

Projektplan

MATCH: Marker-unabhängige Analyse von im Blut zirkulierenden Tumorzellen in einem miniaturisierten und modularen Hydrosystem (22401 N)

Im Verlauf einer Krebserkrankung können sich sogenannte zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells, CTCs) aus dem Primärtumor oder den Metastasen lösen und sich systemisch über das Blut oder Lymphe im Körper ausbreiten. Die Analyse dieser CTCs durch eine Blutentnahme kann entscheidende Informationen über die Prognose oder das Therapieansprechen liefern. Voraussetzung hierfür ist ein Verfahren, das Zielzellen aus einer großen und heterogenen Zellpopulation auszusortieren und sie anschließenden Analysen zuführen kann.

Die spezifische Detektion einzelner Zelltypen innerhalb heterogener Zellpopulationen wird üblicherweise durch fluoreszenz- oder immunaffinitätsbasierte Verfahren oder eine Kombination aus beiden realisiert. Hierfür müssen biomolekulare Zielstrukturen durch hochspezifische Moleküle (Marker) für die Detektion markiert werden. Diese Zielstrukturen müssen wiederum eine gute Zugänglichkeit für die Marker aufweisen. Aufgrund dieser Zugänglichkeit liegen geeignete Zielstrukturen meist auf der Oberfläche der Zielzellen. Alternativ muss die Zellmembran permeabel für die Marker sein oder Permeabilität induziert werden.

Außerdem werden Verfahren, die keine absolute Quantifizierung auf Einzelzellebene ermöglichen, sondern nur indirekt Aussagen über die Präsenz bestimmter Zellpopulationen zulassen, angewendet. Hierzu gehören Nukleinsäure-basierte Detektionsmethoden wie beispielsweise die Polymerase Chain Reaction (PCR) Reverse Transcription PCR (RT-PCR) oder das Next Generation Sequencing (NGS), die eine Extraktion der zellulären Nukleinsäuren voraussetzen. Ähnlich wie bei den immunaffinitätsbasierten Verfahren ist der Erfolg dieser Methoden zudem abhängig von der Verfügbarkeit spezifischer genetischer Marker.

Das hier vorgestellte Verfahren umgeht diese Probleme durch eine Aufkonzentration der Zielzellen, ohne auf Marker zurückzugreifen. Das Verfahren ist darauf ausgerichtet, die Zielzellen auf Basis morphologischer und physiologischer Merkmale aus einer heterogenen Population mittels geeigneter Mikrosystemtechnologien aufzukonzentrieren und anschließend mittels marker- und zerstörungsfreier Raman Spektroskopie eindeutig zu identifizieren. Das Verfahren stellt somit einen wichtigen Fortschritt für die klinische CTC-Diagnostik dar. Darüber hinaus lässt sich das Verfahren auch auf andere diagnostische Fragestellungen oder einen anderen biologischen Kontext mit ähnlichen Voraussetzungen in Bezug auf Probenparameter anwenden. Somit kann dieses Verfahren beispielsweise auch für diverse Forschungsfragestellungen im Bereich der Zellkultur Anwendung finden (z.B. Wirkstoffscreening, Toxizitätstest, Genetic Engineering, (pharmazeutische) Biotechnologie).

Arbeitsdiagramm

Arbeitspaket	Zeitraum																							
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AP 1: Anforderungsanalyse																								
AP 2: Proben (Modelletablierung, Probenbereitstellung)																								
AP 3: DEP-Struktur (DEP-Basisstruktur, DEP-Redesign)																								
AP 4: Software (Basis-Struktur, Weiterentwicklung und Optimierung)																								
AP 5: Systemintegration (Laboraufbau, Demonstrator)																								
AP 6: Assay-Entwicklung (CTC-Lokalisation, CTC-Klassifizierung)																								
AP 7: Evaluierung Gesamtsystem																								
AP 8: Projektmanagement																								
AP 9: Transfer und Umsetzungsdiskussion																								
Meilensteine							MS1													MS2				MS3

- MS 1: Die APs 2.1, 3.1 und 4.1 wurden erfolgreich abgeschlossen und sind in einem Laboraufbau integriert (AP 5.1). Die Assay-Entwicklung auf dem Laboraufbau kann beginnen (AP 6).
- MS 2: Die Assay-Entwicklung (AP 6.1 und AP 6.2) ist abgeschlossen und der Assay im Rahmen der Systemintegration (AP 5.2) in den MATCH-Laboraufbau integriert. Mit dem Abschluss der Assay-Entwicklung und anschließend der Systemintegration steht der MATCH-Demonstrator für die Evaluierung des Gesamtsystems zur Verfügung.
- MS 3: Die Evaluierung des Gesamtsystems (AP 7) ist abgeschlossen und finale Anpassungen des Systems wurden auf Basis des AP 7 umgesetzt. Die MATCH-Plattform gilt MS3 als erfolgreich umgesetzt, wenn sie im Vergleich zu den getesteten Konkurrenz-Systemen mindestens 90 % oder mehr der CTCs in den Modellproben wiederfindet und klassifiziert.

