-2 phenotype and the monitoring of changes in this phenotype can be a direct and sensitive probe of that individual's health and clinical status. This determination allows prediction of whether patients are FAST or SLOW metabolizers prior to initiating drug regimens. This approach also allows for the screening of all patients before drug treatment is initiated so that appropriate dosage regimens are given at the outset of treatment and drug overtreatment or undertreatment is avoided.

The NAT-2 phenotype can be determined by a number of probes. In the preferred embodiment, caffeine is used because of its wide distribution and relative safety. In studies using caffeine as the probe, the phenotype of the enzyme is determined by the ratio of two caffeine metabolites: AFMU to 1 X. Based on the ratio of these metabolites, the activity of the enzyme can be determined. Polyclonal antibodies are grown against the metabolites AFMU and 1X and then purified. These antibodies are successfully used to determine NAT-2 phenotypes.

The preferred detection scheme consists of the anchoring of antibodies of a particular metabolite or chemical antigen to the surface of the capillary. The antibody is bound to a special antigen attached to a fluorescent tag such as rhodamine. As the antigen flows into the channel it will release the fluorescent tag which is detected downstream.

Thus, in an alternative embodiment, phenotyping using NAT-2 is conducted to indicate an infected or diseased state. The enzyme NAT-2 is highly polymorphic. The activity of NAT-2 has been associated with adverse drug effects, diverse toxicities and predisposition of disease. The monitoring of

WO 01/91626

PCT/US01/17081

changes in this phenotype is a direct and sensitive probe of the soldier's health and infection status.

In a further embodiment, organophosphate chemicals (nerve) agents are monitored using the insecticide surrogate model compound parathion. Since "nerve gas" type chemical weapons like Tabun, Sarin, and Soman act by inhibition of acetylcholinesterase, the organophosphate insecticide, parathion (or its metabolites) provides an excellent "surrogate" analyte to detect exposure. A parathion monitor, thus, has important industrial and civilian applications.

In a further embodiment, inflammatory sequeli to microbial toxins are monitored, including, for example, interleukin-1 (IL 1); interleukin-6 (IL 6); and tumor necrosis factor (TNF); among others. Circulating IL 1, IL6, and TNF present candidate analytes that can be collected and detected using permeation enhanced transdermal techniques and advanced detection system designs in accordance with the present invention.

In a further embodiment, microbial toxins are monitored, including, for example, anthrax, botulinum toxin, endotoxin, among others. Although microbial toxins are typically large molecules, their extremely high biological potency, coupled with enhanced outward migration using microscopic physical barrier modification techniques (for example, thermal microablation) can permit transdermal dosimetry employing detection systems incorporating toxin responsive components. In addition, antibody tags can be used for identification of infecting agents and determination of bacterial and viral loads. Moreover, the determination of D- amino acids (from bacterial sources) can enable the monitoring of the response to antibiotic therapy.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

In a further embodiment, spore metabolites can be monitored.

Circulating biochemical metabolites arising from human catabolism via lymphatic and hepatic pathways of microbial spores are collected and detected using the techniques and optimized detection system designs of the present invention.

In a further embodiment, specific proteins are monitored, such as those referred to in the table below.

Protein	Concentration (mg/L)	Mol. Wt. (kD)
Prealbumin	70-390	54
C-reactive Protein	0.06-8.2	115-140
Troponin I	< 0.0001	76

Prealbumin (MW 54,000) is known as being an important marker for nutritional status. The reference range for 0-1 month old is 70-390 mg/L. Uses of this embodiment include but are not limited to screening inner city pediatric populations for nutritional status, as well as screening all patients for nutritional status, particularly prior to surgery.

C-reactive protein (MW 115,000-140,000) is an acute phase reactant and as such is elevated in many disease processes. The reference range in adults is 68-8200 µg/L. The measurement of this protein provides a good indication of health vs. disease. C-reactive protein is also an important prognosticator of heart disease and impending myocardial infarction. Thus, this assay could also be used to screen for cardiovascular health.

Troponin I is recognized as a useful and specific marker for acute myocardial infarction. The reference range in adults is < 0.1 µg/L. In myocardial infarction patients it is > 0.8 µg/L. This assay provides a real time

WO 01/91626

PCT/US01/17081

evaluation of troponin I in the emergency rooms of hospitals and provide the earliest recognition that a patient needs to be admitted to intensive care units.

In addition to monitoring, the biomedical monitoring system of the present invention can provide drug delivery with feedback control in bursts to maintain concentrations of a specific agent within the body at specific levels throughout the day, levels which can vary on a day to day basis and during the day. Examples of such agents include the hormones estrogen and testosterone. The decrease that occurs in estrogen with age is intimately related to the increased risk of osteoporosis and cardiovascular disease in women. Moreover, the replacement with pharmacologic estrogen may improve mortality from cardiovascular disease, reduce the risk of osteoporotic fractures and may play an important role in protecting women against Alzheimer's disease. These diseases have immense societal impact and financial cost, but their treatment with replacement estrogen is associated with a host of side effects including, not least the development of breast cancer and uterine cancer, but also a host of other effects including skin changes, weight changes and depression. Although no medicine has been shown to be as effective as estrogen itself, a huge effort has been expended to develop modified estrogens that have selective actions on bone, breast or other tissues (the development of specific estrogen receptor modulators or SERMs). The approach of administering effective estrogen in a physiologic, controlled and monitored manner is attractive in that it remains the most effective medication and innovative therapeutic regimens utilizing it may prove of great benefit.

The delivery of testosterone in a controlled and monitored manner can also be useful. Serum concentrations of testosterone also decline with age, as

WO 01/91626

PCT/US01/17081

they do in a number of pathological conditions, including HIV, testosterone replacement strategies for the treatment of HIV and cancer wasting, male osteoporosis and chronic obstructive pulmonary disease are emerging and can also be useful for short term controlled administration post-operatively after major surgery to enhance the rate and the likelihood of successful recovery. Feasibility of these embodiments is investigated through transdermal detection of estradiol (E2) in Rhesus monkeys and human females. A prototype solid phase E2 detection system (TED) can be incorporated in a transdermal patch that immobilizes antibody against E2 in the TED, and analyzed ex-situ using a radioimmunoassay procedure. The E2 detection system is capable of detection less than 0.125 picograms. TEDs are first tested by emplacement for 24 hours on the chests of partially or fully castrated female Rhesus monkeys (n=3), treated with placebo or 20 ug/kg estradiol benzoate. The TED measurements distinguish between monkeys that have high circulating E2 concentrations and those who have none. TEDs can also be affixed on the forearms of four reproductive age human females who exhibit a large range of circulating E2 concentrations (48-382 pg/ml). E2 collected in TEDs range from 0.06 to 0.5 pg, and correlate roughly with circulating E2 concentrations. These data are consistent with an in vivo permeability coefficient of $4.3 \pm 0.5 \times 10^5$ cm/hr.

In a further embodiment, the portable biomedical monitoring device of the present invention can be used for pain management, determining how best to deliver codeine and morphine, among others, to minimize cytotoxicity, while achieving pain control.

In a further embodiment of the present invention, a MEMS-based physiochip can be used to non-invasively monitor fundamental physiological

WO 01/91626

PCT/US01/17081

aspects related to human function under typical and atypical environmental conditions. By carefully monitoring of relevant physiological data such as body temperature, pulse rate, blood pressure, and heart activity (electrocardiogram) an infinitesimal change or anomalous behavior can provide an early indicator of stress to the human system.

In a further embodiment, passive or non-invasive transdermal dosimetry is used without physical or chemical modification of the normal skin barrier. This embodiment is practical for small molecular weight analytes that exhibit both lipid and water solubilities.

The following description of experiments and clinical trials is provided so as to demonstrate how various embodiments of the present invention perform. Suitable analytes for demonstrating the operation of these embodiments of the present invention are provided below. However, it is to be recognized that the systems and methods of the present invention contemplate analysis of a much larger set of analytes in the various embodiments of the present invention.

Development of immobilized nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) based-HPLC stationary phases and the application of these phases to the on-line determination of drug-receptor interactions.

Preparation of nAChR-detergent solution. Rat whole forebrain or transfected cells are suspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, (buffer A), homogenized for 30 seconds with Brinkmann Polytron, and centrifuged at 40,000 x g for 10 min at 4° C. The pellet is resuspended in 6 ml of 2% deoxycholate or 2% cholate in buffer A and stirred for 2 hours. The mixture is centrifuged at 35,000 x g for 30 minutes, and the supernatant containing nAChR-deoxycholate solution is collected.

75

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Immobilization of nAChRs on MMparticles or Superdex 200 gel beads.

Dried IAM particles are suspended in 4 ml of the obtained detergent solutions containing nAChR subunits or subtypes. For the immobilization of one nAChR subtype, the mixture of IAM-detergent-receptor is stirred for 1 hour at room temperature. The suspension is dialyzed against 2 x 1 L buffer A for 24 hours at 4 °C. The IAM IC support with immobilized nAChRs is then washed with buffer A, centrifuged and the solid collected.

A dried lipid mixture of 60 mg L- α -Lecitin (20% phosphatidylcholine), 10 mg L- α -phosphatidylserine, and 20 mg cholesterol is solubilized with 4 ml of obtained nAChR-detergent solution. The nAChR-lipid-cholesterol solution is mixed with 50 mg dry Superdex 200 beads. The suspension is dialyzed against buffer A for 24 hours at 4 °C. Non-immobilized liposomes are removed by centrifugal washing with buffer A at 2,000 x g.

[³H]-epibatidine ([³H]-EB) binding assays for the suspensions of nAChR-IAM particles and nAChR-Superdex 200 beads: The nAChR-IAM particles, IAM particles, nAChR-Superdex 200 gel beads and Superdex 200 gel beads, corresponding to 30 mg dry material, are each suspended in 1.25 ml buffer A. A 250 μ l aliquot of each suspension is incubated with 250 μ l of [³H]-EB [1.5 nM] for 4h at 24 °C in a final volume of 2.5 ml.

Experiments are carried out with and without added 100 μ l of 300 μ M (-)-nicotine. Bound and free ligands are separated by vacuum filtration through Whatman GF/C filters treated with 0.5% polyethylenimine. The filter-retained radioactivity is determined by liquid scintillation counting. Specific binding is defined as the difference between total binding and nonspecific binding. The

WO 01/91626

PCT/US01/17081

amount of protein is determined using BCA reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) measured at 570 nm.

