

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

Nr. 1, Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Nr. 2, Eberhard Karls Universität Tübingen, Universitätsklinikum Zentrallabor, Abteilung Klinische Chemie

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **16696 N/1+2**

***Entwicklung eines Vor-Ort-Analysesystems für organspezifische Notfallparameter -
ACUTLAB***

(Bewilligungszeitraum: 01/2011 - 06/2013)

der AiF-Forschungsvereinigung

Forschungsvereinigung Feinmechanik, Optik und Medizintechnik e.V. (F.O.M.)

Tübingen, den 27-09-2013

Ort, Datum

Prof. Dr. Günter Gauglitz

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Tübingen, den 27-09-2013

Prof. Dr. Erwin Schleicher

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Gegenüberstellung der Ziele und der erreichten Ergebnisse

<i>Ziel</i>	<i>Ergebnis</i>
<ul style="list-style-type: none"> Charakterisierung und Selektion geeigneter immunologischer Erkennungsstrukturen der Antigene Pankreas-Lipase und Cystatin C; Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen diese Antigene; 	<ul style="list-style-type: none"> Nach Selektion von verschiedenen antigenen Aminosäuresequenzen in Lipase und Cystatin C wurden Mäuse zur Generierung monoklonaler Antikörper immunisiert. Nach Vortestung der gewonnenen Hybridomaüberstände wurden die positiven Klone expandiert und die erhaltenen monoklonalen Antikörper auf ihre spezifische und sensitive Erkennung der Antigene geprüft. Wir erhielten zwei Klone die native humane Pankreaslipase sensitiv detektieren konnten. Ein Vergleich von Patientenproben, die mit einer klinisch-chemischen Routinemethode gemessen wurden, zeigte eine sehr gute Korrelation.
<ul style="list-style-type: none"> Entwicklung eines immunologischen Schnelltest zum Nachweis von Pankreas-Lipase als Marker der Bauchspeicheldrüsen-Funktion. 	<ul style="list-style-type: none"> Für die immunologische Bestimmung der Pankreas-Lipase-Konzentration wurde der Bindungs-Hemmtest ausgewählt, da dieses Testformat die erfolversprechendsten Ergebnisse lieferte. Die Oberflächen-modifizierung der Glas-Transducer wurde unter Verwendung eines Biopolymers optimiert und die Erkennungsstruktur konnte kovalent immobilisiert werden. Eine Quantifizierung der Lipase in Puffer unter physiologischen Bedingungen war erfolgreich und lieferte eine untere Nachweisgrenze von 348 µg/L (MDL-Wert).

<ul style="list-style-type: none">• Entwicklung eines immunologischen Nachweises zur Messung von Nierenfunktionsstörungen über die Konzentration an Cystatin C.	<ul style="list-style-type: none">• Zur Quantifizierung von Cystatin C in humanem Plasma konnte erfolgreich eine Oberflächenmodifikation für Glas-Transducer etabliert werden, die es erlaubt den Parameter im geforderten Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 5 mg/L zu messen. Dazu wurden die Chips mit Biopolymer beschichtet, über das die Erkennungsstruktur kovalent angebunden werden konnte. Auf dieser Basis wurde ein Bindungsinhibitionstest für Cystatin C etabliert. Der entwickelte Test liefert innerhalb von 10 min einen zuverlässigen Konzentrationswert für Cystatin C auf der im Projekt entwickelten Messplattform.
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Etablierung einer kompakten analytischen Plattform mit geeigneter Mikrofluidik und Detektionsmodulen, sowie einer Softwareschnittstelle zur Steuerung der Messung.

- Die entwickelte Sensorplattform besteht aus kommerziell erhältlichen, hochpräzisen Mikrofluidik-Komponenten, einem kompakten Fluoreszenz-Detektor, sowie einer einfachen Laserdiode. Die Mikrofluidik setzt sich zusammen aus einer Spritzenpumpe zur punktgenauen Dosierung der Probenvolumina bis 0,5 mL, sowie einem 8-Wege-Ventil, das die Adressierung verschiedener Reagenzien- und Probenbehälter erlaubt. Der verwendete Sensorchip wird in einer Flusszelle aus PMMA fixiert und kann als Einweg-Chip oder für Mehrfachmessungen verwendet werden. Zur Detektion wird ein kommerziell erhältlicher Fluoreszenz-Detektor mit konfokaler Optik verwendet. Als Lichtquelle kommt eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 640 nm und einstellbarer Ausgangsleistung zum Einsatz. Alle verwendeten Komponenten bieten die Möglichkeit einer weiteren Miniaturisierung im Rahmen einer industriellen Fertigung. Das Gerätefunktionsmuster lässt sich über eine gemeinsame Softwareschnittstelle ansteuern, bei der besonderes Augenmerk auf eine eingängige Bedienoberfläche gelegt wurde.