Forschungsziel

Die grundlegende Arbeitshypothese des Projektes MATCH sieht vor, dass die quantitative und qualitative Erfassung höchstelter Zellen marker- und zerstörungsfrei innerhalb eines Gesamtsystems (Plattform) durch eine Kombination aus Mikrosystemtechnik und Optik umgesetzt werden kann. Dies soll am Beispiel zirkulierender Tumorzellen (CTCs) in wässriger Umgebung gezeigt werden. Die Plattform wird in Form eines dedizierten Eigenbaus umgesetzt, der als portable Einheit vereinfachte Entwicklungs- und Evaluierungsarbeiten ermöglicht und gleichzeitig als Demonstrator eine Perspektive für den Technologietransfer darstellt. Der hier vorgeschlagene neuartige Lösungsweg vereint die Separation, Detektion und Analyse von CTCs in ein und derselben Plattform, ohne auf immunhistochemische Methoden zurückzugreifen. Die Erfassung aller CTC-

Subpopulationen soll so auf Basis Raman-spektroskopischer Daten und damit unabhängig der präsentierten Antigene oder deren molekularer Heterogenität erfolgen.

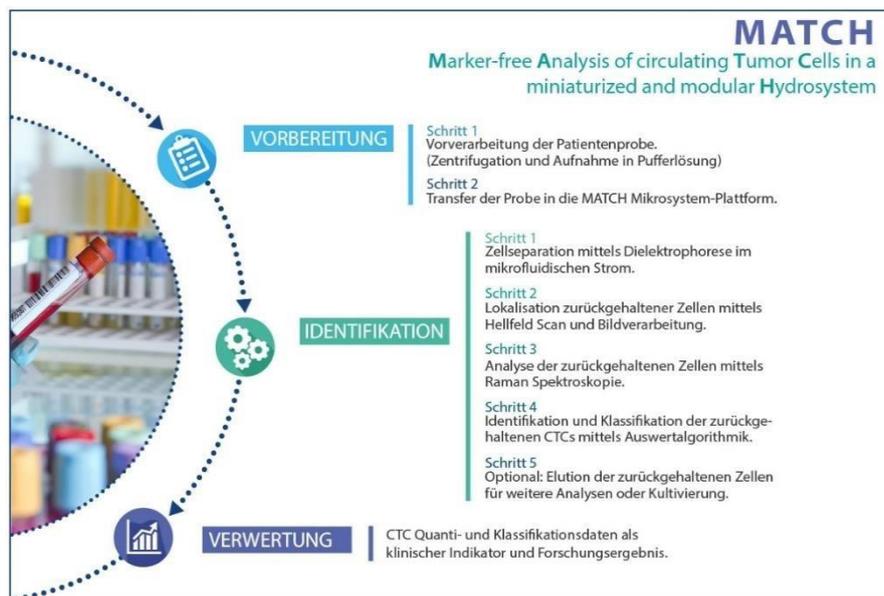


Abbildung 1: Darstellung des Prozesses von der Probenvorbereitung über die Verarbeitung innerhalb der MATCH-Plattform bis zur Datenauswertung.

Teil der Etablierung der MATCH-Plattform ist die Erarbeitung eines Prozesses von Probenentnahme über Vorverarbeitung, CTC-Isolation und Analyse bis zum Reporting. Die sich ergebenden Prozessschritte sind in Abbildung 1 skizziert. Der dargestellten Prozesspipeline liegen verschiedene Arbeitshypothesen zugrunde, die im Folgenden kurz aufgeführt werden. Eine Voraussetzung, für die in Abbildung 1 unter Identifikation dargestellten Prozessschritte ist, eine Mikrostruktur, die sowohl Mikrofluidik mit der Dielektrophorese (DEP) vereint als auch zugänglich für ein Mikroskopiemodul ist. Auf Basis der bei den Forschungspartnern und Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses (PA) vorhandenen Expertisen und des Stands der Wissenschaft und Technik ist davon auszugehen, dass eine solche DEP-Struktur umgesetzt werden kann. CTCs und andere Blutkomponenten sollen innerhalb einer geeigneten Pufferlösung durch die DEP-Struktur geleitet werden. Innerhalb dieser wird eine dielektrophoretische Kraft auf die Zellen ausgeübt, die es erlaubt die Zielzellen (CTCs) innerhalb der Struktur von anderen Zellen zu trennen. Eine optimale Abstimmung der Strukturparameter aufeinander ist ebenso wie die Zugänglichkeit einer optischen Einheit zu den Zielzellen als Forschungs- und Entwicklungsherausforderung anzusehen.

Für die Raman-spektroskopische Analyse der aufkonzentrierten Zellen ergeben sich verschiedene Herausforderungen. Zunächst muss die Position der Zellen ermittelt und anschließend das jeweilige Raman-Spektrum erfasst werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine enorme Beschleunigung des Gesamtprozesses erreicht werden kann, indem zunächst die Position aufkonzentrierter Zellen per Hellfeld-Scanning-Mikroskopie ermittelt wird. Die Abstimmung der Hardware auf einen performanten Bildalgorithmus ist hierfür entscheidend. Es ist davon auszugehen, dass das Signal der Zellen in Bezug auf die Raman-Spektroskopie durch strukturelle Hürden und intrinsische Eigenschaften der Methode durch verschiedene Störanteile verunreinigt wird. Durch den Einsatz hochsensitiver Hardware in Kombination mit der Entwicklung einer Pipeline zur Datenauswertung,

sollen Informationen, die von klinischer Relevanz sind, aus den Spektraldaten extrahiert werden. Für die Umsetzung werden Expertisen der Forschungseinrichtungen und des projektbegleitenden Ausschusses unter anderem in den Bereichen Softwareentwicklung, Raman-Spektroskopie, Systemintegration, Qualitätskontrolle und Datenauswertung und -verarbeitung gebündelt. Erst durch diese Bündelung der verschiedenen Expertisen kann eine erfolgreiche Bearbeitung des Vorhabens gewährleistet werden.

Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Im Projekt MATCH soll ein mehrstufiges Verfahren, durch die sich ergänzenden Expertisen der Forschungseinrichtungen und des PA in Form eines dedizierten Demonstrators etabliert werden. Als Basis für die Umsetzung dient eine von den Forschungseinrichtungen und dem PA angefertigte Anforderungsanalyse (AP 1). In dieser werden Parameter, Prozessabläufe und Vorgaben erfasst, die die erfolgreiche Umsetzung und den Technologietransfer sicherstellen sollen. Um die MATCH-Plattform in Form eines Demonstrators umzusetzen, lassen die Beteiligten ihr Fachwissen zunächst in die als Grundsteine zu betrachtenden Arbeitspakete Proben, DEP-Struktur und Software einfließen (AP 2 - 4). Diese Arbeiten werden innerhalb der Systemintegration (AP 5) fortlaufend in einem dedizierten Laboraufbau zusammengeführt. Auf Basis dieses Laboraufbaus wird der Assay (AP 6), die Isolierung, Lokalisation und Klassifizierung der CTCs, etabliert. Nach erfolgreicher Umsetzung der Arbeitspakete 1 bis 6 kann der Laboraufbau als Demonstrator bezeichnet und zusammen mit dem Assay als MATCH-Plattform durch das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Anwenderumgebung evaluiert werden (AP 7). Durch projektüberspannendes Engagement im Bereich des Technologietransfers und einem kontinuierlichen Austausch zu Umsetzungsmöglichkeiten (AP 9) und Steuerung durch das Projektmanagement (AP 8) soll die Überführung der Projektergebnisse in eine anwenderorientierte Verwertung sichergestellt werden. Entsprechend ergeben sich die in Abbildung 2 dargestellten Verknüpfungen der Arbeitspakete.

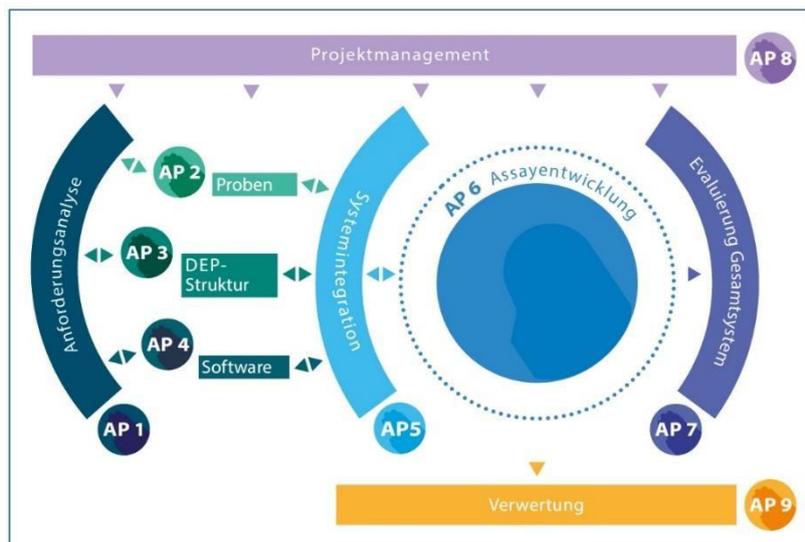


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Verknüpfung der einzelnen in MATCH enthaltenen Arbeitspakete.

Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas

MATCH stellt perspektivisch eine Schnittstelle zwischen Medizintechnik und Diagnostik dar. Das Projekt liefert durch die Verankerung im Forschungsgebiet der Onkologie einen Beitrag zu einem der wichtigsten sozioökonomischen Schwerpunkthemen im Bereich Gesundheit und der Hightech-Strategie 2025 der Bundesregierung, die sich innerhalb des Themas „Gesundheit und Pflege“ zum Ziel gesetzt hat, früh erkannte und behandelte Krebserkrankungen messbar zu erhöhen. Somit soll im Rahmen von MATCH der Grundstein für eine Verbesserung der diagnostischen Anwendungen in dem genannten Bereich gelegt werden. Einen Fokusbereich innerhalb der Krebsforschung und perspektivisch in der Krebsdiagnostik stellt aktuell die CTC-Quantifizierung im Blut dar, insbesondere weil die erhobenen Daten eine Prognose über das progressionsfreie- bzw. Gesamtüberleben der Patienten zulassen.

Durch verschiedene Pfade einer während der Projektlaufzeit erarbeiteten mehrstufigen, teilparallelisierten und fortgeschriebenen Ergebnistransfer- und Verwertungsstrategie, sollen Projektinhalte in die Anwendung überführt werden. Neben der onkologischen Forschung im Bereich der *liquid biopsy* kann das Gesamtsystem als Plattformtechnologie für die präklinische Forschung an seltenen Zellen in der pharmazeutischen Industrie Anwendung finden. Darüber hinaus werden im Zuge des Projektes Teilprodukte und Technologien entwickelt, deren Verwertung individuell und bereits begleitend zur Projektlaufzeit begonnen werden kann.

Die Verwertung der MATCH-Plattform als Gesamtsystem wird in Kombination mit der Verwertung einzelner Komponenten angestrebt. Probenanalysen auf Basis des Systems können als Dienstleistung in Kombination mit weiterführenden Supportleistungen wie Datenanalyse und Interpretation oder Speicherung dieser angeboten werden. MATCH kann somit den Grundstein für eine *End-to-End* Lösung im Bereich der CTC-Analyse legen. Ebenso ist eine Überführung der Plattform in andere Anwendungsbereiche der Detektion seltener Zellen (z. B. Immunologie, Schwangerschaftsvorsorge, Stammzelltherapie) denkbar. Dies kann insbesondere durch die Weiterentwicklung des Mikroskopie-Moduls auf Basis der MATCH-Plattform, aber auch getrieben durch individuelle Anpassungen und Erweiterungen an der Datenauswertung, geschehen.

Durch die Umsetzung des Forschungsziels und der angegliederten Arbeitshypothesen, wird ein System entstehen, das Alleinstellungsmerkmale im Vergleich zum aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik hat und gleichzeitig das Potenzial beinhaltet durch diverse Ansätze werthaltige Beiträge für kleine und mittelständische Unternehmen zu generieren.

Projektbegleitender Ausschuss

Unternehmen
arrows biomedical Deutschland GmbH ^{KMU}
Bartels Mikrotechnik GmbH ^{KMU}
Ferber-Software GmbH ^{KMU}
JÜKE Systemtechnik GmbH ^{KMU}

Kanano GmbH ^{KMU}
Laser 2000 GmbH ^{KMU}
LASOS Lasertechnik GmbH ^{KMU}
Localite GmbH ^{KMU}
microfluidic ChipShop GmbH ^{KMU}
Nanosurf GmbH ^{KMU}
OrgaTech Solution Engineering Consulting GmbH ^{KMU}
Professur am Institut für Klinische Pharmakologie
Quantum Design GmbH ^{KMU}
RWTH Aachen, Lehrstuhl für Biotechnologie
Sartorius Automated Lab Solutions GmbH
ysura GmbH ^{KMU}