Chromatography based on nAChR-LAMcolumn or nAChR-liposome-Superdex 200 column: The nAChR-IAM particles or nAChR-Superdex gel beads are packed in a HR5/2 glass column and connected to a HPLC pump. [³H]-EB is used as a marker and an on-line flow scintillation detector (525 TR) monitors the elution profile. All chromatographic experiments are performed at flow rate 0.4 ml/min at room temperature.

In zonal chromatographic experiments, a 100 µl-loop is used to apply the sample. The chromatographic data is summed up in 0.5-min intervals and smoothed using the Microsoft Excel program with a 5 point moving average.

In frontal chromatogram 50-ml sample superloop are used to apply a series of [³H]-EB concentration through the nAChR-column to obtain elution profiles showing a front and plateau regions. The chromatographic data is summed up in 1-min intervals and smoothed using the Microsoft Excel program with a 10 point moving average.

Results: Immobilization of nAChR subunits or subtypes. About 63 mg protein isolated from the membrane of transfected cells and 14 mg of protein prepared from the brain tissues are respectively immobilized on the per gram of IAM particles or Superdex 200 gel beads. Receptor binding assays using [³H]-EB showed that the nAChR binding activities are retained after the immobilization procedure as shown in the table below. In parallel experiments, no specific binding of [³H]-EB is detected on IAM particles and Superdex 200 gel beads.

25

77

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Sample	Specific Binding (%)	nAChR Density (nmol/g protein)
$\alpha 4/\beta 2$ nAChR-detergent solution	62	0.14
$\alpha 4/\beta 2$ nAChR-IAM ¹	49	0.81
5 $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-detergent solution ²	100	8.57
$\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM2	97.8	5.09
$\alpha 3/\beta 4$ nAChR-liposome Superdex 200 ²	29.4	1.45

¹ prepared from rat forebrain with detergent deoxycholate.

10 ² prepared from transfected cells with detergent cholate.

Frontal chromatography with $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM stationary phase: The

retention volumes of [³H]-EB are 23 ml at the concentration of 60 pM. This retardation is primarily due to the specific binding to saturable sites of the receptors as indicated by a decrease in retention volume to 8 ml when the concentration of [³H]-EB is increased to 450 pM (Figure X, profile B). The binding of [³H]-EB to the $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM stationary phase could be reduced in competitive displacement experiments using known $\alpha 3/\beta 4$ nAChR ligands in the mobile phase. For example, the retention volume of 60 pM [³H]-EB decreased from 23 ml to 18 ml when a 60 nM concentration of the nAChR-ligand (-)-nicotine is added to the mobile phase and fell to 0.9 ml when the (-)-nicotine concentration is increased to 1000 nM. The decreases in retention volumes of [³H]-EB relative to mobile phase concentrations of a displacer reflect the binding affinity of the displacer for the receptor. Using this technique, the relative affinities of nicotinic drugs for the $\alpha 3/\beta 4$ nAChR are readily classified by determining the concentrations required to decrease the retention volumes of [³H]-EB to a predetermined level.

To decrease the retention volumes of 60 pM [³H]-EB from 9.5 ml to 6 ml on an $\alpha 3/\beta 4$ nAChR column (0.5 x 1.25 cm), requires mobile phase concentrations of 0.12 nM of (\pm)-EB, 1.7 nM of A85380, 45 nM of (-)-nicotine,

WO 01/91626

PCT/US01/17081

1,200 nM of carbachol or 21,000 nM of atropine, respectively. The relative affinities of these drugs for the $\alpha 3/\beta 4$ nAChR determined by this method are therefore (\pm) -EB > A85380 > (-)-nicotine > carbachol > atropine which is consistent with results from ligand binding assays using membrane homogenates. The relative affinities can be classified by the association constants calculated from the resulting data in the table below.

Ligand	K_d^1 (nM)	K_d^2 (nM)
(\pm)-Epibatidine	0.27 ± 0.05	0.38 ± 0.07
A85380	17.2 ± 0.5	73.6 ± 6.3
(-)-Nicotine	88 ± 33	475 ± 52
Carbachol	$1,280 \pm 30$	$3,839 \pm 276$
Atropine	$14,570 \pm 2600$	-

¹ Frontal chromatography with $\alpha 3/\beta 4$ -IAM stationary phase (0.5 x 1.3 cm).
² Binding assay using cell membrane homogenates.

These dissociation constants (K_d) values show the same rank order as those of the values measured with binding assays using membrane homogenates. The low affinity of atropine (K_d : 17,200 nM) is also consistent with literature values.

Zonal chromatography for determination of different specific binding activities of immobilized nAChRs subtypes: Binding of [³H]-EB is also measured in zonal format on the columns containing $\alpha 3$ subunits only, $\beta 4$ subunits only, a mixture of the two cell types, or $\alpha 3/\beta 4$ nAChRs. The retention of [³H]-EB on $\alpha 3$ nAChR-IAM (peak 1, Figure 23a), $\beta 4$ nAChR-IAM (peak 2, Figure 23A) and $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM (peak 3, Figure 23A) is low, and no significant change in the retention volumes is observed when a displacer, (-)-nicotine, is included in the mobile phase, [³H]-EB is retained on the IAM column containing the immobilized $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM (peak 4, Figure 23A).

WO 01/91626

PCT/US01/17081

The retention volume is decreased when the concentration of [³H]-EB is increased or when (-)-nicotine is included in the mobile phase, peak 4 (dash line) Figure 23B.

5 Specific binding activities of immobilized nAChRs subtypes. The results of binding to immobilized receptors showed that [³H]-EB and (-)-nicotine have higher binding affinities at nAChR $\alpha 4/\beta 2$ subtype than at $\alpha 3/\beta 4$ -subtype and these results are consistent with the results determined from ligand binding assays using membrane homogenates as shown in the table below. The K_d values obtained from $\alpha 4/\beta 2$ nAChR-liposome-Superdex 200 column are similar
10 as those determined using $\alpha 4/\beta 2$ nAChR-IAM column.

Formats of nAChRs (nM)	K_d of (\pm)-epibatidine (nM)	K_d of (-)-nicotine
15 $\alpha 3/\beta 4$ - nAChR-IAM	0.27 \pm 0.05	88 \pm 33
$\alpha 3/\beta 4$ - nAChR membrane	0.38 \pm 0.07	475 \pm 52
$\alpha 4/\beta 2$ -nAChR-IAMB	0.044 \pm 0.005	1.0 \pm 2.3
$\alpha 4/\beta 2$ -nAChR membrane	0.053 \pm 0.002	7.2 \pm 1.3
$\alpha 4/\beta 2$ -nAChR-liposome-Superdex 200	0.020 \pm 0.08	7.4 \pm 2

20 Effects of ionic strength and pH of the mobile phase on the binding of [³H]-EB: The effect of mobile phase ionic strength and pH on the binding affinities of [³H]-EB are determined with a $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-column. The retention volumes increased when the pH of mobile phase is increased from pH 4.0 to pH 7.0 and remained constant between pH 7.0 to 9.5. The retention volumes of
25 [³H]-EB are higher at low ionic strength (5-mM ammonium acetate) and decrease as the ionic concentration of the mobile phase increases.

Stability and reproducibility of nAChR columns: One $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM column is used continuously over a ten day period and then stored for 40 days at 4 °C. The retention volumes for 60 pM [³H]-EB are 9.5 \pm 0.05 ml

WO 01/91626

PCT/US01/17081

(from day 1 to day 10) and 9.7 ± 0.08 ml (day 50). The relative affinities of EB and (-) nicotine obtained on three $\alpha 3/\beta 4$ nAChR-IAM columns prepared from different batch of cell lines are reproducible as shown in the table below, although the retention volumes of EB at the same concentration differed from

5

Column size (cm)	K_d of EB (nM)	K_d of (-)-Nicotine (nM)	Binding sites (pmol/ml bed)
0.5x1.8	0.34 ± 0.04	52 ± 10	7.5 ± 0.2
0.5x1.3	0.27 ± 0.05	88 ± 33	13.5 ± 0.3
0.5 x 1.7	0.21 ± 0.06	130 ± 45	15.0 ± 0.4

10

Preparation of Immobilized GABAA and nicotinic acetylcholine

receptors on an IAM support from rat whole brain: Rat whole brain (4 brains) is homogenized in 30 ml of TRIS-HCl buffer [50 mM, pH 7.4] containing 5 mM EDTA, 3 mM benzamidine and 0.2 mM PMSF (Phenyl methyl sulfonyl chloride) for 3 x 20 seconds using a Brinkman Polytron at setting 6. The mixture is kept in an ice bath for 20 seconds between each homogenization step to prevent excessive heating of the tissue. Homogenized brain tissue is centrifuged for 10 min/4 °C at 21,000 rpm. Supernatant is removed using a Pasteur pipette and discarded. The pellets are suspended in 10 ml of Solubilization Buffer containing 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 3 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl, 2 % Na-cholate and 10 $\mu g/ml$ Leupeptin in TRIS-HCl buffer [50 mM, pH 7.4]. The resulting mixture is stirred for 12h/4 °C and centrifuged at 21,000 rpm.

15

20

25

Supernatant (receptor-cholate suspension) is mixed with 200 mg of dried IAM-PC packing material and stirred gently for 1 h/25 °C, transferred into dialysis tubing and dialyzed for 48 h/4 °C against 3 x 600 ml of Dialysis Buffer

WO 01/91626

PCT/US01/17081

containing 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM PMSF in TRIS-HCl buffer [50 mM, pH 7.4].

The receptor-IAM-PC is centrifuged for 3 min/4 °C at 2,000 rpm.

Supernatant is discarded. Pellets are washed with TRIS-HCl buffer [50 mM, pH 7.4] and centrifuged until the supernatant is clear. The resulting pellets are used to pack the column.

Determination of binding affinities to the immobilized GABAA receptor (GR) using frontal chromatography. The GR-IAM particles are packed in a HR5/2 glass column and connected to a HPLC pump. [³H]-Flunitrazepam ([³H]-FTZ), a GABAA receptor ligand, is used as a marker and an on-line flow scintillation detector (525 TR) monitored the elution profile. All chromatographic experiments are performed at flow rate 0.4 ml/min at room temperature. In frontal chromatography, a 50-ml sample superloop is used to apply a series of [³H]-FTZ concentrations through the GR-column to obtain elution profiles showing a front and plateau regions. The chromatographic data is summed up in 1-min intervals and smoothed using the Microsoft Excel program with a 10 point moving average.

When the GABAA receptor ligand diazepam (DAZ) is added to the mobile phase, the retention volume of [³H]-FTZ is reduced in proportion to the concentration of DAZ in the mobile phase. These results indicate that the retention of FTZ on the GR-IAM is due to specific interactions with the immobilized GABAA receptor. The dissociation constants (K_d) of FTZ and DAZ are determined on the GR-IAM. The calculated K_d of FTZ and DAZ obtained by frontal chromatography are consistent with those determined by classical binding assays, as shown in the table below.

82

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Ligand	Frontal Chromatography	Binding Assays
Flunitrazepam	1.3	1.7
Diazepam	1.0	1.3

5

Production and purification of the ER-LBD. The Estrogen Receptor (ER) is part of the Nuclear Receptor Superfamily. It is made up of five different regions: A, B, C, D and E. The E region, also known as, the ligand binding domain (LBD) is where the agonists and antagonists bind. The ER-LBD has been expressed in yeast and also in bacteria via a fusion product between protein A and the LBD. The Production of recombinant Estrogen Receptor Protein is described: The DNA sequence coding for the ligand binding domain of the human estrogen receptor a protein (amino acids 302-595) is obtained by PCR using the full length cDNA as the template. The product of the PCR reaction is subcloned into the pRSET plasmid in frame with a 6 histidine tag on the N-terminal end of the protein. The His tag is used for the purification of the protein from the bacterial proteins. The plasmid is transformed into the BL21 codon+ bacteria. The bacteria are grown in standard LB Broth to an optical density at X = 600 of ~ 1.5.

10

The bacteria are harvested by centrifugation and frozen at -80°C until further purification. The bacteria pellets are lysed in a urea/HEPES lysis buffer by sonication and clarified by centrifugation and filtration. The lysate is loaded onto a 5 ml Ni-NTA nickel affinity column that is preequilibrated with the urea/HEPES lysis buffer. The Ni-NTA column selectively binds proteins with the 6-His tag. The nontagged proteins are washed off the column with the urea/HEPES buffer. The estrogen receptor is refolded on the column by gradually changing the buffer to a PBS (phosphate buffered saline) buffer.

15

20

83

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Finally, the estrogen receptor protein is eluted with a PBS buffer containing imidazole, which competes with the His tag for binding to the Ni-NTA column. The fractions containing the estrogen receptor protein are determined by gel electrophoresis and staining with Gelcode Blue and by western blot analysis using an antibody against the human estrogen receptor. The concentration of protein purified is determined via bicinchoninic acid (BAC) protein assay.

Binding activity of the ER-LBD. A binding assay is carried out to determine the activity of the fusion protein. The classical method using dextran-coated charcoal is initially used and gives the activity of the protein.

However, the method is improved with the use of Nickel-NTA agarose beads to isolate the fusion protein. Roughly 200 pmoles of protein is placed per tube. For total binding, varying concentrations of [³H]-estradiol is added and for nonspecific binding a 200 fold excess of the cold estradiol is added prior to the addition of the radiolabeled estradiol. The solutions are incubated at room temperature for 2 hours. Following incubation, the Nickel-NTA is added. After one wash, the protein is displaced with imidazole. The K_d is determined to be approximately 3.4 nM (an average K_d of several experiments). Although estradiol had a slightly stronger affinity for the native ER (0.2 nM), this is sufficient.

Immobilization of the ER-LBD. The initial immobilization of the isolated fusion protein is carried out using a silica based immobilized artificial membrane: IAM.PC. This membrane contains a silica core, which is attached to a hydrophobic spacer with a polar head group. The procedure for immobilization of the protein onto these membranes is known in the art. Varying concentrations of IAM are used to determine the optimal conditions for

WO 01/91626

PCT/US01/17081

immobilization. It is determined that 25 mg of IAM is optimal with 35 % incorporation.

However, upon testing for activity it becomes apparent that [³H]-estradiol is not only binding to the protein but also to the hydrophobic layer of the membrane. Increasing the ethanol concentration in solution does not significantly reduce the binding to the membrane. Using a modified IAM stationary phase, the IAM-MG, that is more hydrophilic only slightly reduces the nonspecific binding.

The ER-LBD is then immobilized in a new column format containing a silica backbone and a hydrophobic spacer (C 10). The ER-LBD is immobilized and retained its binding activity but the nonspecific binding of [³H]-estradiol is still to great for effective use of the column. The C10 spacer is replaced by a hydrophilic spacer and the nonspecific binding of [³H]-estradiol is eliminated and the ER-LBD-SP column is synthesized.

The K_d of the estradiol marker ligand is then determined on-line using the ER-LBD-SP column. The ER-LBD-SP column is connected with on-line flow scintillation monitoring (kadiometric FLO-ONE Beta 500 TR instrument, Packard Instrument Co., Meriden, CT) and run at room temperature for 97.5 minutes at a flow rate of 0.2 mL/min. The system setup is as described by Zhang, et al., Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase For On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug-Receptor Affinities, Anal. Biochem. 264, 22 (1998). 18 mL samples of 0.5 nM [³H]-Estradiol ([³H]-E2) supplemented with a range of concentration of cold Estradiol (0-7 nM) are run by frontal chromatography. The elution volume data is used to calculate the dissociation constant of the ligand. The K_d value of estradiol is calculated by

85

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

nonlinear regression with Prism (GraphPad Software) using one site binding equation: $Y=B_{max} [E2]_{total}/(K_d + [E2]_{total})$. The K_d values of estradiol is calculated as previously described to be (0.189 ± 0.06) nM. The radioactive signal is recorded every 6 seconds by an on-line flow scintillation detector.

5 Preparation of the ER-LBD: The recombinant ER-LBD is obtained and purified as described above.

Immobilization of the ER-LBD: The ER-LBD is then immobilized in the micromachined capillaries. The immobilization is accomplished through activation of the silanol groups on the silica chips using
10 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and then coupling of the C2 spacer with a free carboxyl group to the activated surface. The ER-LBD is then bound to the derivatized surface using the procedures developed in the previous studies with the liquid chromatographic stationary phase composed of silica gel beads. The amount of protein immobilized on the surface of the microchannels is
15 determined by analysis of the protein content of the binding solution before and after exposure to the microchannels.

 If the initial experimental approach to the immobilization of ER-LBD is not successful the following procedures are investigated: 1) if the problem exists at the during the activation of the silanol groups at the silica surface, DCC is
20 replaced by dimethylaminopyridine (DMAP); 2) if the problem arises from the C2 spacer, C3 to C4 spacers are examined; 3) if a problem exists with the immobilization to the new surface, an epoxide activated approach is explored by a method such as described in J.B. Wheatley et al.: Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports, J. Chromatogr. A, 849, 1
25 (1999); D. Zhou, et al.: Membrane affinity chromatography for analysis and

WO 01/91626

PCT/US01/17081

purification of biopolymers. *Chromatographia*, 50, 27 (1999), or an approach utilizing streptavidin-biotinylation such as described by L.A. Paige, et al.: Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 96, 3999 (1999).

5 Binding activity of the immobilized ER-LBD: The binding activity of the immobilized ER-LBD is determined using [3 H]-estradiol (0.005 nM in phosphate buffer [0.1 M, pH 7.4] ([3 H]-E2) supplemented with a range of concentration of cold estradiol to produce a range of from 0.001 to 0.050 nM in phosphate buffer [0.1 M, pH 7.4]). The solutions containing the [3 H]E2 are applied to the microchannels containing the immobilized ER-LBD, microchannels containing the immobilized support (without the ER-LBD, a positive control) and bare microchannels (negative control). The solution containing microchannels is incubated at room temperature for 30 minutes. The channels are then washed three times with phosphate buffer [0.1 M, pH 7.4], the washing is collected and assayed for [3 H]-E2 content using a scintillation detector. The K_d value of E2 is calculated by nonlinear regression with Prism (GraphPad Software) using one site binding equation: $Y = B_{max} [E2]_{total} / (K_d + [E2]_{total})$. The observed binding affinities and extent of binding is compared to the data from parallel binding studies carried out using an equivalent concentration of non-immobilized ER-LBD. These studies will yield binding affinity/mg immobilized ER-LBD indices (BAI) which is used to characterize the immobilized receptor.

15 Optimization and reproducibility of the immobilization: The immobilization of the ERLBD is optimized through the investigation of the effect of ER-LBD concentration, reaction time, temperature and chemistry used

WO 01/91626

PCT/US01/17081

in the immobilization. Each of the variables is independently investigated in a step-wise optimization approach. The outcome of each iteration is assessed using the BAL. Once an optimum immobilization procedure has been determined, the intra-day and inter-day reproducibility of the procedure is determined. A variance of no greater than 10% is deemed acceptable. If this cannot be achieved under the initially determined "optimal" conditions, other previously determined conditions is investigated using the BIA as the selecting variable.

Determination of the limits of quantitation and detection of the immobilized ER-LBD chip: The estradiol ligand is derivatized with fluorescein-5-maleimide to produce the fluorescent-ligand {E2-FM} which is used in the clinical patch. If this fluorescent-tag does not produce enough sensitivity, other agents are utilized. The immobilized ER-LBD chip is suspended over and then brought into surface contact with solutions containing E2. The concentrations of the E2 solutions are serially diluted from the initial concentration of 0.050 nM until displacement of E2-FM can no longer be observed. The measured optical density at $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ is plotted against the E2 concentrations of the test solutions to construct standard curves. Standard inter-day and intra-day validation studies are conducted to establish the reproducibility of the measurements, the lower limits of quantitation and the lower limits of detection. Once this has been established, the chip is ready for clinical testing.

Preparation of the AR-LBD: The androgen receptor ligand binding domain {AR-LBD} fusion protein is produced and purified following known procedures. Once the protein is expressed and purified, the binding affinity of

WO 01/91626

PCT/US01/17081

the AR-LBD is determined by conventional methods following the procedure described for the ER-LBD.

Preparation of the immobilized AR-LBD chip and validation of its activity: The immobilization of the AR-LBD, determination of the binding activity of the immobilized ERLBD, determination of the limits of quantitation and detection as well as the initial clinical validation is carried out based upon the results obtained with the ER-LBD.

The protein is immobilized in a similar fashion as the ER-LBD, and the K_d is determined by frontal chromatography. The stability of the column is also determined.

The immobilization of these receptors allows for rapid screening and determination of presence of biologically active/inactive compounds on the estrogen and/or androgen receptors.

The recombinant ER-LBD is obtained and purified as described above.

Immobilization of the ER-LBD: The AR-LBD is then immobilized following the procedures described above for the ER-LBD.

The clinical trials described herein determine the analytical precision and accuracy of methods to determine estrogen and testosterone via transdermal sampling in comparison with validated plasma assays. Validated plasma ELISA assays for estrogen and testosterone with acceptable limits of detection and quantification and with acceptable intra- and inter-day coefficients of variation are used to compare with these assays in the clinical settings described in the four trials outlined in detail below.

Clinical Trial 1: A Pilot Trial Correlating Estrogen Concentrations in plasma and Interstitial Fluid in Pre and Post-Menopausal Women. In order to

WO 01/91626

PCT/US01/17081

validate the analytical sensitivity of transdermal sampling to measure estrogen, eight healthy, menstruating women and eight healthy post-menopausal women who are taking no estrogen-containing medications are followed for two months to measure the estrogen concentrations in their plasma or interstitial fluid.

5 Concentrations of estrogen in the plasma is determined by a validated clinical ELISA assay, routinely used in clinical settings. These concentrations are compared to those determined in interstitial fluid using estrogen receptor-based assays using the HW monitoring device. Plasma and interstitial fluid concentrations are measured daily during the period from the end of after
10 menstruation until 10 days afterward in menstruating women and over a ten day period in post-menopausal women.

Two groups of women are recruited: a group of eight women who are pre-menopausal and who, by history, experience regular menstrual cycles; and a group of women who have passed through menopause

15 Inclusion Criteria. Group 1: women who are over the age of 21 years and under the age of 40 years. Group 2: women who are over the age of 55 and under the age of 75. All women must conform with the following: (1) taking no prescription medications or natural products intended to produce estrogen like effects (for example, ginseng or black kohosh); (2) with clinically normal
20 laboratory values for complete blood counts, serum chemistries (Na, K, Cl, HCO₃, BUN, glucose and creatinine) and clinically normal liver enzyme profiles: SGOT, SGPT, alkaline phosphatase and bilirubin; (3) ability to understand and carry out a signed informed consent describing this protocol.

Exclusion Criteria. The following individuals are excluded from the
25 study: (1)smokers; (2) impaired liver or renal function as demonstrated by

WO 01/91626

PCT/US01/17081

serum SGOT, SGPT or bilirubin above the normal range of laboratory values, or serum creatinine greater than 1.5 mg/dL; (3) positive urine drug screen; (4) subjects who test positive for Human Immunodeficiency Virus or hepatitis; (5) subjects who have taken an investigational drug within 30 days of study start; 5 (6) subjects taking any enzyme inducing or inhibiting medications (for example, rifampin or phenytoin) for 30 days prior to dosing; and (7) subjects who, in the opinion of the Investigator, is noncompliant with the protocol requirements.

Restrictions include that subjects are instructed to refrain from the 10 following: (1) taking any prescription medications for two weeks prior to dosing; (2) consuming caffeine and/or xanthine containing products and alcohol from at least 48 hours prior to Study Day 1 until after the last blood sample has been collected; (3) smoking; (4) strenuous exercise during the entire study to avoid dislocation of the measuring device.

15 Once a subject has consented to participate in the study, the following procedures are conducted. Screening procedures are conducted within 21 days of study initiation and include: medical history and physical examination; review of inclusion and exclusion criteria; blood and urine specimen collection; analysis of blood sample for hematology, serum chemistry, liver enzymes, HIV 20 and hepatitis B and C; and analysis of urine sample for screening of drugs of abuse.

Subsequent to inclusion in the study, subject will undergoes the 25 following procedures: subjects arrive at the testing facility at approximately 9a.m. in the morning. While the precise date is not important for post-menopausal women, menstruating women are asked to report on the last

WO 01/91626

PCT/US01/17081

day of their regular period. At this time estrogen levels are low and the detection limits of the assays is appropriately tested. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded. The portable biomedical monitoring device is placed on a forearm and attached securely with tape.

5 Recording occurs via a 50 micron cauterized lesion in the skin made by a small needle on the underside of the monitor that is not visible. The monitor is checked to ensure that it is recording. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded.

10 A single sample of venous blood (5 cc or one teaspoon) is drawn from a forearm vein for the measurement of estrogen while the subject is supine. The device is instructed to measure estrogen for periods of 0.25, .5, 1, 1.5, 2, 3, 6, and 8 hours in order to test the optimal time required. Additional blood samples are drawn 4 hours and eight hours after the first. The tape and device is removed. Patients are then discharged and allowed to return home before
15 returning at 9 a.m. the next morning. This procedure is repeated on the following 9 days for a total of 10 days with each subject.

Blood Sampling Schedule. Five mL venous blood samples are collected in vacutainers containing EDTA on days 1 through 10 in the manner described above. The total number of blood draws during the course of the study including
20 the screening and exit samples, is 35, (Thirty study draws and five screening draws for hematology, chemistry, liver enzymes, HIV and Hepatitis and C respectively.) and the total volume of blood drawn does not exceed 200 mL.

Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are taken before and after placement of the device and before and after each
25 blood draw on days 1 through 10.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

Patients are encouraged to report any notable irritation on the arm where the device is placed. A physician is constantly available to subjects enrolled in the study for concerns related to bruising or infection in the skin due to multiple blood draws.

5 Estrogen concentrations determined using plasma ELISA is compared with the values obtained using the portable biomedical monitor. If the correlation coefficient is > 0.8 with a significance $p < 0.05$ the measurements are deemed valid.

A Pilot Trial Correlating Testosterone Concentrations in plasma and
10 Interstitial Fluid in Men. Ten healthy men, chosen to represent a range of ages between 21 and 70 years old and *who* are taking no medications have plasma and interstitial fluid testosterone concentrations measured daily for 5 consecutive days both by validated plasma assay and by transdermal sampling using the portable biomedical monitoring device.

15 Inclusion Criteria. Men who are over the age of 21 and under the age of 75. All men must conform with the following: (1) taking no prescription medications or natural products intended to produce testosterone like effects (for example, androstenedione or DHEA); (2) with clinically normal laboratory values for complete blood counts, serum chemistries (Na, K, Cl, HC03, BUN,
20 glucose and creatinine) and clinically normal liver enzyme profiles: SGOT, SGPT, alkaline phosphatase and bilirubin; and (3) ability to understand and carry out a signed informed consent describing this protocol.

Exclusion Criteria. The following individuals are excluded from the study: (1) smokers; (2) impaired liver or renal function as demonstrated by
25 serum SGOT, SGPT or bilirubin above the normal range of laboratory values,

WO 01/91626

PCT/US01/17081

or serum creatinine greater than 1.5 mg/dL; (3) positive urine drug screen; (4) subjects who test positive for Human Immunodeficiency Virus or hepatitis.

Restrictions include subjects are instructed to refrain from the following:

(1) smoking; and (2) strenuous exercise during the entire study to avoid

5 dislocation of the measuring device.

Once a subject has consented to participate in the study, the following procedures are conducted: Screening procedures are conducted within 21 days of study initiation and include: medical history and physical examination; review of inclusion and exclusion criteria; blood and urine specimen collection; 10 analysis of blood sample for hematology, serum chemistry, liver enzymes, HIV and hepatitis B and C; and analysis of urine sample for screening of drugs of abuse.

Subsequent to inclusion in the study, subject will undergoes the following procedures: Subjects arrive at the testing facility at approximately 9 15 a.m. in the morning. Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded. The portable biomedical monitoring device is placed on a forearm and attached securely with tape. Recording occurs via a 50 micron cauterized lesion in the skin made by a small needle on the underside of the monitor that is not visible. The monitor is checked to ensure that it is recording.

20 Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are recorded.

A single sample of venous blood (5 cc or one teaspoon) is drawn from a forearm vein for the measurement of testosterone while the subject is supine.

The device is instructed to measure estrogen for periods of 0.25, .5, 1, 1.5, 2, 3, 25 6, and 8 hours in order to test the optimal time required. Additional blood

WO 01/91626

PCT/US01/17081

samples are drawn 4 hours and eight hours after the first. The tape and device is removed. Patients are then discharged and allowed to return home before returning at 9 a.m. the next morning. This procedure is repeated on the following 4 days for a total of 5 days with each subject.

5 Five mL venous blood samples are collected in Vacutainers containing EDTA on Days 1 through 5 in the manner described above. The total number of blood draws during the course of the study including the screening and exit samples, is 20, (Fifteen study draws and five screening draws for hematology, chemistry, liver enzymes, HIV and Hepatitis and C respectively.) and the total
10 volume of blood drawn does not exceed 200 mL.

Vital signs (heart rate, respiratory rate, blood pressure and temperature) are taken before and after placement of the device and before and after each blood draw on days 1 through 5.

15 Patients are encouraged to report any notable irritation on the arm where the device is placed. A physician is constantly available to subjects enrolled in the study for concerns related to bruising or infection in the skin due to multiple blood draws.

Testosterone concentrations determined using plasma ELISA is compared with the values obtained using the portable biomedical monitor. If the
20 correlation coefficient is > 0.8 with a significance $p < 0.05$ the measurements are deemed valid.

The purpose of this third clinical trial is to administer appropriate concentrations of estrogen to postmenopausal women who are healthy
25 volunteers and to measure the resulting concentrations. Estrogen is administered in microgram pulses over a period of 3 days after a 3-day run-in for baseline

WO 01/91626

PCT/US01/17081

measurement using the optimal machine settings for the monitor as defined above.

5 The purpose of this fourth clinical trial is to administer appropriate concentrations of testosterone to men between the ages of 55 and 75 years who are healthy volunteers and to measure the resulting concentrations. Testosterone is administered in microgram pulses over a 5 day period after a 3 day run-in period that is used to determine baseline testosterone concentrations in these men before the administration of testosterone. The resulting concentrations is determined using the analytical specifications as defined above.