1 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projekts ACUTLAB wurde ein innovatives Vor-Ort-Analysensystem für organspezifische Notfalllaborparameter entwickelt. Das System ermöglicht die Quantifizierung von humanmedizinisch relevanten Parametern aus Blutplasmaproben bei Verdacht auf Organschäden. Die Messung erfolgt innerhalb weniger Minuten und benötigt keine weitergehende Behandlung der Plasmaproben. Durch die Kompaktheit des Aufbaus ist es möglich, das Gerät patientennah einzusetzen. Eine leicht zugängliche Benutzeroberfläche erlaubt eine Bedienung durch ungeschultes Personal.

Das Gerätekonzept wurde durch kommerziell erhältliche, miniaturisierte Komponenten realisiert, welche im Rahmen einer industriellen Fertigung noch weitere Miniaturisierung zulassen. Es konnte gezeigt werden, dass das optische Messprinzip eine empfindliche und schnelle Detektion der Analytkonzentrationen auch in komplexen Matrices (Blutplasma) erlaubt. Die mikrofluidischen Komponenten gewährleisten einen exakt reproduzierbaren Messablauf und damit verlässliche Testergebnisse. Eine im Projekt entwickelte Software-Oberfläche ermöglicht die automatisierte Messung von Proben und bietet eine gemeinsame Schnittstelle für alle beteiligten Komponenten.

Ein wichtiges Element innerhalb des Projekts war die Entwicklung der serologischen Schnelltests auf Pankreas-Lipase zur Erkennung von Bauchspeicheldrüsenschädigungen, sowie auf Cystatin C zur Diagnose von Nierenfunktionsstörungen. Da das verwendete Testformat auf der Wechselwirkung zwischen einem spezifischen Antikörper und dem Analytmolekül beruht, war eine wichtige Aufgabe die Charakterisierung verschiedener Antikörper-Typen durch die Forschungsstelle UKT. Desweiteren wurde zur Etablierung dieser Immunoassays die Oberflächenmodifikation der optischen Glastransducer untersucht und optimiert. Hier konnten für beide Zielmoleküle eine Beschichtung der Sensoroberfläche durch Biopolymere erreicht werden, die reproduzierbare Messsignale und Mehrfachmessungen durch Regenerierbarkeit ermöglicht. Es konnten Kalibrierkurven sowohl für die Pankreas-Lipase als auch für Cystatin C gemessen und damit Detektions- und Quantifizierungsgrenzen bestimmt werden.

Durch reale Patientenproben, die vom Zentrallabor des UKT zur Verfügung gestellt wurden, konnte eine erste erfolgreiche Validierung sowohl des Messgeräts, als auch des entwickelten Sensorchips durchgeführt werden.

2 Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

2.1 Publikation in international anerkannten Journalen (peer-reviewed)

- Label-free quantification of cystatin C as an improved marker for renal failure
O. Bleher, M. Ehni, G. Gauglitz, *Anal Bioanal Chem*, **402(1)**, 349-356 (2012)
- Rapid Point-of-Care testing of kidney failure in human plasma matrix O. Bleher, K. Krieg, E. Schleicher, G. Gauglitz, *Analytical Chemistry* (in preparation)
- A new approach to detect human pancreatic lipase concentrations with an optical sensor for pancreatitis diagnosis. *Anal Bioanal Chem* (in preparation)

2.2 Beiträge auf internationalen Konferenzen

- „Entwicklung eines Immunoassays für die Notfalldiagnostik bei akutem Versagen der Bauchspeicheldrüse“, Katrin Krieg, Günter Gauglitz, ANAKON 2013 Essen, März 2013 **(Vortrag)**
- Quantifizierung eines neuen Nierenfunktionsparameters mit markierungsfreier optischer Sensorik, Oliver Bleher, Günter Gauglitz, Interdisziplinäres Doktoranden-Seminar, Attendorn, Februar 2011 **(Vortrag)**
- Quantifizierung von Cystatin C mit Totaler Interner Reflexions Fluoreszenz zur Point-of-Care Diagnostik, Biosensorsymposium, März 2013, TH Wildau **(Poster)**
- Development of emergency diagnostics for acute pancreatic failure, Europtrode XI Barcelona, April 2012 **(Poster)**
- Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate mittels markierungsfreier optischer Sensorik, ANAKON, März 2011, Zürich **(Poster)**
- Label-free optical detection of Cystatin-C as a parameter for renal function, Euroanalysis, September 2011, Belgrad, **(Poster)**

