

Kurzbeschreibung zum Forschungsantrag

Antragsteller

1. Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (IPTC)
Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen
Tel.: 07071-29-78753, Fax: 07071-29-5490, Email: gg@ipc.uni-tuebingen.de
2. Prof. Dr. Erwin Schleicher, Abt. Klinische Chemie/Zentrallabor am Universitätsklinikum
Tübingen (UKT), Hoppe-Seyler-Str. 3, D-72076 Tübingen
Tel.: 07071-29-80602, Fax: 07071-29-4696
Email: Erwin.Schleicher@med.uni-tuebingen.de

1 Forschungsthema

Entwicklung eines Vor-Ort-Analysensystems für organspezifische Notfalllaborparameter (Kurztitel: ACUTLAB)

2 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

2.1 Anlass für den Forschungsantrag und Ausgangssituation

Mit Hilfe von spezifischen Laborparametern können Organschäden frühzeitig, auch ohne klinische Symptomatik, erkannt werden. Diese klinisch akzeptierten Laborparameter werden in zentralisierten Laboratorien routinemäßig und in großer Zahl weltweit bestimmt, sie sind aber zurzeit nicht für die patientennahe Notfalldiagnostik verfügbar. Im geplanten Projekt soll eine Plattform für ein Vor-Ort-Analysesystem zur Detektion von organspezifischen Laborparametern entwickelt werden, die in einem tragbaren, netzwerkfähigen, robusten, quantitativ und schnell messenden, parallelisierten Analysegerät realisiert werden kann. Die spezifische Analysetechnik beruht auf Biosensortechnologie, die von der Probenmatrix relativ unbeeinflusst ist. Durch die Verwendung der „totalen inneren Reflexionsfluoreszenz“-Technologie (TIRF) lässt sich aus käuflichen Standardkomponenten die Analysenapparatur ohne den Verlust von analytischer Performance stark miniaturisieren. Die Prüfung des Konzepts soll beispielhaft mit Hilfe von zwei organspezifischen Laborparametern, die bislang noch nicht auf POCT-Geräten verfügbar sind, erfolgen: Cystatin C als Marker für die Nierenfunktion und Lipase für die Pankreasdiagnostik. Eine Übertragung auf andere Parameter ist möglich (z. B. Leberenzyme).

2.2 Stand der Forschung

Bedingt durch die Notwendigkeit, direkt am Patientenbett oder in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Patienten Analysen durchführen zu müssen, haben sich in den letzten Jahren neben den Zentrallaboratorien viele Gruppen einerseits mit dem Point-of-Care-Testing (POCT) beschäftigt, andererseits haben eine Reihe von Teststreifen und Sticks Eingang in den Markt der Diagnostiker gefunden. Diese Entwicklungen haben das Ziel, sowohl in Kliniken bei lebensbedrohlichen Notfallsituationen aus Laborwerten so zeitnah wie möglich diagnostische Erkenntnisse zu erhalten, als auch im ambulanten Bereich für die ärztliche Beratung von Patienten bis hin zur Patientenselbstkontrolle im Home-Care-Bereich neue Möglichkeiten zu eröffnen. Entsprechend hat sich in der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e. V. eine Arbeitsgruppe etabliert, die sich speziell mit POCT beschäftigt¹ (im Beirat vertreten). In Anlehnung an die erfolgreichen Glukosemessgeräte wurden Geräte entwickelt, die für quantitative oder halb-quantitative Einzelmessungen ohne Probenvorbereitung bei Einsatz von Vollblut oder Urin ohne Pipettierschritte unter Verwendung gebrauchsfertiger Reagenzien das Biosensorprinzip nutzen, um spezielle, einfach zu bedienende Messgeräte zu erhalten (z. B. Roche Diagnostics GmbH: AKKU-CHEK). Die in großer Menge auf dem Markt befindlichen POCT-Geräte sind vor allem Geräte, die einen Parameter, der für die Therapieüberwachung des Patienten wichtig ist, bestimmen können; die wichtigsten Beispiele sind Geräte zur Bestimmung von Blutzucker und des „Quick“ zur Überwachung der Antikoagulantientherapie.

¹ <http://www.dgkl.de/poct/index.html>

In eigenen Vorarbeiten konnten im Bereich der Fluoreszenzdetektion zahlreiche Arbeiten beigeleitet werden. So wurde die Spurenanalytik in Wasser mittels Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen bei Pestiziden, hormonaktiven Stoffen und auch Antibiotika im ng/l-Grenzbereich möglich. Dabei konnten in mehreren Projekten sowohl beim Einsatz optischer Komponenten als auch bei der Assayentwicklung langjährige Erfahrung gesammelt werden. Voraussetzung für die extrem niedrigen Nachweisgrenzen waren die Erfahrungen in der Oberflächenchemie. Darüber hinaus bestehen bei der Herstellung und Charakterisierung eigener Antikörper und deren Einsatz in der Immunhistochemie, Immunpräzipitation, ELISA, Westernblotting große Erfahrung. Dazu kommt die langjährige Tätigkeit in den Bereichen Entwicklung, Verbesserung und Evaluierung von Methoden und Laborparametern, insbesondere bei der Definition und Standardisierung von Labortests und Labororganisation.

3 Forschungsziel/Ergebnisse/Lösungsweg

3.1 Forschungsziel

Ziel des Projektvorhabens ist die Entwicklung eines neuen, benutzerfreundlichen Vorortanalysengerätes mit dem sich Laborparameter, die die Schädigung eines Organs anzeigen, quantitativ, reproduzierbar und präzise bestimmen lassen. Das Gerät, mit dessen Hilfe der Arzt oder eine medizinisch ausgebildete Hilfskraft die Analyse aus einer kleinen Blutprobe (ein oder wenige Tropfen) rasch ausführen kann, ist für den Einsatz vor Ort d. h. in der Nähe des Patienten vorgesehen. Die analytische Einheit beruht auf Biosensortechnologie. Die quantitative Detektion von Analyten soll nach spezifischer Bindung an z. B. Antikörpern über Fluoreszenz erfolgen. Zur spezifischen Anregung von fluoreszenzmarkierten Erkennungsstrukturen vor allem in komplexen Matrices (z. B. Serum, Blut) eignet sich TIRF (totale innere Reflexionsfluoreszenz).

3.1.1 Angestrebte Forschungsergebnisse

Auf Basis dieser Biosensortechnik soll eine Plattform für organspezifische Laborparameter als Grundlage für ein tragbares, vernetzbares, komplexes Diagnosesystems entwickelt werden. Für die praxisnahe Prüfung des Konzepts haben wir zwei Organe ausgewählt, für die es spezifische Laborparameter gibt, die aber nicht auf POCT-Geräten verfügbar sind:

1. Für die Beurteilung der Nierenfunktion dient die Plasmakonzentration von Kreatinin (gegebenenfalls zusammen mit Harnstoff) und wird bei Erstdiagnostik standardmäßig durchgeführt. Allerdings sind diese Nierenfunktionsparameter nicht auf den etablierten POCT-Geräten verfügbar. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die quantitative Bestimmung des Cystatin C ein zuverlässigerer Marker für die Beurteilung der Nierenfunktion ist. Allerdings konnte sich dieser Parameter bislang nicht allgemein durchsetzen, da die hierzu nötige immunologische Bestimmungsmethode viel teurer als die chemische Farbmethode für die Kreatininbestimmung ist.
2. Für die Beurteilung von Schäden des Pankreas, insbesondere bei Entzündung des Organs und zur Abgrenzung von anderer Akutsymptomatik (z. B. Herzinfarkt), werden zwei Laborparameter verwendet, die Pankreas-Amylase und die Pankreas-Lipase. Keiner der beiden Parameter ist auf erhältlichen POCT-Geräten etabliert. Da die Lipase Vorteile bezüglich der Spezifität und Sensitivität bietet, haben wir diesen Laborparameter ausgewählt.

3.1.2 Innovativer Beitrag der angestrebten Forschungsergebnisse

Speziell für den POCT-Bereich bieten sich Verfahren aus der Bioanalytik wegen ihrer Automatisierbarkeit und ihrer hohen Spezifität an. Besonders optische Messmethoden sind aufgrund ihrer Robustheit und einfachen Handhabung für die patientennahe Diagnostik gut geeignet. Dies gilt gleichermaßen für die Verwendung unterschiedlicher Biomarker, als auch für fluoreszenzbasierte Verfahren wie TIRF. Für hohen Durchsatz und große Probenzahlen sind sehr leistungsfähige Automaten am Markt verfügbar, allerdings zu nicht unerheblichen Investitionskosten.

Durch die Kombination der etablierten TIRF Methode mit diesen neuartigen einfachen Detektionsmodulen steht der Weg offen, erstmalig einen fluoreszenzbasierten Biosensor im Be-

reich der POCT Diagnostik einzusetzen, der dabei robuste und miniaturisierte Detektion mit extrem einfachen und kostengünstigen Verbrauchsmaterialien vereinbart. Eine wesentliche Anforderung an ein Gerät ist es, dass die mit Testmaterial (Vollblut, Plasma, Serum) in Kontakt tretenden Teile als Einmalartikel ausgelegt werden. Die Probenmenge muss sich auf einige wenige Mikroliter beschränken und eine Messung sollte innerhalb kurzer Zeit (60 – 200 s) abgeschlossen sein.

3.2 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

3.2.1 Methodischer Ansatz

Aufgaben des IPTC sind die Assayentwicklung für die gewünschten Parameter, da jeder Parameter wegen seiner speziellen Antigen/Antikörper-Wechselwirkung immunologisch unterschiedliche Rahmenbedingungen erfordert und die notwendige Erfahrung zur Optimierung auch für niedrige Konzentrationsbereiche gesammelt werden muss. Als Testformat soll der Bindungshemmtest oder ein Sandwich Assay eingesetzt werden. Die Fluidik muss, da die Entwicklung auf ein „Hand-held-Gerät“ abzielt, möglichst einfach strukturiert sein. Außerdem ist eine eigene Datenverarbeitung notwendig. Nachdem diese Geräte zunächst funktionsfähig gemacht wurden, müssen sie nach analytischen Kriterien validiert werden, da diese Qualitätssicherungsmaßnahmen Voraussetzung für den späteren Einsatz sind (externe und interne Qualitätssicherung).

Erste Aufgabe des UKT-Partners ist die Bereitstellung von spezifischen Bindungspartnern für Cystatin C und die Lipase. Das soll u.a. durch Generierung von monoklonalen Antikörpern geschehen. Diese Antikörper werden dann auf ihre Affinität und Spezifität geprüft und gegebenenfalls mit kommerziell verfügbaren Antiseren verglichen. Besonderes Augenmerk wird auf die Funktionalität in Plasmamatrix und dessen Variabilität gelegt. Mit Hilfe der ausgewählten Antikörper wird vom Partner IPTC ein Assay aufgebaut, der bereits im frühen Stadium auf seine Tauglichkeit für die Analytik mit Blutproben getestet wird. Nach Abschluss dieser Entwicklungsarbeiten wird die technische Performance des jeweiligen Tests d. h. Nachweisgrenze, Wiederfindung, Messbereich, Reproduzierbarkeit, Unpräzision, analytische Spezifität und Sensitivität und der Einfluss der wichtigsten Störfaktoren wie Lipämie, Hämolyse, Bilirubin untersucht. Die Qualität der Messungen (Präzision und Richtigkeit) wird dann weiter mit Hilfe von Kontroll- und Richtigkeitsseren, die die Parameter in verschiedenen Bereichen (niedrig, normal, hoch) enthalten, untersucht. Anschließend wird der Einfluss der Probenmatrix (Hämatokrit, Dysproteinämie u.ä.) überprüft. Es wird auch untersucht, ob sich das Messverfahren für andere Körperflüssigkeiten wie z. B. Punktate eignet. Bei der Evaluierung wird darauf geachtet, dass das Gerät auch von „ungeübtem“ Personal (z.B. durch Krankenschwester vor Ort) zu bedienen ist.

3.2.2 Arbeitsdiagramm und Finanzierungsplan

Arbeitspaket	
1. Geräteentwicklung	Aufbau eines auf TIRF basierenden Biosensors als Funktionsmuster bestehend aus Transduktionseinheit und Fluidik unter Berücksichtigung einer Übertragbarkeit in ein Hand-held-Gerät
2. Software	Die SW beinhaltet die Hardwareansteuerung, Datenerfassung- und Auswertung incl. Plausibilitätsabfragen
3. Antikörper	Es werden monoklonale Antikörper gegen Cystatin C und Lipase generiert und validiert
4. Oberflächenchemie	Durch den Einsatz von Biopolymerbeschichtungen der Transducer sollen unspezifische Wechselwirkungen bei gleichzeitiger Maximierung des Nutzsignals unterdrückt werden
5. Assayentwicklung	Aufbau von Klinischen Assays für die Parameter Cystatin C und Lipase aus biol. Matrices in klinisch relevanten Konzentrationsbereichen

6. Validierung	Klinische Validierung der Funktionsfähigkeit des automatisierten Biosensors mit Realproben unter Realbedingungen. Hierbei werden GxP Bedingungen bzw. statistische Methoden zur Qualitätssicherung beachtet
----------------	---

Finanzierungsplan

Unter Berücksichtigung von Eigenmitteln in Höhe von € 5000 pro Partner und Aufwendungen der Industrie als Sachmittel sowie Kosten für die Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses ergibt sich folgender Gesamtfinanzierungsplan:

Posten	Kosten [€]
Personal IPTC	138.340
Personal UT-UKT	138.340
Sach- und Reisemittel (IPTC)	42.760
Sach- und Reisemittel (UT-UKT)	27.660
Summe	347.100

4 Nutzen und wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)

4.1 Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse

Obwohl die internationalen Konzerne im Diagnostik Markt, wie weiter oben bereits aufgeführt, sich ebenfalls im POC Markt engagieren, stellt dieser Bereich doch bis heute ein aussichtsreiches Marktfenster für KMUs dar. Das liegt hauptsächlich daran, dass mit neuartigen Parametern und Anwendungen zunächst attraktive Nischenmärkte adressiert werden, deren absolutes Volumen für Großfirmen allerdings nicht lukrativ erscheint. Auch die verwendete Messtechnik ist häufig eine Domäne für kleinere oder mittelständische High-Tech Firmen, die flexibel auf die spezifischen Anforderungen reagieren können. Von daher kann erwartet werden, dass die erfolgreiche Entwicklung eines Konzepts aus diesem Forschungsprojekt das Interesse nach kommerzieller Umsetzung von KMUs finden wird. Dabei sind verschiedene Szenarien denkbar: es können Firmen aus der Reagenzienindustrie sich für die Produktentwicklung von notwendigen Kits und ggf. den optischen Chip, also um die Verbrauchsmaterialien, interessieren werden, während Gerätebauer sich um das eigentliche Lesegerät kümmern. Der Marktzugang in dieser Konstellation kann über eine der am projektbegleitenden Ausschuss beteiligten Firmen erfolgen, oder durch einen Handelspartner, der auf den Vertrieb solcher Produkte spezialisiert ist, womit ein dritter Sektor von den Ergebnissen profitieren kann.

4.2 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Die Entwicklung von POCT Systemen läuft global auf breiter Front. Ein Schlüssel für einen dauerhaften Erfolg liegt in der Wahl der analytischen Markermoleküle. Diese sind nicht beliebig verfügbar, so dass sich ein Marker oder Satz von Markern sehr schnell etabliert und dasjenige Unternehmen einen signifikanten Marktvorsprung einnehmen kann, welches diese Marker erstmals in einem kompletten System auf den Markt bringt. Durch die Förderung des von den Antragsstellern vorgestellten Konzepts und durch einen konsequenten Transfer der Ergebnisse zur Wissenschaft und vor allem zu KMUs können letztere vor der globalen Konkurrenz ein System im Markt einführen. Im hier beschriebenen Fall ist eine zusätzliche

Stärkung der Leistungsfähigkeit von KMUs dadurch gegeben, dass es nicht auf die Detektion von Markern für Nieren- oder Pankreas Erkrankungen beschränkt bleiben muss, sondern KMUs das selbe Konzept auf weitere Organerkrankungen ausdehnen können.

5 Beabsichtigter Transfer der angestrebten Forschungsergebnisse

Die Beteiligung von einschlägigen Firmen im Beirat zu diesem Projekt soll einen wesentlichen Baustein beim Transferprozess der Forschungsergebnisse in Richtung Kommerzialisierung darstellen. Es wird angestrebt, die Ergebnisse nicht nur auf wissenschaftlichen Veranstaltungen sondern auch und vor allem auf kommerziell orientierten Symposien und Workshops durch aktive Beiträge bekannt zu machen. Hierzu gibt es zahlreiche Möglichkeiten auf internationalen Ausstellungen wie der Analytica (2010) in München, der jährlich stattfindenden Biotechnica oder den Satellitenveranstaltungen der jeden November abgehaltenen Medica. Auch Fach- und Interessensgruppen der Diagnostiker, sowie die Kostenträger bieten zum Thema POCT vielfältige Präsentationsmöglichkeiten für neuere Ergebnisse. Am Transfer zur industriellen Nutzung wird auch die im Beirat vertretene Life Science Beratungsfirma aktiv beteiligt sein.

Unterschriften

Ort, Datum

Rechtsverbindliche Unterschriften des Antragstellers IPTC

Ort, Datum

Rechtsverbindliche Unterschriften des Antragstellers UKT