10 All of the above-cited patents, publications, and references are hereby expressly incorporated by way of reference in their respective entireties.

It should be apparent to one of ordinary skill in the art that other embodiments can be readily contemplated in view of the teachings of the present specification. Such other embodiments, while not specifically disclosed
15 nonetheless fall within the scope and spirit of the present invention. Thus, the present invention should not be construed as being limited to the specific embodiments described above, and is solely defined by the following claims.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

What is claimed is:

- 1 1. A transdermal sampling system, comprising:
2 at least one sampler for retrieving and transferring at least one
3 analyte obtained transdermally from the skin of a subject;
4 at least one detector system for identifying and quantifying said at
5 least one analyte; and
6 at least one logic module for (i) receiving and storing input data
7 from said at least one detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the
8 subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to
9 another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least
10 one detector.
- 1 2. The system of claim 1, wherein said at least one sampler is a
2 microfabricated device comprising a microfluidic assembly.
- 1 3. The system of claim 2, wherein said microfluidic assembly comprises at
2 least one reservoir and at least one conduit in communication with said reservoir for
3 retrieving and transmitting said at least one analyte through said at least one conduit, and
4 said at least one detector is in association with said at least one conduit for detecting said
5 at least one analyte received and transmitted through said at least one conduit.
- 1 4. The system of claim 1, wherein said at least one sampler further
2 comprises means for enhancing permeability of the skin of a subject for retrieving said
3 at least one analyte therefrom.
- 1 5. The system of claim 4, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.
- 1 6. The system of claim 4, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow access to interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.
- 1 7. The system of claim 4, wherein said means for enhancing permeability of
2 the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation to

WO 01/91626

PCT/US01/17081

3 a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the skin
4 of a subject, to allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying viable
5 epidermis.

1 8. The system of claim 7, wherein said radiation source is a light source.

1 9. The system of claim 8, wherein said light source is a laser.

1 10. The system of claim 4, wherein said means for enhancing permeability of
2 the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation to
3 a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the skin
4 of a subject, to allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying viable
5 epidermis.

1 11. The system of claim 4, wherein said means for enhancing permeability of
2 the skin is at least one of: (i) means for chemically altering the surface of the skin; (ii)
3 means for puncturing the surface of the skin; (iii) means for solubilizing the surface of
4 the skin; (iv) means for illuminating the surface of the skin sufficient to cause ablation
5 thereof; and (v) means for irradiating the surface of the skin to cause ablation thereof.

1 12. The system of claim 1, wherein:

2 said at least one sampler comprises a plurality of samplers; and said at
3 least one detector system comprises a plurality of detector systems.

1 13. The system of claim 1, wherein said at least one detector system
2 comprises an optical detection system comprised of light sources effective to excite
3 fluorophores, and at least one detector for detecting fluorescence from excited
4 fluorophores.

1 14. The system of claim 13, wherein said light source comprises at least one
2 LED.

1 15. The system of claim 13, wherein said light source comprises at least one
2 laser.

1 16. The system of claim 3, wherein said at least one reservoir contains a
2 fluid, and is positioned for transmitting the fluid to a subject's skin to promote flow of
3 said at least one analyte into said at least one conduit.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

1 17. The system of claim 16, wherein said fluid contained in said at least one
2 reservoir is capable of permeating a subject's skin.

1 18. The system of claim 16, further comprising a breakable seal for retaining
2 said fluid in said reservoir prior to sampling analytes from a subject.

1 19. The system of claim 1, further comprising an adhesive on said sampler
2 for adhering the sampler to the skin of a subject.

1 20. The system of claim 1, further comprising at least one substance located
2 in said sampler which is capable of binding an analyte of interest, and said substance
3 being detectable by said at least one detector system.

1 21. The system of claim 16, further comprising a pump for pumping said
2 fluid into contact with the skin of a subject.

1 22. The system of claim 21, further comprising a microheater disposed to be
2 in close proximity to a subject's skin surface at a location proximate to where said fluid
3 is pumped into contact with the skin of a subject, and is configured for ablating a portion
4 of the stratum corneum of the skin of a subject.

1 23. The system of claim 1, further comprising means for monitoring
2 predetermined physiological data as said other data, for relating to the input data by said
3 at least one logic module.

1 24. The system of claim 1, further comprising means for monitoring
2 environmental conditions data as said other data, for relating to the input data by said at
3 least one logic module.

1 25. The system of claim 1, wherein said at least one detector system
2 comprises a patch sensitive to at least one analyte for changing color in response to
3 contact with said at least one analyte, and at least one detector for detecting a change in
4 color of the patch.

1 26. A microfabricated device for allowing remote monitoring of a subject,
2 comprising: at least one sampler unit body for retrieving and transferring at least one
3 analyte obtained transdermally from the skin of a subject; at least one detector system
4 connected to said at least one sampler unit body for identifying and quantifying at least
5 one analyte obtained from a subject; and a transmitter/receiver for transmitting data

WO 01/91626

PCT/US01/17081

6 relating to at least one analyte detected by said detection system to a logic module for
7 processing thereby, and for allowing control of the microfabricated device by a logic
8 module.

1 27. The device of claim 26, wherein the sample unit body further comprises a
2 microfluidic assembly.

1 28. The device of claim 27, wherein said microfluidic assembly comprises at
2 least one reservoir and at least one conduit in communication with said reservoir for
3 retrieving and transmitting said at least one analyte through said at least one conduit, and
4 said at least one detector being in association with said at least one conduit for detecting
5 said at least one analyte which has been received and transmitted through said at least
6 one conduit.

1 29. The device of claim 26, wherein said at least one sampler unit body
2 further comprises means for enhancing permeability of the skin of a subject for
3 retrieving said at least one analyte therefrom.

1 30. The device of claim 29, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.

1 31. The device of claim 29, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation
3 to a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the
4 skin of a subject, to allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying
5 viable epidermis.

1 32. The device of claim 31, wherein said radiation source is a light source.

1 33. The device of claim 32, wherein said light source is a laser.

1 34. The device of claim 29, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin is at least one of; (i) means for chemically altering the surface of the skin, (ii)
3 means for puncturing the surface of the skin, (iii) means for solubilizing the surface of
4 the skin, (iv) means for illuminating the surface of the skin sufficient to cause ablation
5 thereof, and (v) means for irradiating the surface of the skin to cause ablation thereof.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

- 1 35. The device of claim 26, wherein;
2 said at least one sampler unit body comprises a plurality of sampling
3 conduits; and said at least one detector system comprises a plurality of detector systems.
- 1 36. The device of claim 1, wherein said at least one detector system
2 comprises an optical detection system comprised of light sources effective to excite
3 fluorophores, and at least one detector for detecting fluorescence from excited
4 fluorophores.
- 1 37. The device of claim 36, wherein said light source comprises at least one
2 LED.
- 1 38. The device of claim 36, wherein said light source comprises at least one
2 laser.
- 1 39. The device of claim 28, wherein said at least one reservoir contains a
2 fluid, and is positioned for transmitting the fluid to a subject's skin to promote flow of
3 said at least one analyte into said at least one conduit.
- 1 40. The device of claim 39, wherein said fluid contained in said at least one
2 reservoir is capable of permeating a subject's skin.
- 1 41. The device of claim 39, further comprising a breakable seal for retaining
2 said fluid in said reservoir prior to sampling analytes from a subject.
- 1 42. The device of claim 26, further comprising an adhesive on said sampler
2 for adhering the sample to the skin of a subject.
- 1 43. The device of claim 26, further comprising at least one substance in said
2 sampler unit body which is capable of binding an analyte of interest, and said substance
3 being detectable by said at least one detector system.
- 1 44. The device of claim 26, wherein said at least one detector system
2 comprises a patch sensitive to at least one analyte for changing color in response to
3 contact with said at least one analyte, positioned in said sampler unit body for contact
4 with said at least one analyte, and at least one detector in said sampler unit body
5 positioned for detecting a change in color of the patch.
- 1 45. The device of claim 26, wherein: said sampler unit body is a silicon body
2 having an array of capillary conduits extending therethrough for sampling analyte from

WO 01/91626

PCT/US01/17081

3 the skin of a subject through said capillary conduits; and at least one detector chamber
4 associated with said at least one detection system, and in communication with said
5 capillary conduits for detecting analytes received within the capillary chamber.

1 46. The device of claim 45, wherein said at least one sampler further
2 comprises means for enhancing permeability of the skin of a subject for retrieving said
3 at least one analyte therefrom.

1 47. The device of claim 46, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.

1 48. The device of claim 46, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.

1 49. The device of claim 46, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation
3 to a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the
4 skin of a subject to allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying
5 viable epidermis.

1 50. The device of claim 46, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation
3 to a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the
4 skin of a subject to allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying
5 viable epidermis.

1 51. The device of claim 50, wherein said radiation source is a light source.

1 52. The device of claim 51, wherein said light source is a laser.

1 53. The device of claim 46, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin is at least one of; (i) means for chemically altering the surface of the skin, (ii)
3 means for puncturing the surface of the skin, (iii) means for solubilizing the surface of
4 the skin, (iv) means for illuminating the surface of the skin sufficient to cause ablation
5 thereof, and (v) means for irradiating the surface of the skin to cause ablation thereof.

102

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

- 1 54. The device of claim 46, wherein said at least one detector system
2 comprises an optical detection system comprised of light sources effective to excite
3 fluorophores, and at least one detector for detecting fluorescence from excited
4 fluorophores.
- 1 55. The device of claim 54, wherein said light source comprises at least one
2 LED.
- 1 56. The device of claim 54, wherein said light source comprises at least one
2 laser.
- 1 57. The device of claim 46, wherein said silicon body comprises at least one
2 reservoir capable of containing a fluid, and in communication with said capillary
3 conduits, for transmitting the fluid to a subject's skin to promote flow of said at least one
4 analyte into at least one of said capillary conduits.
- 1 58. The device of claim 57, wherein said silicon body further comprises a
2 microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface at a location
3 proximate to where said fluid is pumped into contact with the skin of a subject, and is
4 configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject.
- 1 59. A microfabricated device for sampling analytes from the skin of a
2 subject, comprising:
3 a detection chamber for receiving analytes retrieved from the skin of a
4 subject;
5 a photonic detection system, comprising a photonics source located
6 attached to said microfabricated device in association with said detection chamber, and
7 detectors associated with said detection chamber for detecting analytes received in said
8 detection chamber.
- 1 60. The device of claim 59, wherein said photonics source is at least one
2 LED.
- 1 61. The device of claim 59, wherein said photonics source is at least one
2 laser.
- 1 62. The device of claim 59, further comprising substances in said device
2 which bind with selected analytes, and which fluoresce when said photonics source
3 applies radiation thereto.

103

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/91626

PCT/US01/17081

- 1 63. A microfabricated device for sampling analytes from the skin of a
2 subject, comprising:
3 a detection chamber for receiving analytes retrieved from the skin of a
4 subject;
5 a patch which changes color when contacted by predetermined analytes,
6 located attached to said microfabricated device in association with said detection
7 chamber; and
8 detectors associated with said detection chamber, for detecting a change
9 of color of the patch indicating the presence of a predetermined analyte.
- 1 64. A microfabricated device for sampling and detecting analytes retrieved
2 from the skin of a subject, comprising:
3 at least one conduit for retrieving and transmitting an analyte from the
4 skin of a subject to a detector; and
5 means for enhancing permeability of the skin of a subject for retrieving
6 said at least one analyte therefrom.
- 1 65. The device of claim 64, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.
- 1 66. The device of claim 64, wherein said means for enhancing permeability
2 comprises a microheater disposed to be in close proximity to a subject's skin surface,
3 and configured for ablating a portion of the stratum corneum of the skin of a subject to
4 allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying viable epidermis.
- 1 67. The device of claim 64, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation
3 to a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the
4 skin of a subject, to allow collection of interstitial fluid from the subject's underlying
5 viable epidermis.
- 1 68. The device of claim 64, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin comprises a radiation source positioned for generating and directing radiation
3 to a subject's skin surface, effective to ablate a portion of the stratum corneum of the

WO 01/91626

PCT/US01/17081

4 skin of a subject, to allow diffusion from interstitial fluid from the subject's underlying
5 viable epidermis.

1 69. The device of claim 67, wherein said radiation source is a light source.

1 70. The device of claim 69, wherein said light source is a laser.

1 71. The device of claim 64, wherein said means for enhancing permeability
2 of the skin is at least one of: (i) means for chemically altering the surface of the skin; (ii)
3 means for puncturing the surface of the skin; (iii) means for solubilizing the surface of
4 the skin; (iv) means for illuminating the surface of the skin sufficient to cause ablation
5 thereof; and (v) means for irradiating the surface of the skin to cause ablation thereof.

1 72. A transdermal sampling system, comprising:

2 a microfluidic assembly for retrieving and transferring at least one
3 analyte obtained transdermally from the skin of a subject;

4 at least one detector system for identifying and quantifying said at
5 least one analyte; and

6 at least one logic module for (i) receiving and storing input data
7 from said at least one detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the
8 subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to
9 another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least
10 one detector.

1 73. The transdermal sampling system according to claim 72, wherein the
2 microfluidic assembly comprises at least one serpentine capillary channel.

1 74. The transdermal sampling system according to claim 72, wherein the
2 microfluidic assembly further comprises

3 at least one reservoir channel,

4 at least one bottom capping section, and

5 at least one top capping section.

1 75. The transdermal sampling system according to claim 72, wherein the at
2 least one reservoir channel further comprises at least one seal for retaining a
3 physiologically compatible fluid within the at least one reservoir channel.

1 76. The transdermal sampling system according to claim 74, wherein the at
2 least bottom capping section comprises a micro-heating element.

105

WO 01/91626

PCT/US01/17081

- 1 77. The transdermal sampling system according to claim 76, wherein the
2 micro-heating element serves to ablate stratum corneum.
- 1 78. The transdermal sampling system according to claim 76, wherein the
2 micro-heating element serves to rupture the at least one seal.
- 1 79. The transdermal sampling system according to claim 76, wherein the
2 micro-heating element serves both to ablate stratum corneum and to rupture the at least
3 one seal.
- 1 80. The transdermal sampling system according to claim 74, wherein the at
2 least one top capping section comprises two or more electrodes.
- 1 81. The transdermal sampling system according to claim 80, wherein the two
2 or more electrodes serve to assist the flow of a physiologically compatible fluid through
3 the at least one serpentine capillary channel.
- 1 82. The transdermal sampling system according to claim 74, wherein the
2 microfluidic assembly further comprises a sensor for detecting the at least one analyte.
- 1 83. The transdermal sampling system according to claim 82, wherein the
2 sensor comprises an optical detection system comprised of at least one light source
3 effective to excite fluorophores, and at least one detector for detecting fluorescence from
4 excited fluorophores.
- 1 84. The transdermal sampling system according to claim 83, wherein the at
2 least one light source comprises at least one LED.
- 1 85. The transdermal sampling system according to claim 83, wherein the at
2 least one light source comprises at least one laser.
- 1 86. The transdermal sampling system according to claim 82, wherein the
2 sensor for detecting the at least one analyte comprises a patch sensitive to the at least
3 one analyte for changing color in response to contact with the at least one analyte, and at
4 least one detector for detecting a change in color of the patch.
- 1 87. A transdermal sampling system, comprising:
2 a microfluidic assembly for retrieving and transferring at least one
3 analyte obtained transdermally from the skin of a subject;

WO 01/91626

PCT/US01/17081

4 at least one detector system for identifying and quantifying said at
5 least one analyte; and

6 at least one logic module for (i) receiving and storing input data
7 from said at least one detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the
8 subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to
9 another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least
10 one detector,

11 wherein the microfluidic assembly contains a physiologically compatible fluid
12 for retrieving and transferring at least one analyte obtained transdermally from the skin
13 of a subject, and

14 wherein the microfluidic assembly is adhered to the skin of the subject.

1 88. The transdermal sampling system according to claim 87, wherein the
2 adhesion of the microfluidic assembly to the skin of the subject is achieved by means of
3 an adhesive.

1 89. The transdermal sampling system according to claim 88, wherein the
2 adhesive serves to prevent movement of the transdermal sampling system relative to the
3 skin of the subject.

1 90. The transdermal sampling system according to claim 87, wherein the
2 adhesive serves to prevent loss of the physiologically compatible fluid.

1 91. The transdermal sampling system according to claim 89, wherein the
2 adhesive is water impermeable.

1 92. A transdermal sampling system, comprising:

2 a microfluidic assembly for retrieving and transferring at least one
3 analyte obtained transdermally from the skin of a subject;

4 at least one detector system for identifying and quantifying said at
5 least one analyte; and

6 at least one logic module for (i) receiving and storing input data
7 from said at least one detector, (ii) relating the input data to other data obtained from the
8 subject, (iii) displaying output information, (iv) transmitting the output information to
9 another system, and (v) controlling the operation of said at least one sampler and at least
10 one detector,

11 wherein at least one surface of the microfluidic assembly is modified.

107

WO 01/91626

PCT/US01/17081

1 93. The transdermal sampling system according to claim 92, wherein the
2 modification of the at least one surface of the microfluidic assembly prevents the
3 adsorption of protein to the at least one surface of the microfluidic assembly.

1 94. The transdermal sampling system according to claim 92, wherein the
2 modification of the at least one surface of the microfluidic assembly attaches to the at
3 least one surface of the microfluidic assembly at least one specific-binding molecule
4 which specifically binds the at least one analyte.

1 95. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is bound with at least one fluorescently labeled
3 analyte,

4 wherein the at least one analyte obtained transdermally from the skin of a subject
5 displaces the bound at least one fluorescently labeled analyte, and

6 wherein measurement of the amount of fluorescence displaced from the at least
7 one specific-binding molecule correlates with the amount of the at least one analyte
8 obtained transdermally from the skin of a subject.

1 96. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is an antibody which specifically binds the at least
3 one analyte.

1 97. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is an antibody fragment which specifically binds the
3 at least one analyte.

1 98. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is an artificial antibody which specifically binds the
3 at least one analyte.

1 99. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is an artificial antibody which specifically binds the
3 at least one analyte.

1 100. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is a lectin which specifically binds the at least one
3 analyte.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

- 1 101. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is a hybridizable nucleic acid which specifically
3 binds the at least one analyte.
- 1 102. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is a nucleic acid-binding protein which specifically
3 binds the at least one analyte.
- 1 103. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is a protein-binding protein which specifically binds
3 the at least one analyte.
- 1 104. The transdermal sampling system according to claim 94, wherein the at
2 least one specific-binding molecule is a cofactor-binding protein which specifically
3 binds the at least one analyte.
- 1 105. A method of biomedically monitoring a subject's condition, comprising:
2 ablating a subject's skin to allow interstitial fluid to perfuse therethrough;
3 collecting interstitial fluid from the subject's ablated skin;
4 identifying and quantifying at least one type of selected molecules
5 contained in the collected interstitial fluid.
- 1 106. The method of claim 105, wherein the at least one type of molecule is a
2 metabolic marker of stress.
- 1 107. The method of claim 105, wherein the at least one type of molecule is at
2 least one of an organophosphate, microbial toxin, inflammatory sequeli to microbial
3 toxin, spore metabolite, prealbumin, C-reactive protein, troponin I, estrogen, and
4 testosterone.
- 1 108. The method of claim 105, further comprising monitoring at least one of
2 the subject's vital physiologically statistics.
- 1 109. The method of claim 108, wherein said at least one of the subject's vital
2 physiological statistics comprises at least one of body temperature, pulse rate, blood
3 pressure, and heart activity.
- 1 110. The method of claim 105, further comprising monitoring and detecting
2 environmental conditions in which the subject is located.

WO 01/91626

PCT/US01/17081

1 111. The method of claim 105, wherein said identifying and quantifying
2 comprises transferring said at least one type of molecule to a patch which changes color
3 when in contact with said at least one type of molecule, and detecting a change in color
4 of the patch.

1 112. The method of claim 105, wherein said identifying and quantifying
2 comprises binding the at least one type of molecule with a second type of molecule
3 which fluoresces when irradiated, irradiating the at least one type of molecule bound to
4 the second type of molecule, and detecting any resultant fluorescence.

1 113. The method of claim 112, wherein the radiation source is a laser.

2 114. The method of claim 112, wherein the radiation source is an LED.

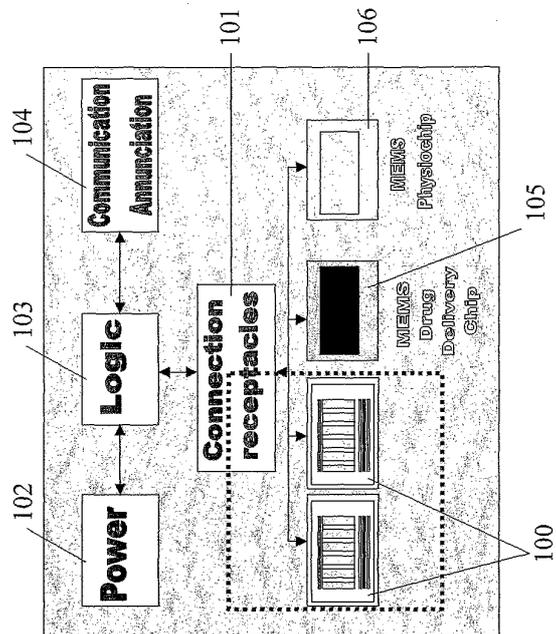


Figure 1

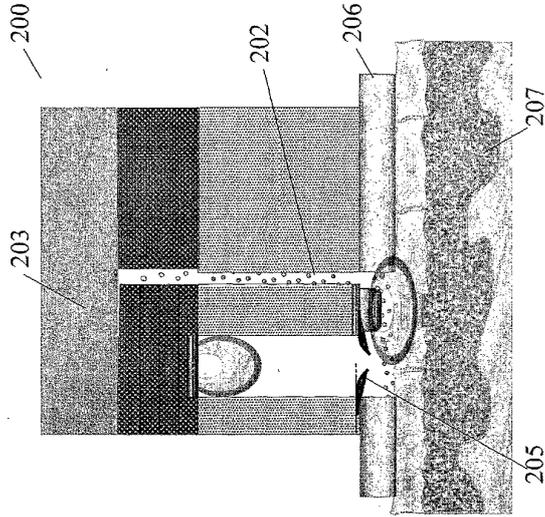


Figure 2

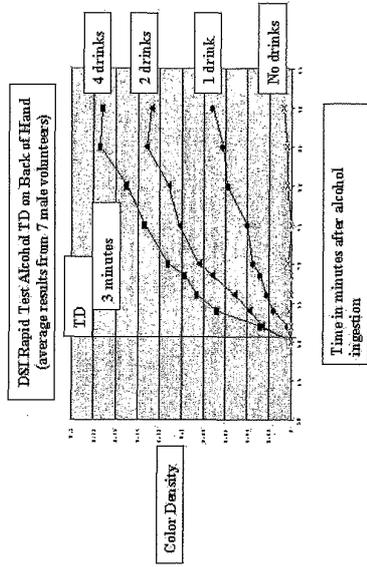


Figure 3

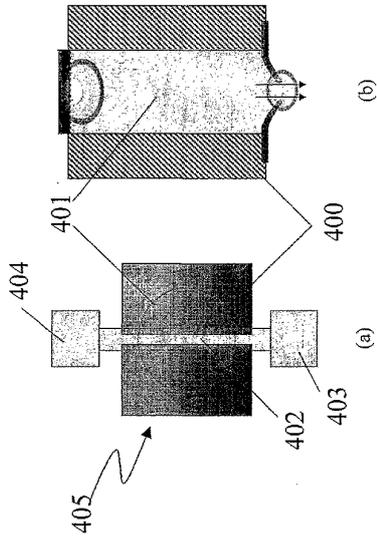


Figure 4

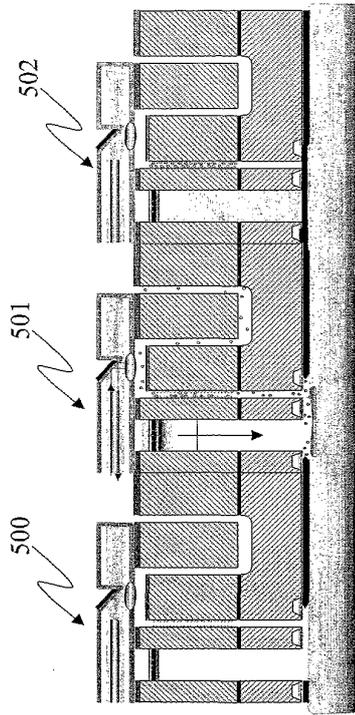


Figure 5

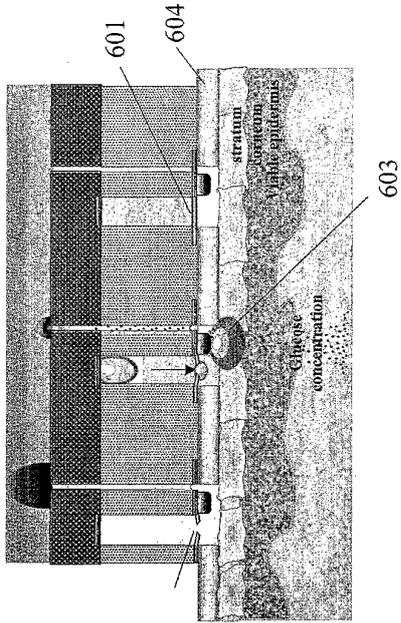


Figure 6

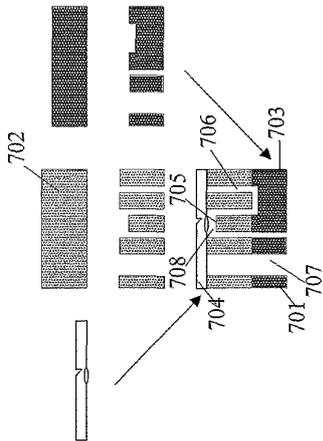


Figure 7

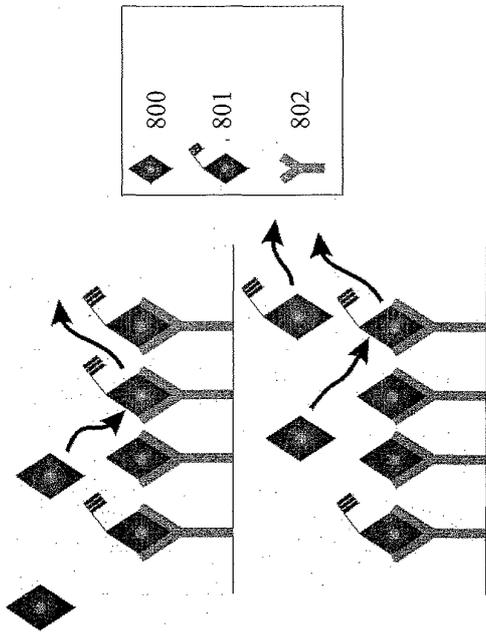


Figure 8

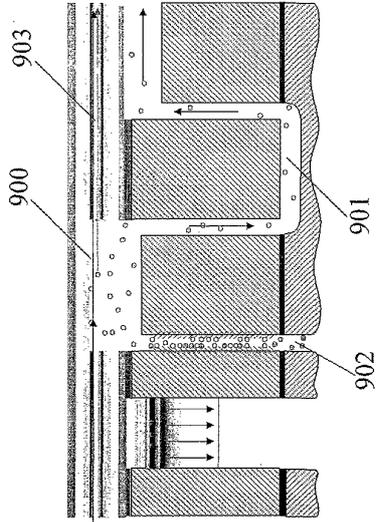


Figure 9

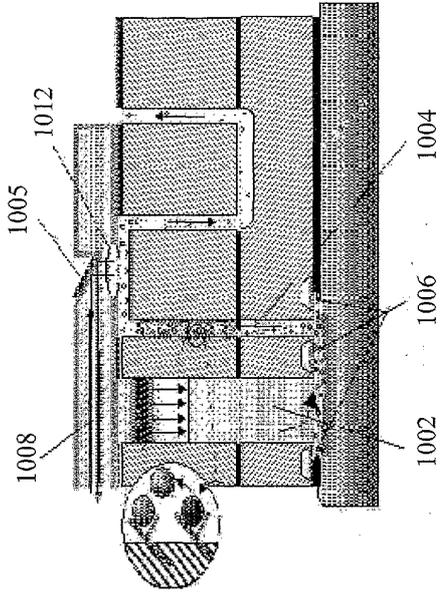


Figure 10

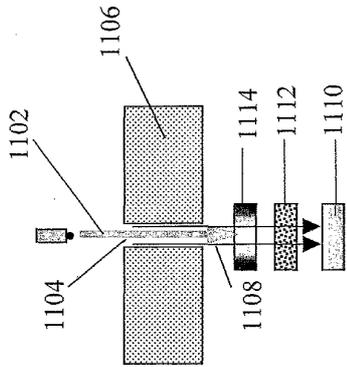


Figure 11

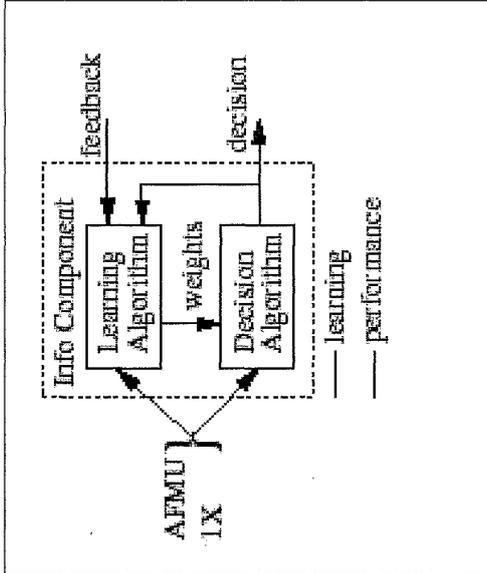


Figure 12

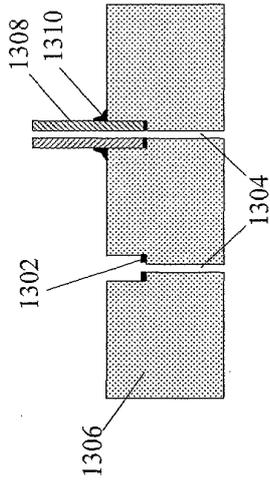


Figure 13

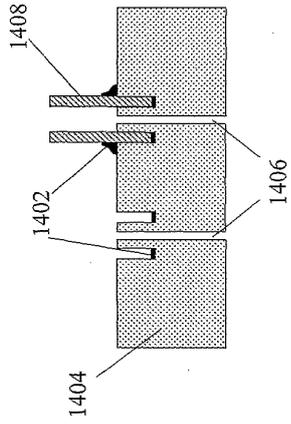


Figure 14

17 01 27

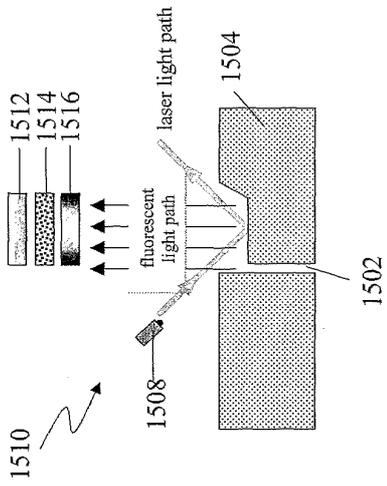


Figure 15

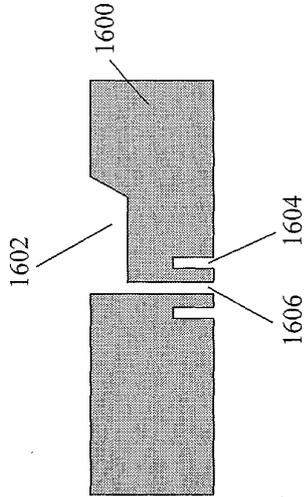


Figure 16

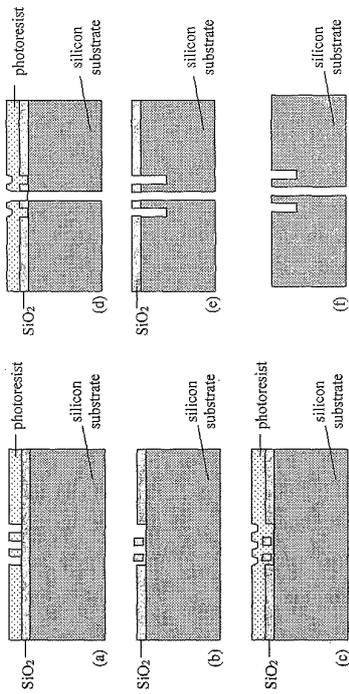


Figure 17

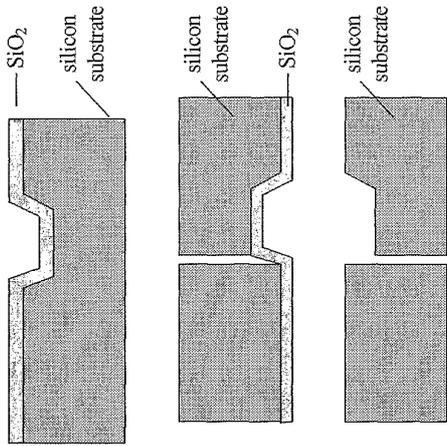


Figure 18

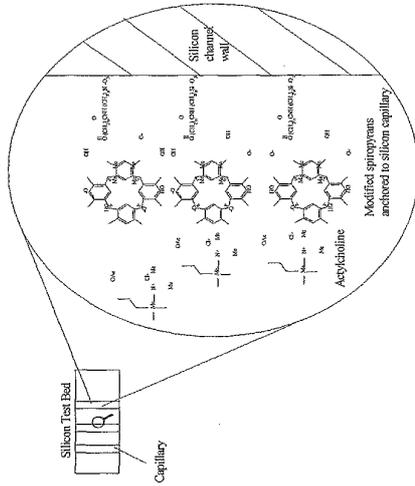


Figure 19

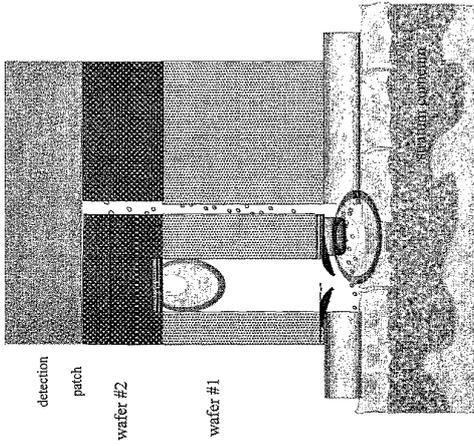


Figure 20

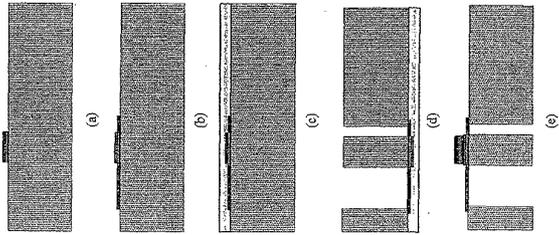


Figure 21

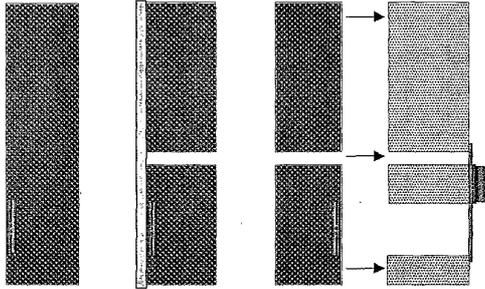


Figure 22

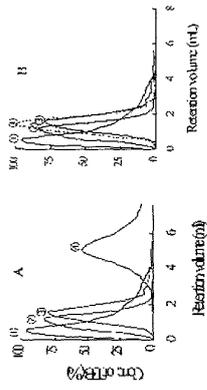


Figure 23

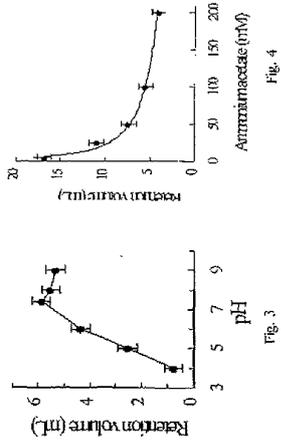


Figure 24

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
 G 0 1 N 33/53 X
 G 0 1 N 37/00 1 0 1

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 502434398
 ダーマル システムズ インターナショナル, インコーポレイテッド
 Dermal Systems International, Inc.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サン フランシスコ, イースト グラ
 ンド アベニュー 213
 213 East Grand Avenue, South San Francisco,
 CA 94080 U.S.A.

(74) 代理人 100103517
 弁理士 岡本 寛之

(72) 発明者 キュリー, ジョン エフ.
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20817 ベセスダ, フォールウィンド レーン 6523

(72) 発明者 パランジャブ, マカランド
 アメリカ合衆国 ヴァージニア州 22209 アーリントン, ノース キー ブルーバード, #
 503-1530

(72) 発明者 ベック, カール, シー.
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20852 ロックビル, ポインデクスター レーン, 621
 9

(72) 発明者 ホワイト, ロバート, シー.
 アメリカ合衆国 ヴァージニア州 22032 フェアファックス, ピケット ロード, 4715

(72) 発明者 シュナイダー, トーマス, ダブリュ.
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20879 ゲイザースバーグ, クラブアップル レーン, 8
 136

F ターム (参考) 2G045 AA25 AA29 BA13 BB17 BB50 BB51 CA25 CA26 CB09 CB17
 CB21 DA20 DA31 DA36 DA74 FA04 FA09 FA12 FA16 FB01
 FB03 FB06 FB07 FB11 FB12 GC15 HA06 JA01 JA04 JA07
 2G052 AA29 AA30 AA35 AA36 AB13 AB16 AB17 AB18 AD14 AD26
 AD34 AD46 BA23 DA09 DA13 DA22 DA23 EC14 EC17 FD02
 FD06 GA11 GA27 GA29 GA30 GA31 HB06 JA13 JA15

专利名称(译)	用于监测健康状态和用于透皮递送药物的系统和方法		
公开(公告)号	JP2004522460A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2001587645	申请日	2001-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	科学应用国际公司 乔治敦大学 真皮SYST INT		
申请(专利权)人(译)	科学应用国际公司 乔治城大学 Damaru系统国际公司		
[标]发明人	キュリージョンエフ パラジャプマカランド ベックカールシー ホワイトロバートシー シュナイダートーマスダブリュ		
发明人	キュリー, ジョン エフ. パラジャプ, マカランド ベック, カール, シー. ホワイト, ロバート, シー. シュナイダー, トーマス, ダブリュ.		
IPC分类号	G01N33/48 A61B5/00 G01N1/10 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61B5/150007 A61B5/0059 A61B5/14514 A61B5/14532 A61B5/14546 A61B5/1455 A61B5/1486 A61B5/6833 A61B2562/12 A61M5/1723		
FI分类号	A61B5/00.N G01N1/10.V G01N33/48.S G01N33/53.A G01N33/53.D G01N33/53.X G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/BA13 2G045/BB17 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB09 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA20 2G045/DA31 2G045/DA36 2G045/DA74 2G045/FA04 2G045/FA09 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/HA06 2G045/JA01 2G045/JA04 2G045/JA07 2G052/AA29 2G052/AA30 2G052/AA35 2G052/AA36 2G052/AB13 2G052/AB16 2G052/AB17 2G052/AB18 2G052/AD14 2G052/AD26 2G052/AD34 2G052/AD46 2G052/BA23 2G052/DA09 2G052/DA13 2G052/DA22 2G052/DA23 2G052/EC14 2G052/EC17 2G052/FD02 2G052/FD06 2G052/GA11 2G052/GA27 2G052/GA29 2G052/GA30 2G052/GA31 2G052/HB06 2G052/JA13 2G052/JA15		
代理人(译)	冈本博之		
优先权	60/208327 2000-06-01 US		
其他公开文献	JP5180418B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于透皮取样的系统和方法，包括：至少一个取样器，用于取回和转移从受试者皮肤经皮获得的至少一种分析物；至少一个检测器系统，用于识别和量化所述至少一种分析物；至少一个逻辑模块，用于（i）从所述至少一个检测器接收和存储输入数据，（ii）将输入数据与从主体获得的其他数据相关联，（iii）显示输出信息，（iv）发送输出信息到另一个系统，以及（v）控制所述至少一个采样器和至少一个检测器的操作。