3 Arbeitspakete

AP1: Geräteentwicklung

AP2: Software

AP3: Antikörper

AP4: Oberflächenchemie

AP5: Assayentwicklung

AP6: Validierung

Die Arbeitspakete A1-A2 und A4-A5 wurde hauptsächlich von der Arbeitsgruppe Prof. G. Gauglitz an der Universität Tübingen durchgeführt, wohingegen das Arbeitspaket AP3 hauptsächlich von der Arbeitsgruppe Prof. Schleicher vom Zentrallabor des Uniklinikums Tübingen durchgeführt wurde. Das Arbeitspaket AP6 wurde von beiden Projektpartnern gemeinsam durchgeführt.

5 Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens

Maßnahme	Ziel / Rahmen	Details	Datum / Zeitraum
Vorstellung auf wissenschaftlichen Symposien; Bereich Analytik, Bioanalytik	Ergebnistransfer durch Vorträge bzw. Poster in wissenschaftliche Fachkreise und die Wirtschaft	Die Ergebnisse wurden auf nationalen, wie auch internationalen wissenschaftlichen Veranstaltungen präsentiert.	ANAKON – Zürich (März 2011); Euroanalysis – Belgrad (September 2011); Eurotrode XI - Barcelona (April 2012); Biosensorsymposium – Wildau (März 2013); ANAKON – Essen (März 2013);
Vorstellung auf Veranstaltungen zur Information der Öffentlichkeit	Ergebnistransfer an Endanwender bzw. die interessierte Öffentlichkeit	Die Ergebnisse wurden einem breiten Publikum präsentiert.	Innovationstag Mittelstand des BMWi – Berlin (Mai 2013)
Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	Ergebnistransfer in wissenschaftliche Fachkreise und die Wirtschaft	Wissenschaftliche Publikation in einer anerkannten Fachzeitschrift wie z.B. Analytical and Bioanalytical Chemistry	Veröffentlichung im Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry (2012)
Projektbegleitender Ausschuss (PA)	Diskussion der Forschungsergebnisse mit dem PA	Die Beteiligung von einschlägigen Firmen im PA stellte einen wesentlichen Baustein beim Transferprozess der Forschungsergebnisse in Richtung Kommerzialisierung dar. Es fanden 5 Projekttreffen mit dem PA statt.	2. Quartal, Jahr 2011 4. Quartal, Jahr 2011 3. Quartal, Jahr 2012 4. Quartal, Jahr 2012 2. Quartal, Jahr 2013

5.2 Transfermaßnahmen nach der Laufzeit des Vorhabens

Maßnahme	Ziel / Rahmen	Details	Datum / Zeitraum
Vorstellung auf kommerziell orientierten Symposien und Workshops; Bereich Analytik, Bioanalytik, medizinische Analytik	Ergebnistransfer in die Wirtschaft durch aktive Beiträge, Vorträge, Poster und auch Vorführungen des Funktionsmusters vor Fachpublikum	Dies wird zudem von der Universität Tübingen logistisch und finanziell unterstützt durch die Abteilung Forschungskontakte und Technologietransfer.	Analytica 2014 Vortrag o. Poster
Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	Ergebnistransfer in wissenschaftliche Fachkreise, die Wirtschaft und an Laborpersonal	Wissenschaftliche Projektzusammenfassung in einer wissenschaftlich anerkannten Zeitschrift. Mindestens zwei weitere Publikationen.	2. Quartal 2014
Weiterbildung von Fachpersonal	Ergebnistransfer in medizinische Fachkreise / Wirtschaft durch Fortbildung	Es wurde ein dreitägiger Workshop zur Thematik durchgeführt, auf dem auch auf das Projekt hingewiesen wurde.	Workshop „Trends in Diagnostics“ (Oktober 2013)
Vorstellung auf Veranstaltungen für die breite Öffentlichkeit	Vorstellung der Projektergebnisse gegenüber Fachkreisen/ Wirtschaft/ Öffentlichkeit	Teilnahme mit einem Poster, wobei die Reisekosten nach Ende der Projektlaufzeit aus anderen universitären Mitteln gedeckt wurden.	F.O.M. Konferenz "Von der Idee zur Innovation" (November 2013)

Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben 16696N der Forschungsvereinigung F.O.M. Forschungsvereinigung Feinmechanik, Optik und Medizintechnik e.V., Werderscher Markt 15, 10117 Berlin wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages