

Schlussbericht zum Vorhaben
„Design, Herstellung und Test des Mikrofluidik-Moduls“

im Rahmen des Eurostars Projekts
E! 115649 AMI-CARINA
„Neuartiges Point-of-Care-Biosensorsystem für die Frühdiagnose des akuten Myokardinfarkts“

Dr. Natalia Beshchasna, Dr. Dmitry Belyaev

Fraunhofer-Institut für keramische Technologien und Systeme IKTS
Maria-Reiche-Straße 2, 01109 Dresden

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Förderkennzeichen: 01QE2139C

Projektlaufzeit: 01.12.2021 – 31.05.2025

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine der Haupttodesursachen in Industrieländern. AMI-CARINA zielt darauf ab, ein Point-of-Care-Testgerät (POCT) zu entwickeln, das auf der Kombination eines digitalen Enzymimmunoassays (DELISA) und eines mikrofluidischen Biosensors mit einem Plasmentrennverfahren basiert und eine hochempfindliche Erkennung von AMI-Biomarkern im Blut ermöglicht. Das Hauptergebnis von AMI-CARINA ist ein hochempfindliches und hochspezifisches DELISA-basiertes POCT-Gerät für die schnelle und zuverlässige Diagnose von AMI, vor allem für Notfallpatienten mit Brustschmerzen. Es besteht aus einem Mehrweg-Lesegerät mit einem hochauflösenden optischen System und einem Detektionsalgorithmus mit künstlicher Intelligenz (KI) sowie einem mikrofluidischen Einweg-Biosensor.

Das Ziel des Teilprojektes IKTS bestand darin, ein Mikrofluidik-Modul zur passiven Separation von Blutserumbestandteilen zu entwickeln, zu herstellen und zu testen. Um eine hohe Selektivität des Biosensors zu erreichen, wurde ein passives Filterverfahren, sog. deterministisches laterales Verschiebungs-Array (Deterministic Lateral Displacement, DLD) angewendet. So ist es möglich, Partikel oder Zellen gewünschter Größe und Geometrie herauszufiltern, um einen möglichst störungsfreien Transport von Analyten zum Sensorbereich zu gewährleisten. Die DLD-Methode nutzt die Geometrie von PDMS-Säulen, die die Teilchen von ihrer ursprünglichen Trajektorie in einer speziellen Weise ablenken. Um das Trennprinzip für eine konkrete Anwendung (Partikelgröße) anzuwenden, müssen spezifische Parameter von DLD-Arrays (Säulendurchmesser, horizontaler Säule-zu-Säule-Abstand, Spaltabstand, Mitte-zu-Mitte-Entfernung und andere) definiert werden. Für die Entwicklung des Mikrofluidikdesigns wird die Clewin-Software genutzt. Das Sauerstoffplasmaverfahren wird verwendet, um die DLD-Arrays auf einem Sensor-Substrat zu befestigen.

Der Bericht stellt die wesentlichen wissenschaftlichen und technischen Ergebnisse aus der Bearbeitung des Teilprojektes des Fraunhofer IKTS dar. Der Bericht bezieht sich auf den Projektzeitraum 01.01.2021 – 31.05.2025.

Keywords

Hochempfindliche Point-of-Care Diagnostik-Plattform, deterministische laterale Verschiebungs-Array (DLD), Mikrofluidikdesign, akuter Myokardinfarkt, Biosensor, Biomarker, digitaler ELISA-Test.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

1.1 Aufgabenübersicht

Zu den Hauptaufgaben des IKTS im Verbundvorhaben gehört

- **Im Arbeitspaket 1:** Spezifikation für DELISA-basiertes AMI-POCT-Gerät und regelmäßige Aktualisierung
 - Realisierung der spezifischen Recherche mit Fokus auf das Projektziel mit Einbezug des Lastenheft mit den jeweiligen Konzentrationsbereichen und geforderten Materialeigenschaften
 - Definition der Anforderungen an das Messsystem mit dessen Spezifikation. Identifikation und Auswahl geeigneter Materialien und systematischer Vorgehensweisen zur Erfüllung der aufgeführten Anforderungen
 - Demonstrator-Konzept (Sensorelement, Sensorkpaket, Datenerfassung, Kalibrierungskonzepte). Aus den Möglichkeiten wird für jeden Schritt und jede Komponente die beste Variante gewählt
 - Leistungsbeschreibung für das Projekt und Lastenheft für die Demonstrator-Umsetzung
 - Regelmäßige Evaluierung der Patentsituation und Vermarktungschancen
 - Regelmäßige Aktualisierung der Spezifikation während der gesamten Projektlaufzeit

- **Im Arbeitspaket 3:** Umsetzung und Validierung des Biosensor-Systems
 - Vergleich der Biosensorleistung mit der Spezifikation und Bestimmung von Optimierungsschritten für das Mikrofluidiksystem
 - Leistungsbewertung und Verifizierung des verbesserten Biosensor
 - Leistungstest des Biosensorsystems

- **Im Arbeitspaket 4:** Design Herstellung und Analyse des Mikrofluidik-Systems
 - Entwicklung eines Mikrofluidikchipdesigns auf Basis von PDMS, LTCC oder deren Kombination
 - Design und Test von passiven DLD-Filter-Arrays
 - Numerische Simulation von passiven Filterungsprozessen in der DLD-Mikrofluidik
 - Test und Analyse von Mikrofluidikchips unterschiedlicher Designs
 - Technologieoptimierung

1.2 Stand der Arbeiten im Arbeitsplan IKTS

Alle Arbeiten haben einen guten Stand der Bearbeitung. In der nachfolgenden Tabelle (Abb. 1) sind die Arbeitspakete mit Status aufgelistet.

Arbeitspaket	Status
AP 1 Spezifikation für DELISA-basiertes AMI-POCT-Gerät und regelmäßige Aktualisierung	abgeschlossen

Abb. 1 Status der Bearbeitung von Arbeitspaketen IKTS

1.3 Beschreibung der Projektergebnisse in den Arbeitspaketen IKTS

1.3.1 Arbeitspaket 1: Spezifikation für DELISA-basiertes AMI-POCT-Gerät und regelmäßige Aktualisierung

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde das Anforderungsprofil für das DELISA-basierte AMI-POCT-Gerät und die einzelnen Komponenten festgelegt und in Abbildung 2 zusammengefasst. Die wichtigsten Parameter für die Biomarker und Biorezeptoren, den Biosensor, den mikrofluidischen Chip, das hochauflösende optische Auslesesystem, die Software und die KI-basierte Datenerkennung sowie die klinische Leistung wurden analysiert und dokumentiert. Die anfänglich definierten Parameter werden im Laufe des WP-Fortschritts bei Bedarf unter Berücksichtigung neuer experimenteller Daten, Optimierung- und Verbesserungsmöglichkeiten präzisiert und angepasst. Der Biosensor auf der Grundlage des gewählten cTnI-Antikörpers oder Aptamers sollte eine Nachweisgrenze (LOD) von 1 pg/ml und eine Bestimmungsgrenze (LOQ) von 10 pg/ml aufweisen und auf ein Molekulargewicht von 24 kDa ausgerichtet sein. 30 µl einer Vollblutprobe werden innerhalb von 30 Minuten direkt auf dem Einweg-PMMA-Chip (Prototyping in PDMS) verarbeitet. Die Vorverarbeitung der Vollblutprobe erfolgt direkt auf dem Chip: Mittels deterministischer Seitenverschiebung wird das Vollblut vom Blutplasma (Analyte) getrennt. Eine vorberechnete Säulanordnung und spezielle Pumpbedingungen ermöglichen die Trennung von Partikeln (Zellen), die größer als der kritische Durchmesser von 6 µm sind. Nach dem Bindungsereignis erfolgt die Detektion durch ein hochauflösendes optisches Auslesesystem mit LED (RGB) mit einer optischen Auflösung von 1,2 µm, das durch eine AI-basierte Software innerhalb von 5 Minuten mit einer Genauigkeit von 95 % verbessert wird. Für spätere Phasen wurden Spezifikationen für die klinische Leistung festgelegt: der Variationskoeffizient bei der LOQ ist < 10 %, der Korrelationskoeffizient (r) mit der zentralen Labormethode ist > 0,9 und der Unterschied zwischen dem neuen Gerät und der zentralen Labormethode auf der medizinischen Entscheidungsebene (20 oder 30 pg/ml) ist < 20 %.

Parameter/ Eigenschaften	Werte/ Information	Notizen
Ausgewählte cTnI-spezifische Antikörper	Antikörper oder Aptamere	Für jeden gewählten Antikörper
Nachweisgrenze (LOD)	1 pg/ml	-/-
Quantifizierungsgrenze (LOQ)	10 pg/ml	-/-
Konzept der Biosensorik	Optisches Lesegerät + Kassette + AI-Software + grafische Benutzeroberfläche	-/-
Messprinzip / Analyt	Optischer Nachweis des gebundenen Analyten an vorläufig funktionalisierte µ-Partikel	-/-
Aptamer Bindungsstrategie	TBU	TBU

Abb. 2 Spezifikation für DELISA-basiertes AMI-POCT-Gerät

Probenmatrix	Vollblut	Abtrennung von Vollblut und Plasma auf dem DLD-Chip des Systems
Sensorleistung	Innerhalb von +/- 5 CV%	TBU
Typ (Einweg/ Mehrweg)	Einweg (PMMA)	Gegenwärtiger Stand: weder PDMS noch LTCC sind für Einweganwendungen geeignet, PMMA ist geeignet
Erforderliches Probenvolumen für die Messung	30 µl	Derzeit werden 30 µl Plasma (Serum) verwendet.
Nachweisempfindlichkeit (optische Auflösung, Analytenkonzentration)	Optische Auflösung : 1.2µm Analytische Konzentration. : 10pg/ml	TBU
Betrieblicher Messbereich Untere Nachweisgrenze Obere Nachweisgrenze/Bereich	Untere Nachweisgrenze : 10pg/ml, Obere Nachweisgrenze : 1 or 10ng/ml	TBU
Durchlaufzeit pro Probe	~ 30 min	Von der Blutabnahme bis zum Ausdruck/Export der Ergebnisse
Messzeit des Geräts	~ 10 min	Vom Einsetzen des Chips bis zum Export der Ergebnisse
Biokompatibilität (erforderlich/nicht erforderlich)	Nicht erforderlich	Do not use prohibited substances
Sterilisation (erforderlich/nicht erforderlich)	Nicht erforderlich	IVD
Zulässiger Temperatur- und Feuchtigkeitsbereich	~ 42°C ~ 70%	TBU
Empfohlene Lagerungsbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit)	RT, 50%	TBU
Stabilität von Aptameren	Höher als bei Antikörpern	TBU
Verwaltung von Messdaten	AI-Software-Verarbeitung, Mustererkennung	TBU
Integration von Mikrofluidik (ja/nein)	Ja	TBU
Transparenz	Ja	TBU
Robustes Gehäuse für Kartusche (ja/nein)	Robuste Kartusche (PMMA)	TBU
Verpackung	Ja	TBU
Elektrische Anforderungen	Nein	TBU

Beschriftung	Nein	TBU
Chip Material	PMMA	Prototyping in PDMS und LTCC
Chip Dimensionen (L x W x H)	75 mm x 25 mm x 1.7 mm veränderbar	Physisch
Größe der Partikelfiltration	6 µm	Vollblutfiltration (analog zum Zentrifugieren)
Art der Filtration	Piezo-mechanical or Deterministic lateral displacement (DLD)	Optimaler Ansatz auf Grundlage der Leistung gewählt. Filtrationsteil kann vom Hauptchip getrennt werden. Aber Endziel ist die Integration.
Elektrische Eigenschaften (piezo)	TBU	TBU
Abmessungen der Kanäle	Höhe = 50~100 µm Breite = 2.5mm Volumen ≈ 12µl	Kanalhöhen, Breite, Gesamtvolumen
Lichtquelle	LED (RGB)	3 x 3 arrays
FoV (Area of capture image)	4 mm ²	TBU
Optical resolution	1.2 µm	TBU
Bildverarbeitung	AI software	Software-Datenverarbeitung, Bildoptimierung
Anzahl der Zyklen für Deep Learning	TBU	TBU
Durchlaufzeit	~5min	TBU
Genauigkeit (%)	95%	TBU
Weiterentwicklung(%)	TBU	TBU
Variationskoeffizient (%) für die LOQ	< 10%	TBU
Korrelationskoeffizient (r) zur zentralen Labormethode	> 0.9	TBU
% Unterschied zwischen dem neuentwickelten Produkt und der herkömmlichen Labormethode auf medizinischer Entscheidungsebene (20 oder 30 pg/ml)	< 20%	TBU

1.3.2 Arbeitspaket 4: Entwurf, Herstellung und Analyse von Mikrofluidiksystem

Dieses Arbeitspaket konzentriert sich auf die Entwicklung und Herstellung verschiedener mikrofluidischer Designs, die auf der Verwendung von Polydimethylsiloxan (PDMS), Niedertemperatur-Keramik (LTCC) oder einer Kombination dieser Materialien basieren.

Verpackungslösungen für die Festlegung des geeigneten mikrofluidischen Designs werden auf die Sensorfunktionalität ausgerichtet sein.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

1.3.2.1 Mikrofluidik

Mikrofluidik befasst sich mit den Eigenschaften von Flüssigkeiten im Submillimeterbereich unter Einbezug der Technologie zur Herstellung mikroskopisch kleiner Geräte mit Flüssigkeitskanälen und -kammern. Die Mikrofluidik findet Anwendung in der Molekularanalyse, der Molekularbiologie [1] der Arzneimittelentwicklung [2] und der klinischen Diagnostik [3]. Mikrofluidische Geräte bieten für die Sensor-Applikation folgende Vorteile: Detektion mit hoher Auflösung und Sensitivität bei kürzerer Analysezeit, Verwendung kleiner Probenmengen, Kosteneffizienz, Energieeffizienz, einfache Kontrolle der Analyten-Konzentration, Flexibilität in der Designanpassung, einfache Überwachung der Umgebungsparameter, Tragbarkeit, Transparenz und hohe Durchsatzleistung [4]. Sensoren auf Mikrofluidik-Basis können für schnelle Diagnostik und Behandlung von humanen Krankheiten effektiv verwendet werden. Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von Fluiden im Mikrobereich, im Vergleich zum Makrobereich, ist der Durchfluss laminar. Dadurch wird eine bessere Strömungskontrolle sowie Stromlinienmanipulation ermöglicht. Jedoch wird die Vermischung von Flüssigkeiten zu einer Herausforderung, da sämtliche Strömungsunregelmäßigkeiten, die zur Durchmischung der Flüssigkeiten erforderlich sind, gedämpft werden. In Anbetracht dessen spielt die Diffusion eine wesentliche Rolle.

Die Herstellung mikrofluidischer Strukturen beinhaltet mehrere Schritte: Substratvorbereitung, Maskenherstellung, Photolithographie und weiche Lithographie (Abb. 3). Die Maskenherstellung dient der Übertragung der Mikrofluidikstruktur auf das Sensor-Substrat und ist für die Herstellung genauer Strukturen von essenzieller Bedeutung. Zunächst wird das Layout der Kanäle und der Elektroden am Computer mit der Software CleWin entworfen. Dann wird die Chrom-Photomaske durch Laserlithografie hergestellt. Die Fotomaske wird verwendet, um das Design im UV-Lithographieverfahren auf eine Masterstruktur zu übertragen. Die Masterstruktur wird dann als wiederverwendbare Form zum Gießen von PDMS verwendet. Dieses Verfahren wird als Softlithografie bezeichnet. Nach dem Ausbacken wird das PDMS vernetzt und härtet aus, wodurch es die Form der Kanäle annimmt. Die Elektroden für das Gerät werden durch thermisches Aufdampfen einer dünnen Schicht aus Chrom und Gold auf einem Glasobjektträger hergestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Herstellungsschritte sowie Verfahren näher beschrieben.

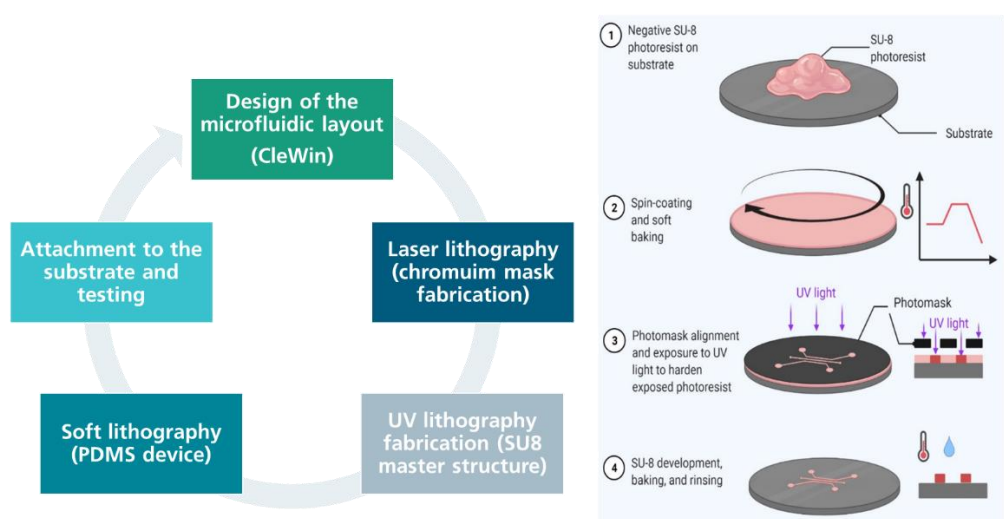


Abb. 3 Herstellung von mikrofluidischen Strukturen

Fotolithografie ist im Allgemeinen ein Begriff für Techniken, bei denen mit Hilfe von Licht fein strukturierte Dünnschichten aus geeigneten Materialien auf einem Substrat erzeugt werden, um bestimmte Bereiche während nachfolgender Bearbeitung, wie zum Beispiel Ätzen zu schützen und somit beizubehalten. Zur Herstellung der Mikrofluidikstruktur werden Laser Lithografie (zur Herstellung der Fotomaske) und UV-Lithografie verwendet.

Die Fotomaske zeigt das Muster eines integrierten Schaltkreises oder, in diesem Fall, eines mikrofluidischen Kanals und dient als Schablone für die Foto- und UV-lithografische Herstellung der betreffenden Vorrichtung. Sie besteht aus einer mit Fotolack beschichteten Chromschicht auf einer Glasplatte. Das transparente Bild auf der Fotomaske stellt die Master-Schablone dar - das Muster, das später von einem Mask Aligner durch UV-Lithografie in eine lichtempfindliche Schicht auf einem Siliziumwafer übertragen wird. Das Chrom stellt undurchsichtige Bereiche auf der Fotomaske dar, die für den Schattenwurf bei der Belichtung der Siliziumwafer verantwortlich sind. Grundlage für die Herstellung einer Fotomaske ist ein Glassubstrat, das mit einer Chrom- und einer Resistschicht versehen ist. Der Resist ist empfindlich für Licht bestimmter Wellenlängen und kann durch Ätzprozesse in die Chromschicht übertragen werden. Das Bild auf der Fotomaske wird durch Laserlithografie strukturiert: Ein Laserstrahl wird über die laserempfindliche Oberfläche geführt und überträgt das Design vom Computer auf die Maskenoberfläche (Abbildung 4A). Der belichtete Fotolack löst sich und wird in der anschließenden Entwicklungsphase entfernt: Zunächst wird die Maske 3 Minuten lang in ein Gemisch aus AZ351B-Entwickler und entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:5 (v/v) getaucht, um den belichteten Fotolack aufzulösen, dann mit entionisiertem Wasser abgespült und 20 Minuten lang in eine Chromätzlösung getaucht und anschließend mit entionisiertem Wasser abgespült.

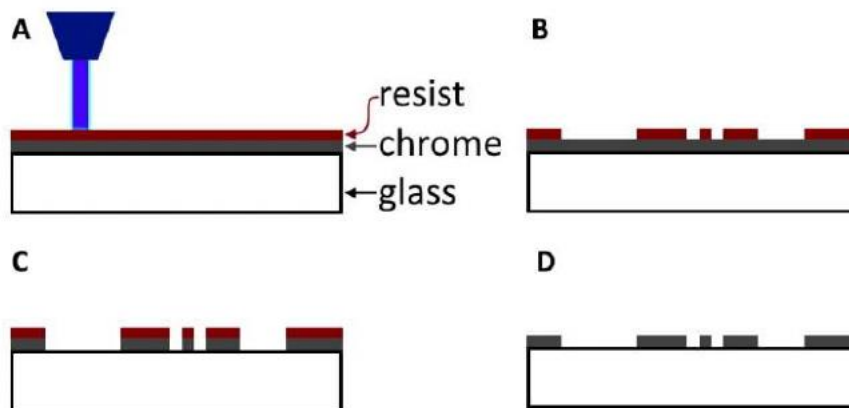


Abb. 4 Herstellung der Fotomaske durch Laserlithografie: (A) während der Belichtung, (B) nach der Belichtung, (C) nach dem Ätzen von Chrom, (D) nach dem Entfernen des Resists.

Die UV-Lithografie wird verwendet, um das geometrische Muster der Fotomaske auf das Substrat mit einem lichtempfindlichen Fotoresist zu übertragen. Dieser Prozess beginnt mit der Reinigung des Si-Wafers mit Aceton, Isopropanol und Druckluft. Für die Verbesserung der Adhäsion wird die reine Si-Oberfläche erhitzt; mit Ti-Haftvermittler mittels Spin Coating (4000 rpm, Beschleunigung 4000 rpm/s für 50 s) bes Abb. 2 Spezifikation für DELISA-basiertes AMI-POCT-Gerätchichtet und an der Heizplatte bei 120 °C während zwei Minuten erhitzt. Anschließend wird der SU-8-Fotolack auf die Oberfläche langsam aufgetragen und dem Einbrennprozess (1 min bei 65 °C; 6 min bei 95 °C) unterzogen. Die eingeschätzte Schichtdicke beträgt (15 – 20) µm. Eine langsame Temperatursteigerung von 65 °C auf 95 °C sollte die Luftblasenbildung verhindern, während eine langsame Verdunstung der Lösung eine bessere Adhäsion sichern sollte. Das mit dem Fotolack homogen beschichtete Substrat ist für die Lithografie vorbereitet. Nach der Ausrichtung und Exposition (UV, 7,5 s) erfolgt das Einbrennen (2 min bei 65 °C und 10 min bei 95 °C entsprechend). Das eingebrachte Wafer ist fertig für den Entwicklungsprozess, in dem der Fotolack von unbelichteten Orten entfernt wird. Die Dauer der Entwicklung

ist für die Strukturgenauigkeit entscheidend. Nach der Entwicklung unterliegt der Wafer einem Hart-Backen-Prozess (40 min bei 180 °C), der für die Stabilität von entwickelten Fotolack-Strukturen notwendig ist.

Softlithographie umfasst eine Reihe von Techniken zur Herstellung von Mikrostrukturen mit Hilfe von Elastomerstempeln und -formen. Vorgesehen ist hier das Eingießen eines Polymermaterials in die durch Fotolithografie vorbereitete Struktur. Das eingegossene Polymer unterliegt einem Backen-Prozess für die Härtung und Herstellung der Mikrofluidikstruktur und Sicherung der notwendigen Eigenschaften (Abbildung 4).

Softlithographie mittels PDMS ist in der Massenproduktion kostengünstiger als andere Formen der Lithografie und eignet sich gut für die Biotechnologie. Polydimethylsiloxan (PDMS), das als Stempelharz verwendet wird, ist eines der gebräuchlichsten Materialien für die Strömungsübertragung in Mikrofluidik-Chips [5]. Es ist optisch klar, hat eine geringe Autofluoreszenz und ist im Allgemeinen inert, ungiftig und nicht entflammbar. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von PDMS ist die Möglichkeit, es durch eine einfache Plasmabehandlung fest mit Glas oder anderen PDMS-Schichten zu verbinden.

Für die Herstellung mikrofluidischer Geräte wird die flüssige PDMS-Basis mit einem Vernetzungsmittel gemischt, dann in eine Urform gegossen und erhitzt, um ein elastomeres Abbild zu erhalten. Bei der Entnahme bleiben selbst kleinste Details im PDMS erhalten. Das Abbild wird dann auf einen Glasträger gelegt und versiegelt, wie in Abbildung 16 (B) gezeigt. Die PDMS-Schicht ist verformbar, so dass sich gut leckagefreie Verbindungen mit Schläuchen herstellen lassen. Das fertige Produkt kann mit dem anwendungsrelevanten Substrat durch Plasmaoxidation verbunden werden.

Zur Herstellung der Kanäle wurde das PDMS-Gießverfahren auf der hergestellten SU-8-Masterform durchgeführt, indem zunächst das flüssige PDMS-Polymer, durch Mischen von Basiselastomer und Vernetzer, auf die SU-8-Form gegossen wurde. Für die meisten Kanalstrukturen betrug das optimale Verhältnis von Basis zu Vernetzer 1:7 oder 1:7,5 (v/v), während für den DLD-Kanal, bei dem die mechanische Steifigkeit der Säulen für die Filterfunktion entscheidend ist, die Komponenten im Verhältnis 1:5,5 gemischt wurden. Nach gründlichem Rühren wurde die PDMS-Mischung in der Vakuumkammer bei einem Druck von etwa 200 mbar 20 Minuten lang entgast, um Hohlräume und Blasen in der geformten Struktur zu beseitigen. Die Aushärtung des PDMS erfolgte auf einer Heizplatte bei 75°C für 30 Minuten. Die Herstellung des Nukleinsäure-Reinigungskompartmentes erfolgte in zwei Schritten: Die Form wurde nur mit einer geringen Menge PDMS gefüllt, um die Kanalstruktur zu bedecken, und 10 Minuten lang gebacken. Danach wurde ein Magnet auf dieser dünnen Schicht über dem Kammerbereich platziert und die Form wurde vollständig mit PDMS gefüllt und weitere 15 Minuten lang gebacken. Nachdem das vollständig vernetzte PDMS-Modell vorsichtig von der Masterstruktur abgezogen wurde, wurden die Ein- und Austrittsstellen mit einem Biopsie-Werkzeug durchstochen.

Sauerstoff-Plasmabindung ermöglicht die Verbindung des hergestellten Mikrofluidik-Packages mit dem Sensor-Substrat durch die Plasmabearbeitung (40 Watt, 10 s). Um die Adhäsion zwischen der PDMS-Schicht und dem Glassubstrat zu erhöhen, werden die Oberflächen mit Luftplasma behandelt. Das Prinzip basiert auf der Wirkung von Van der Waals-Kräften. Als hydrophobes Polymer verfügt PDMS über $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-$ Gruppen. Durch die Plasmabehandlung werden an der PDMS-Oberfläche Si-OH Silanol-Gruppen erzeugt (Abbildung 4). Diese machen die Oberfläche hydrophil durch die Zerstörung von Si-CH₃-Gruppen.

Während der Behandlung werden die kovalenten Silizium-Sauerstoff-Bindungen aufgebrochen, so dass funktionelle Si-OH-Gruppen entstehen, die für eine Bindung zugänglich werden. Sobald diese Aktivierung nachlässt und sich die Bindungen neu bilden, werden in einer Kondensationsreaktion zwischen den beiden sich berührenden Oberflächen neue Si-O-Si-Bindungen gebildet, und der Objektträger wird dauerhaft mit dem PDMS versiegelt, so dass ein wasserdichter Kanal entsteht [6].

Um die hergestellten mikrofluidischen Kanäle zu versiegeln, wurde der Glasobjektträger in einem Ultraschallbad mit Isopropanol gereinigt und die PDMS-Schicht mit Isopropanol

gespült. Nach dem Trocknen in N₂ wurden beide Teile 8 s lang mit Luftplasma bei 1 mbar und 100 W Leistung des Plasmagenerators behandelt. Die behandelten PDMS-Blöcke wurden vorsichtig auf den Glasobjektträger gelegt, leicht angedrückt und 2 Minuten lang auf einer Heizplatte bei 50 °C belassen, um die Haftung zu verbessern.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse



Abb. 5 Aushärtung des Polymers (links) und Entfernung des Polymers aus der Form (rechts)

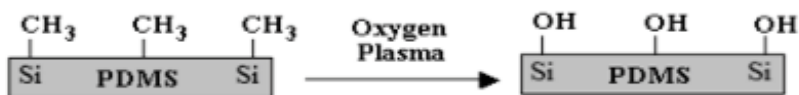


Abb. 6 PDMS-Oberfläche vor und nach der Plasmabehandlung [6]

Die Anwesenheit von reaktiven OH-Gruppen an den behandelten Oberflächen macht die Bindung des Substrates mit dem Package irreversibel (Bildung von kovalenten –O-Si-O-Bindungen bei dem Kontakt von PDMS mit dem Glass-Substrat) [6]. Nach der Plasmabehandlung bleibt die Oberfläche ca. 10 min aktiv. In diese Zeit muss der Bindungsprozess komplett abgeschlossen werden. Eine vorsichtige Verbindung von beiden Komponenten, des PDMS-Packages und des Substrates ist erforderlich, um die Verklebung der mikrofluidischen Kanäle zu vermeiden. Die Energie-Zufuhr beträgt ca. 400 J, was unter der Biomolekül-zerstörenden Grenze von 600 J liegt. Ein leichtes Zusammenpressen nach der Plasma-Behandlung sorgt für eine gute Adhäsion zwischen dem Package und dem Substrat.

1.1.1.1 Deterministische laterale Verschiebung

Deterministische Laterale Verschiebung (DLD) ist eine Methode zur Zellsortierung/Partikeltrennung, bei der intrinsische Zelleigenschaften genutzt werden. Dabei werden die Partikel (Zellen) durch eine Reihe von regelmäßiger Anordnung von Säulen getrieben (Abbildungen 7, 8). Durch die Positionierung von Säulen in vorbestimmten Winkeln werden unterschiedlich große Partikel in verschiedene Stromlinien gezwungen und so getrennt. Jede nachfolgende Reihe des Arrays ist seitlich um einen bestimmten Abstand $\Delta\lambda$ vom Vorgänger verschoben. Das Muster der Anordnung der Säulen bestimmt die Strömungsrichtung der Partikel. Die Summe des Spaltabstandes G und des Mikropillardurchmessers D_p ergibt den „Zentrum zum Zentrum“-Abstand λ . Der Verschiebungswinkel beschreibt die laterale Reihenverschiebung und die Position jeder Säule in Bezug auf die Strömungsrichtung [9]. Bei der Bewegung zwischen den Pfeilern folgt das Teilchen mit einem Radius, der kleiner als der kritische Durchmesser D_c ist, der anfänglichen Stromlinie und bewegt sich im Zick-Zack-Kurs, während das Teilchen, das größer als D_c ist, gegen den Pfeiler stößt und sich seitlich zur nächsten Stromlinie verschiebt, wie in

Abbildung 8 zu sehen. Dieser Vorgang setzt sich jedes Mal fort, wenn ein solches Teilchen eine Säule passiert.

Es wurde gezeigt, dass DLD in der Lage ist, Partikel auf der Grundlage ihrer Größe in kontinuierlicher Strömung mit einer Auflösung von bis zu 10 nm zu trennen. DLD ermöglicht eine präzise Partikelmanipulation mit einer hochauflösenden Trennung und ist dabei kostengünstig und robust. Seit ihrer Erfindung wird diese Technik zur Trennung von Partikeln mit einer Größe von Millimetern, Mikrometern und sogar Submikrometern eingesetzt [10] und wurde für verschiedene Zwecke verwendet, darunter die Trennung von Blut und Krebszellen [11]. Es ist möglich, den Anwendungsbereich von DLD zu erweitern, indem man seine geometrischen Eigenschaften verändert oder es mit externen Kräften (z. B. akustischen Kräften [12]) koppelt. Dies ermöglicht die Trennung von Partikeln auf der Grundlage anderer Eigenschaften wie Form, Verformbarkeit und dielektrische Eigenschaften.

Bei der Einführung einer Partikel (Zellen)-Mischung in den DLD-Chip werden die Mikroartikel nach Größe sortiert. Beobachtungen zeigen, dass größere Partikel einer anderen Richtung folgen als kleinere Partikel. Große Partikel bewegen sich in einer Linie mit der Säulenreihe und lenken sich aufgrund der diagonalen Anordnung der Säulen seitlich von der Stromlinie weg. Kleinere Partikel hingegen lenken nicht von der Stromlinie ab. Stattdessen folgen sie weiterhin der Richtung der Stromlinie und wechseln daher zwischen den Säulenreihen. Die Reihenverschiebungsparameter $\varepsilon = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = \frac{1}{N} = \tan \theta$. Der kritische Partikeldurchmesser berechnet sich aus der Gleichung $D_c = 2\alpha G\varepsilon$, wo $\alpha = \sqrt{N/3}$ der Korrekturfaktor ist. Alle Partikeln mit dem Durchmesser größer als D_c werden in jeder Reihe verschoben.

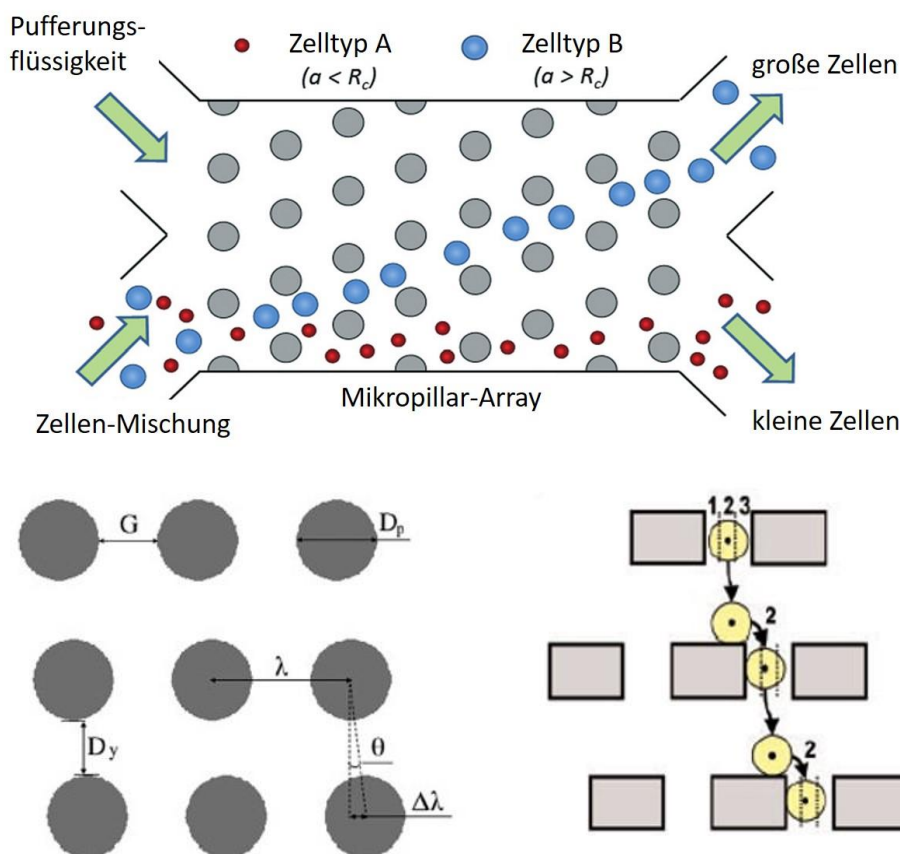


Abb. 7 Das DLD-Prinzip [nach 13]

Das DLD-Prinzip ist deterministisch, da es sich nicht auf stochastische oder Diffusions-Effekte stützt, was der DLD eine hohe Größenauflösung verleiht. Die thermische Diffusion von Partikeln findet zwar immer noch statt, aber dieser Effekt ist bei Partikeln im

Mikrometerbereich in der Regel vernachlässigbar und wird erst im Nanobereich relevant. Die Robustheit von DLD wird durch die Tatsache gewährleistet, dass die Trennung auf einem wiederholten Vorgang beruht. Ein Herstellungsfehler wie eine gebrochene oder fehlende Säule stört die Trennung an dieser Säule, aber die übrigen Säulen kompensieren dies. Bei einer ausreichenden Kanallänge wird weiterhin eine effektive Trennung ermöglicht.

1.1.1.2 Entwurf und Design des DLD-Moduls

Um einen Kanal zu entwerfen, der in der Lage ist, Blutzellen zu filtern, wurde der kritische Durchmesser D_c auf $6 \mu\text{m}$ festgelegt. Dies entspricht etwas weniger als der Größe eines roten Blutkörperchens ($7-8 \mu\text{m}$ im Durchmesser). Der Einfachheit halber wurde eine quadratische Anordnung (mit gleichen Abständen in x- und y-Richtung) von runden Pfosten gewählt. Dann wurde der minimale Verschiebungsabstand $\Delta\lambda$ auf $4 \mu\text{m}$ festgelegt, was der geschätzten Auflösung des Herstellungsverfahrens entspricht. Der Durchmesser der Säulen und der Abstand zwischen ihnen wurden in Übereinstimmung mit der Kalibrierungskurve in Abbildung xx gewählt. Fünf Kanaldesigns mit unterschiedlichen Säulendurchmessern und Spaltabständen wurden in der CleWin-Software erstellt. Die entsprechenden Parameter sind in Abb. 8 aufgeführt.

Design	Säulendurchmesser D (μm)	Spaltabstand G (μm)	Verschiebungsabstand $\Delta\lambda$ (μm)	Kanallänge (mm)	Kanalbreite (mm)
1	20	12	4	10	1
2	44	16	4	15	0,8
3	62	18	4	15	0,7
4	76	20	4	20	0,8
5	96	16	4	18	1

Abb. 8 Parameter der ausgewählten DLD-Bereiche

Länge und Breite der Kanäle sind keine unabhängigen Variablen, da sich die Partikel nur um eine Säule pro Reihe seitlich verschieben können. Im günstigsten Fall bildet die Bewegungsbahn der großen Partikel einen Winkel θ mit der ursprünglichen Strömungsrichtung (siehe Abbildung 7). Um eine ordnungsgemäße Teilchentrennung zu gewährleisten, sollte die Länge des Kanals L größer oder gleich der Kanalbreite W geteilt durch den Sinus von θ sein, der als $\Delta\lambda\lambda$ berechnet werden kann. Dies bedeutet, dass große Partikel die andere Wand des Kanals früher erreichen als den Ausgang.

Neben den rechteckigen DLD-Kanälen mit Säulen beinhaltet der Entwurf auch Einlässe, Auslässe und zwei Kanalabschnitte von 3 mm Länge und $400 \mu\text{m}$ Breite direkt nach jedem DLD-Abschnitt zur leichteren Beobachtung der gefilterten Partikel oder auch zur möglichen Anwendung der Durchflusszytometrie beim Umgang mit Blutzellen. Das endgültige Design der Kanäle ist in Abbildung 9 und Abb. 10 dargestellt.

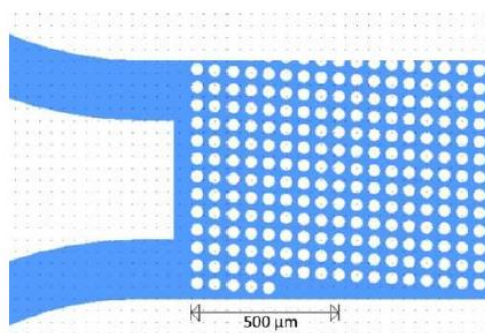


Abb. 9 Die Gesamtübersicht eines DLD-Kanals (Design 1) in CleWin. Die Säulen im Inneren des Kanals sind nicht sichtbar, da sie zu klein sind. Die Beschriftung gibt Auskunft über die Konstruktionsmaße und markiert den Einlass für Partikel. Die breiteren Abschnitte der Ausläufe sind frei von Hindernissen und dienen als Sichtfenster.



Abb. 10 Fragment eines DLD-Kanals (Design 2), dargestellt in CleWin. Der Fluss ist von links nach rechts gerichtet, der obere Einlass ist für die Partikelsuspension, der untere für die Pufferlösung. Es wird erwartet, dass große Partikel entsprechend der Verschiebungsrichtung der Säulen von oben nach unten verlagert werden.

1.3.2.3 Entwurf und Prüfung von passiven Filterflächen auf der Grundlage der Methode der deterministischen lateralen Verschiebung (DLD)

Unter Berücksichtigung der endgültigen Spezifikationen für das Filtermodul wurde der Durchmesser der zu filternden Teilchen (Zellen) auf 6 μm festgelegt. Dies ermöglicht die Trennung von Vollblut (rote und weiße Blutkörperchen) und Serum, welches für die Analyse benötigt wird. Der gewählte Ansatz - deterministische laterale Verschiebung (DLD) - ermöglicht die Berechnung der geometrischen Parameter der Säulenarrays im mikrofluidischen Kanal mit dem Ziel, den definierten kritischen Durchmesser (6 μm) zu erreichen. Somit würden sich alle Partikel mit einer Größe oberhalb des kritischen Durchmessers im separaten Auslass der MF-Zelle ansammeln. Auf der Grundlage der vorläufigen Literaturrecherche wurden die erforderlichen geometrischen Parameter für DLD definiert und für 6 verschiedene Varianten von DLD-Arrays berechnet (Abb. 11).

	Design 1	Design 2	Design 3	Design 4	Design 5	Design 6
Pillar diameter, μm	20	44	62	76	96	106
G - gap distance, μm	12	16	18	20	16	14
Dc/G	0.500	0.375	0.333	0.300	0.375	0.429
$\epsilon = \tan \theta = 1/N$	0.125	0.067	0.050	0.042	0.063	0.083
N	8.00	15.00	20.00	24.00	16.00	12.00
θ , deg	7.125016349	3.81	2.86	2.39	3.58	4.76
λ - center-to-center distance, μm	32.0	60.0	80.0	96.0	112.0	120.0
$\Delta\lambda$ - shift distance, μm	4	4	4	4	7	10
Dc calculated, μm	6.19	6.11	5.98	6.09	5.92	5.95
need to estimate error for Dc !						
Max resolution 4 μm !						
Channel width, μm	1000	800	700	800	1000	1000
Minimal channel length, mm	8	12	14	19.2	16	12
Projected width, mm	1.25	1.00	0.75	0.83	1.13	1.17
Actual width, mm	1	0.8	0.7	0.8	1	1
Actual length, mm	10	15	15	20	18	14

Abb. 11 Ergebnisse der Berechnungen zur Bestimmung der Parameter von DLD-Arrays

Die Herstellung der mikrofluidischen Zellen aller 6 Designs (Abb. 12) erfolgte nach den oben genannten Protokollen.

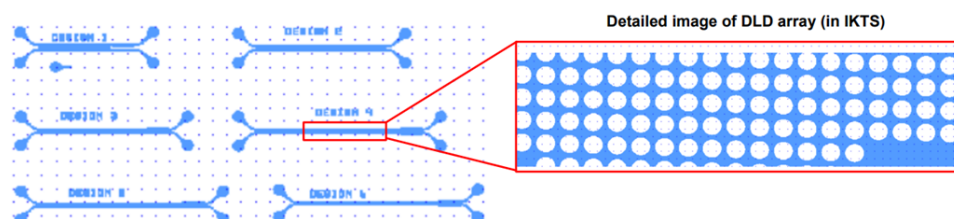


Abb. 12 Designs von DLD-Arrays

Um die Filterfunktionalität der entworfenen DLD-Mikrofluidikzellen zu überprüfen, wurden Polystyrol- μ -Partikel in den Größen 3,9; 4,5; 5; 10 und 15 μm erworben. Der Versuchsaufbau bestand aus einem System mit präzisen Spritzenpumpen, Verbindungsschläuchen und einem Mikroskop mit Hochgeschwindigkeitskamera (Abb. 13). Die Wassersuspensionen mit μ -Partikel-Durchmessern von 3,9 und 4,5 μm wurden bereits zuvor getestet. Mikroskopaufnahmen und Videos wurden aufgenommen und ausgewertet (Abb. 13, 14).

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

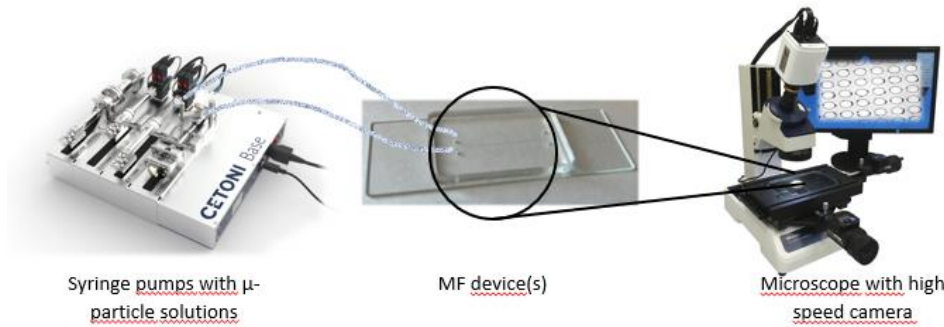


Abb. 13 Versuchsaufbau zur Durchführung von Tests an mikrofluidischen Strukturen

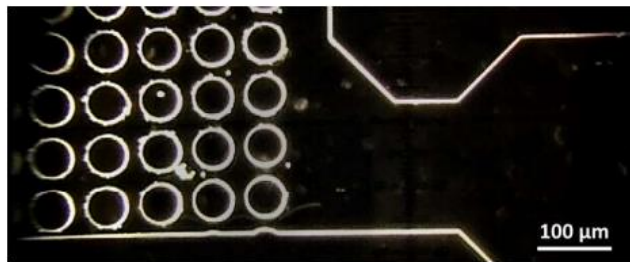
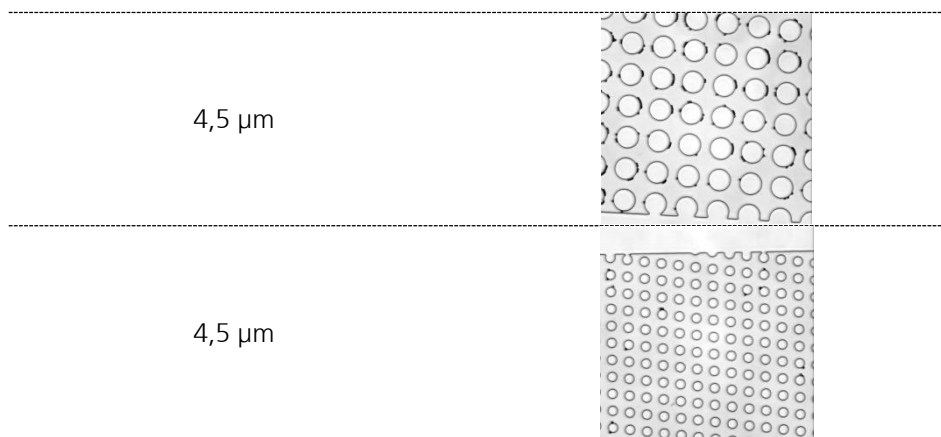


Abb. 14 Die Flugbahn eines Teilchens, das kleiner als D_c ist, in der Nähe des Kanalauslasses wird schwach gesehen (schlangenförmige weiße Linie in der Nähe der Kanalwand in einem Phasenkontrastbild).

Vordefinierte Durchflussraten für beide Einlässe im Verhältnis 3:1 $\mu\text{l}/\text{min}$ erlaubten es, den Drift der Partikel entlang der Seite des jeweiligen Einlasses zu beobachten, was mit der theoretischen Berechnung und den experimentellen Erwartungen übereinstimmt. Es wird erwartet, dass die Partikel mit dem größeren Durchmesser auf die gegenüberliegende Seite der Durchflusszelle getrieben werden und sich in einer separaten Kammer ansammeln.

Partikelgröße	Mikroskopische Aufnahme
3,9 μm	
3,9 μm	

Abb 15. Mikroskopische Aufnahmen der Partikel in der Mikrofluidikzelle



Basierend auf dem endgültigen DLD-Array-Design wird ein Mikrofluidikmodul hergestellt, der in den DELISA-Chip (Abb. 16) von Small Machines (südkoreanischer Projektpartner) integriert wird.

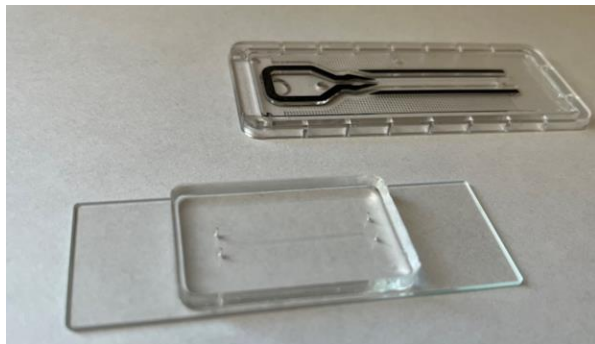


Abb 16. DELISA-Chip von Small Machines

Bei der Entwicklung des DLD-Arrays in einer mikrofluidischen Vorrichtung aus Polydimethylsiloxan (PDMS), welche auf die Trennung von Partikeln mit einem kritischen Durchmesser von $6\ \mu\text{m}$ abzielt, gab es mehrere Herausforderungen. Dazu gehörte die Fähigkeit der Partikel, den Kanal effektiv zu durchqueren, und ihre Tendenz, an der Oberfläche des Geräts zu haften. Eines der Haupthindernisse war das Anhaften der Partikel an der PDMS-Oberfläche, was die Leistung des DLD-Arrays erheblich beeinträchtigte. Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedene Techniken zur Oberflächenmodifizierung untersucht [17]. Die Behandlung der PDMS-Oberfläche mit Polyethylenglykol (PEG)-Silan erwies sich als praktikable Lösung, da dadurch eine hydrophile Barriere geschaffen wurde, die die unspezifische Bindung von Partikeln an die Oberfläche der Vorrichtung reduzierte. Diese Methode ist in der Literatur für ihre Wirksamkeit bei der Reduzierung von Biofouling in mikrofluidischen Systemen vielfach dokumentiert [16]. Neben Polyethylenglykol (PEG)-Silan-Beschichtungen wurden verschiedene andere Oberflächenbehandlungsoptionen auf ihre Wirksamkeit bei der Verringerung der Partikelanhaftung untersucht. Eine dieser Methoden ist die Verwendung zwitterionischer Beschichtungen, die sich in verschiedenen biomedizinischen Anwendungen als besonders widerstandsfähig gegen unspezifische Proteinadsorption und Zelladhäsion erwiesen haben. Durch den Ausgleich positiver und negativer Ladungen minimieren diese Beschichtungen elektrostatische Wechselwirkungen, die oftmals zum Anhaften von Partikeln führen. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung perfluorierter Beschichtungen, die hochgradig hydrophobe Oberflächen bieten, die die Benetzungseigenschaften von PDMS verringern und dadurch die Partikelhaftung durch verringerte Oberflächenwechselwirkungsenergien verhindern. Die Sauerstoffplasmabehandlung ist ein Grundstein für die Modifizierung von PDMS-Oberflächen, um sie vorübergehend hydrophiler zu machen. Bei

diesem Verfahren wird PDMS einem Sauerstoffplasma ausgesetzt, wodurch eine reichhaltige Oberfläche mit Silanolgruppen (Si-OH) entsteht, die die Partikelhaftung durch eine erhöhte Oberflächenbenetzbarkeit deutlich reduzieren kann. Es ist jedoch bekannt, dass die durch das Sauerstoffplasma hervorgerufene Hydrophilie mit der Zeit abnimmt und in den hydrophoben Zustand zurückkehrt. Um dieser Einschränkung entgegenzuwirken, wurden Plasmabehandlungen in Kombination mit dem anschließenden chemischen Aufpfropfen hydrophiler Moleküle erforscht. Solche kombinierten Behandlungen sorgen für eine länger anhaltende hydrophile Oberfläche, die die Lebensdauer des Geräts und die gleichbleibende Leistung bei der Partikelabscheidung verlängert.

Während Polyethylenglykol (PEG)-Silan und zwitterionische Beschichtungen die unspezifische Adsorption wirksam mindern und perfluorierte Beschichtungen hydrophobe Oberflächen bieten, um die Partikelbenetzung zu verhindern, stellt die Zugabe von Rindersealbumin (BSA)-Blockierlösung einen biologisch orientierten Ansatz dar. BSA, ein in Laboren häufig verwendetes Protein, kann auf die PDMS-Oberfläche aufgetragen werden, um eine blockierende Schicht zu bilden, die das Anhaften von Partikeln unterbindet. Diese Proteinschicht besetzt potenzielle Bindungsstellen auf der PDMS-Oberfläche und bildet so eine räumliche Barriere, die die Wahrscheinlichkeit der Partikelanhaftung verringert. Die Wirksamkeit von BSA als Blockierungsmittel ist in verschiedenen Biosensor- und Zellkulturanwendungen gut dokumentiert, was es zu einer wertvollen Ergänzung des Repertoires gegen Partikelanhaftung macht.

Bei der Prüfung der entwickelten Entwürfe traten mehrere Probleme auf. Wie bereits erwähnt, sind alle DLD-Parameter abhängig voneinander, d. h., wenn ein Parameter verändert wird, führt dies zur Änderung von weiteren Parametern. Aus diesem Grund wurde eine Mischung aus Partikeln aller verfügbaren Größen (die das Blut imitieren und zwischen 2 und 15 μm variieren) getestet. Es wurde festgestellt, dass die Mischung keine Partikel einer bestimmten Größe enthalten sollte, um den kritischen Durchmesser von 6 μm zu filtern. Aufgrund des berechneten Winkels der Säulenreihen von $\angle 2^\circ$ war es nicht möglich, eine Partikeltrennung in dem Kanal von definierter Länge und Breite (4 cm) zu erreichen. Zudem blieben Partikel an der Oberfläche der Säulen hängen und verstopften so den Kanal.

Angesichts des konkreten Ziels, 6- μm -Partikel abzutrennen, wurde ein Kaskaden-DLD-Array [17] entwickelt, um die Trennungseffizienz zu erhöhen. Dieser Ansatz umfasst mehrere Stufen von DLD-Arrays, die jeweils für einen bestimmten Größenbereich optimiert sind und eine präzise Trennung von 6- μm -Partikeln ermöglichen. Das Kaskadendesign wurde durch seine Fähigkeit begründet, ein breiteres Spektrum an Partikelgrößen mit hoher Auflösung und hohem Durchsatz zu verarbeiten, wie von Inglis et al. (2006) [18] und McGrath et al. (2014) [14] beschrieben. Die erste Stufe der Kaskade wurde für die Vorsortierung von Partikeln konzipiert, um die Belastung der nachfolgenden Stufen zu verringern, die auf die kritische Abtrennung von 6- μm -Partikeln zugeschnitten sind. Dieser mehrstufige Ansatz trug auch dazu bei, das Verstopfen zu verhindern, da größere Partikel in den ersten Stufen aussortiert wurden.

Es wurden mehrere Lösungsansätze realisiert. Es wurde beschlossen, den DLD-Kanal in zwei Kaskaden aufzuteilen, wobei in der ersten Kaskade Partikel mit einem kritischen

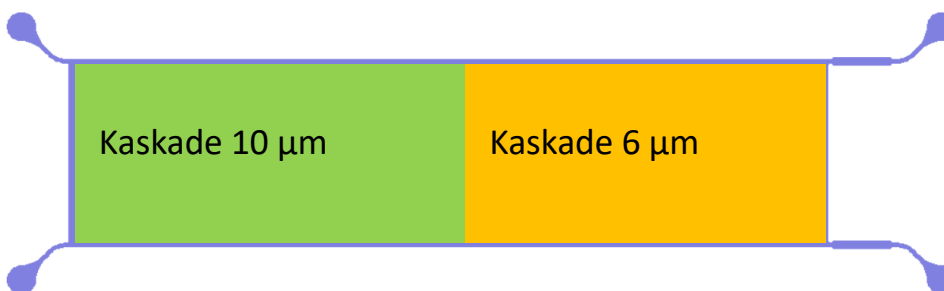


Abb 17. Schema des neuen mikrofluidischen Kaskadenkanals

Durchmesser von 10 μm und in der zweiten Kaskade solche von 6 μm aussortiert werden (Abb. 17). Diese Vorgehensweise ermöglicht, den Winkel der Säulenreihen einzustellen und die Partikel bis zum Ende des Kanals mit definierter Länge und Breite zu führen. Das vorgeschlagene Kaskaden-DLD-Array soll die Abtrennung zellulärer Bestandteile aus Vollblut durch einen stufenweisen Ansatz verbessern. Erste Beobachtungen haben gezeigt, dass die derzeitigen einstufigen DLD-Geräte Probleme mit der effizienten Trennung von Erythrozyten und weißen Blutkörperchen von kleineren Partikeln wie Thrombozyten und Plasma haben, was auf den engen Größenbereich dieser Komponenten (in einer Partikel imitierenden Lösung) zurückzuführen ist: Partikel kleinerer Größe konnten nur unzureichend abgetrennt werden und drifteten entlang des Kanals, wobei sie oft an der Oberfläche hängen blieben. Durch die Einführung mehrerer Trennstufen mit maßgeschneiderten Spaltgrößen kann die Spezifität der Trennung erheblich verbessert werden, wobei zunächst die größeren zellulären Komponenten und anschließend die Trennung für Plasma und kleinere Partikel verfeinert wird.

Für die Neugestaltung der Mikrofluidik wurde die Software "Klayout" verwendet, da sie die Verarbeitung einer großen Anzahl von Strukturen ($\sim 10^6$) begünstigt.

Folgende Parameter wurden für das Design der Endkaskade (Abb. 18) gewählt:

- Länge des Kanals 4 cm
- Breite des Kanals 1 cm
- Durchmesser der Säule 13 μm
- Säulenabstand 10 μm
- Winkel der Säulenreihe $\angle 6^\circ$
- PBS-Lösung als Puffer, Gesamtdruck 700 mbar

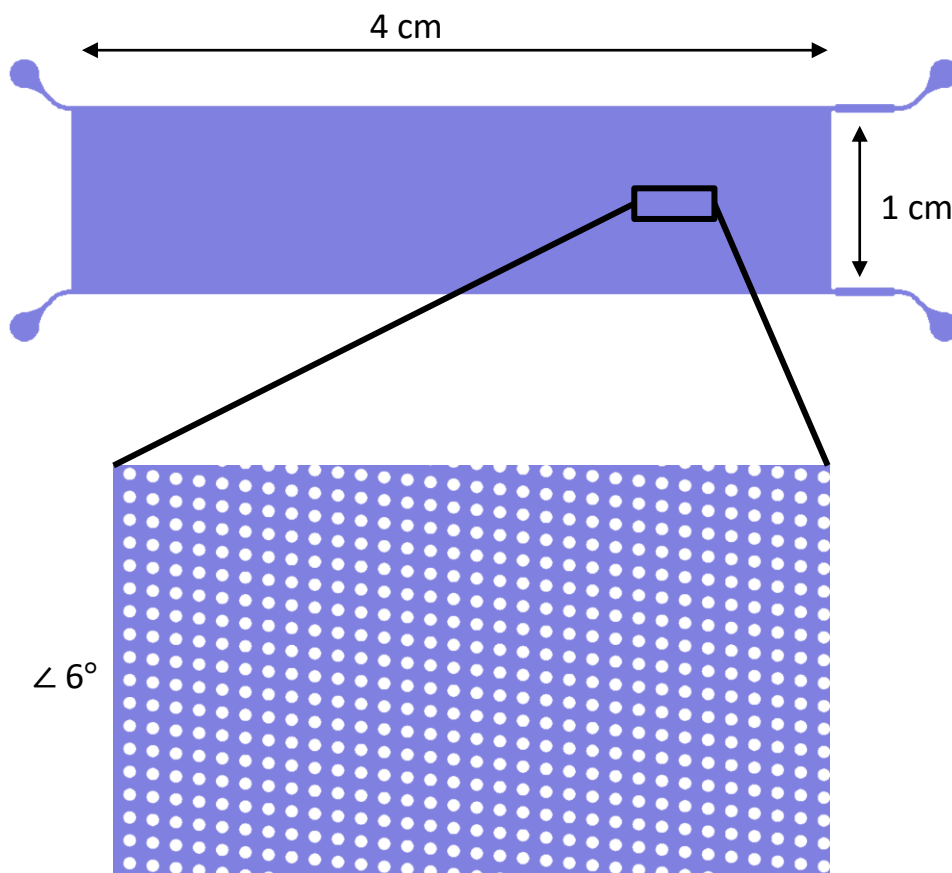


Abb 18. Neues mikrofluidisches Design einer 6- μm -Kaskade

Um zu vermeiden, dass die Partikel an der Oberfläche der Säulen haften bleiben, wurde die Behandlung des Kanals mit BSA-Blockierlösung als eine der am besten verfügbaren, zuverlässigsten und wirksamsten Lösungen für weitere biologische Tests des MF-Kanals gewählt. Es ist geplant, den Kanal 1 Stunde lang mit BSA-Blockierlösung zu behandeln. Nachdem sich die 6 μm als funktionstüchtig erwiesen haben, ist geplant, die Parameter für die zweite Kaskade zu berechnen und das gesamte System mit einer Mischung von Partikeln einer breiteren Größenverteilung zu testen.

Für die Experimente wurde eine neue Chrommaske hergestellt, die 3 Replika von DLD aufgereihten Kanälen enthält (Abb. 19). Die folgenden Parameter des DLD-Arrays wurden verwendet:

- Kritischer Durchmesser 6 μm
- Säulendurchmesser 13 μm
- Winkel $\angle 6^\circ$
- Dicke der Vorrichtung 50 μm
- Säulenabstand 10 μm
- Blockierlösung BSA für 1 Stunde

Nach UV-Lithografieprotokollen wurde eine SU8-2050-basierte Masterstruktur hergestellt (Abb. 20). Die Höhe der Kanäle betrug 50 μm , so dass die Strukturen mit einem Durchmesser von 13 μm und einem Spalt von 10 μm ein Verhältnis von etwa 5:1 aufweisen. Optische Mikroskopiebilder der Masterstruktur sind in Abb. 21 visualisiert.

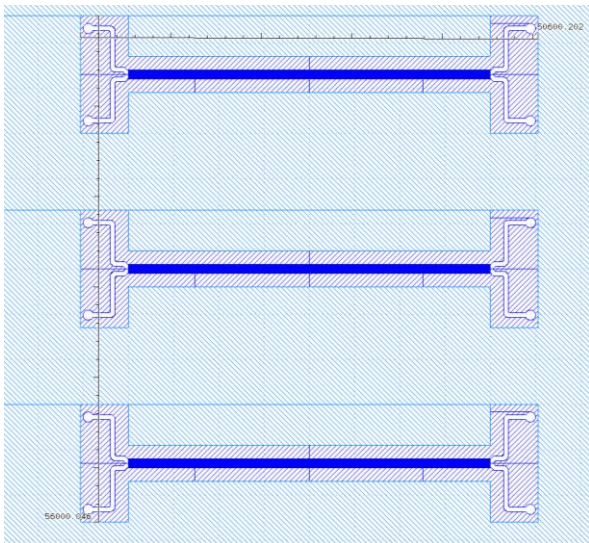


Abb 19. Fertiges Laserlithographie Design

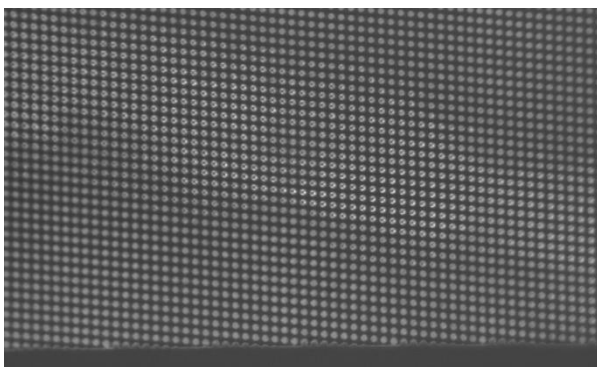
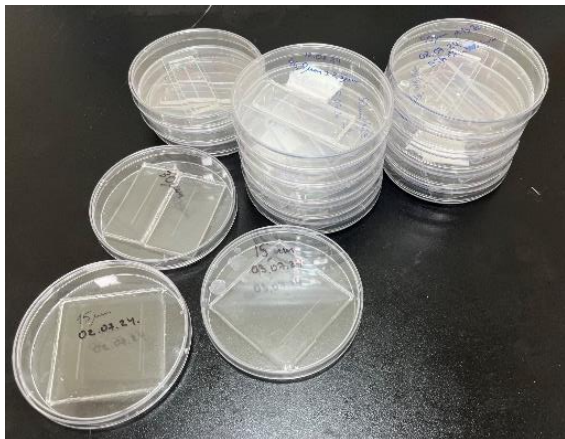
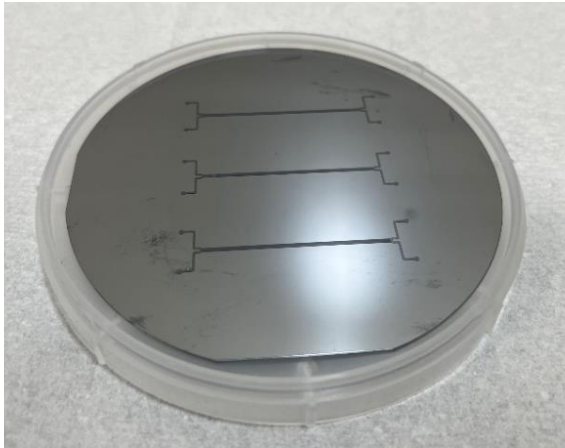


Abb 20. Gefertigte SU8-2050-Masterstruktur



Die Herstellung von Strukturen mit hohem Aspektverhältnis kann mehrere Herausforderungen mit sich bringen, was auch der Fall war. Die ungleichmäßige Verteilung des Photoresists wurde durch den Wechsel zu einem anderen Haftvermittler (Ti-Prime) gelöst. Um die Auflösung zu erhöhen und einen definierten vertikalen Schnitt der Säulen zu erhalten, wurde während der UV-Belichtung ein UV-365-nm-Filter eingesetzt. Mehr als 20 mikrofluidische Geräte auf PDMS-Basis wurden hergestellt und getestet. Das experimentelle Verfahren umfasste die Funktionalisierung der Kanäle mit einer 1:20 BSA-Lösung, um zu verhindern, dass μ -Partikel an der Oberfläche des Kanals haften. Die Säulenstrukturen auf dem Master schienen in lokalen Bereichen konisch zu sein, was den korrekten Fluss der Partikel stören würde. Der Chip, der an die Spritzenpumpe angeschlossen war, injizierte μ -Partikel-Lösungen mit einer Durchflussrate von 1 μ l/min und Puffer in den anderen Einlass mit 3 μ l/min. Im Experiment wurden die Lösungen von 5 und 9 μ m großen fluoreszierenden Partikeln verwendet.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

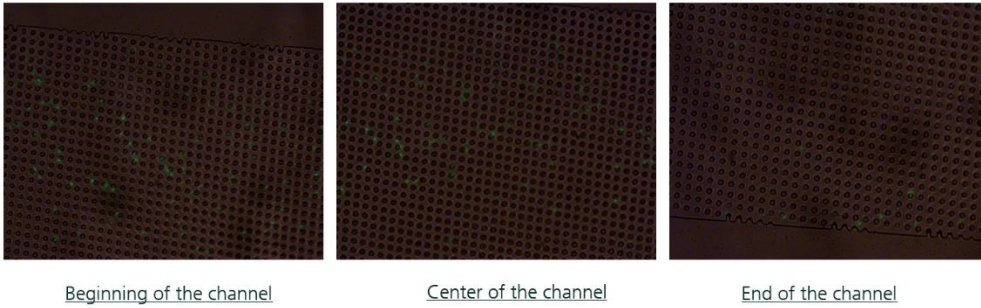


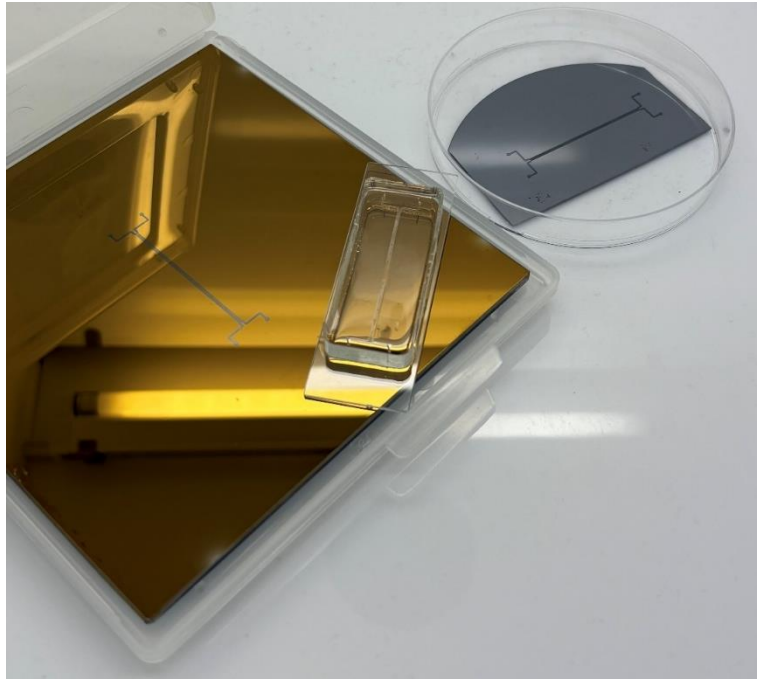
Abb 21. Optische Mikroskopiebilder der Masterstruktur

Es wurde beobachtet, dass sich einige Partikel auf der Oberfläche des Kanals absetzen, was ein unerwünschter Effekt ist. Aufgrund der unzureichenden Qualität der Maske war es jedoch möglich, die Verteilung der Partikel zu beobachten. Darüber hinaus wurde (in lokalen Teilen des Kanals) bestätigt, dass Partikel mit einer Größe von $5\ \mu\text{m}$ weiterhin entlang der Säulenordnung fließen und Partikel mit einer Größe von $9\ \mu\text{m}$ im Zick-Zack-Modus fließen, wobei sie die Reihe wechselten. Dieses Experiment bestätigte das Hauptprinzip von DLD und die gewählten Parameter für die Anordnung. Das oben erwähnte Problem mit der konischen Form der Säulen muss durch eine Verbesserung der Fertigungsqualität gelöst werden. Derzeit werden neue Versuche unternommen, und es ist geplant, die DLD-Vorrichtungen neu zu fertigen.



Abb 22. Neu hergestellte mikrofluidische Durchflusszelle





1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb 23. Gefertigte Cr-Glasmaske und SU8-Form und mikrofluidische Durchflusszelle

Die Cr-Glasmaske wurde mit dem funktionierenden Design des DLD-Kanals gefertigt. Eine SU8-Form mit einer Dicke von 50 μm wurde hergestellt und die mikrofluidischen Geräte wurden gefertigt. Die Qualität der Form war ausreichend, und die gewünschte Geräteleistung wurde erreicht.

2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Bearbeitung des Projektes ist entsprechend des ursprünglichen Arbeits- und Zeitplanes durchgeführt worden. Die Finanzmittel sind entsprechend der Planung abgerufen worden.

3 Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geleisteten Projektarbeiten waren notwendig, um Projektziel des Teilprojektes IKTS und des Verbundvorhabens zu erreichen. Die beschriebenen Prototypen des Mikrofluidiksystems wurden an den Projektpartner Smallmachines übergeben, um die Integration des Mikrofluidikarrays in den DELISA-Chip zu ermöglichen.

4 Voraussichtliche Nutzen und die Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die Entwicklung des neuartigen Point-of-Care-Biosensorsystems für die Frühdiagnose des akuten Myokardinfarkts wird durch das Konsortium zum Patent angemeldet, klinisch zugelassen und später vermarktet. Neben Eigenvermarktung ist vor allem die Vermarktung über einen etablierten Diagnostikhersteller als Partner angestrebt.

Potenzielle Interessenten an der Entwicklung eines IVD-Medizinprodukts zur Detektion von AML-spezifischen Biomarkern wurden projektbegleitend über Marketing und PR-Maßnahmen durch Hervorhebung der Technologievorteile gegenüber herkömmlichen

Methoden (wie z.B. bei den Parametern Sensitivität oder Kosten) animiert, mit dem AMI-CARINA-Konsortium in Kontakt zu treten und Lizenzierungen zum Inverkehrbringen zu abzuschließen.

Durch die intelligente Integration vieler Funktionen in immer kleiner werdenden Bauteilen werden immer anspruchsvollere Anwendungen z.B. in der medizinischen (*in vitro*) Diagnostik, zellbasierten Wirkstofftestung, und Implantologie möglich. Gerade für medizintechnische Mikrosysteme, die spezifischere Test- und Diagnoseverfahren sowie wirksamere Therapien ermöglichen werden, sind innovative Bearbeitungs- und Fertigungsmethoden der Mikrosystemtechnik sowie neue Kombinationen biokompatibler Materialien und sichere Bauformen entscheidend. Nach dem Projektende wird erwartet, dass die erzielten Ergebnisse und Erfahrungen des IKTS in nachfolgenden Projekten mit Industriepartnern genutzt werden können. Dies wird langfristige und alternative Verwertungspfade für die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen.

Die Teilprojektergebnisse des Fraunhofer IKTS werden wie folgt verwertet: nach erfolgreichem Abschluss der Entwicklungsphase des AMI-CARINA-Projekts wird eine gezielte Ansprache von IKTS im Bereich KMU als auch größerer Konzerne erfolgen. Um die Akzeptanz zu erhöhen ist die gezielte Bekanntmachung des Systems durch die einzelnen Projektpartner, sowie deren umfangreiche Netzwerkaktivitäten auf Fachtagungen/-kongressen, Messen in wissenschaftlichen Publikationen und im Kontakt mit bestehenden Industriepartnern geplant. Durch die Kontakte des Fraunhofer IKTS zu BioSaxony kann das AMI-CARINA-Plattform bereits frühzeitig innerhalb der Fachkreise vor Ort publik gemacht werden, um geeignete Partner für weitere Verwertung der Teilprojektergebnisse zu finden. Neben seinem Netzwerk greift das Fraunhofer IKTS auf Erfahrungen und Partner im Umfeld der Biomedizin zurück. Es verfügt als Mitglied in den Clustern BioSaxony, Silicon Saxony und innerhalb des Dresdner Fraunhofer-Clusters Nanoanalytik über industrielle und wissenschaftliche Kontakte, um das Sensorsystem und seine Teile national und international vorzustellen. Potenzielle Interessenten an der Entwicklung einer Mikrofluidikplattform für die IVD werden projektbegleitend über Marketing und PR-Maßnahmen (auf den einschlägigen Tagungen, Workshops und Messen in diesem Anwendungsfeld) durch Hervorhebung der Vorteile darauf aufmerksam gemacht, um Entwicklungskooperationen mit dem IKTS zu animieren.

Darüber hinaus wird die Beantragung von Schutzrechten für die entwickelten Packaging- und Probenvorbereitungstechnologien während des Projektverlaufs vor der Publikation von Projektergebnissen geprüft. Schutzrechte sind Eigentum der an der Erfindung beteiligten Parteien. Für das Projekt wird eine Kooperationsvereinbarung abgeschlossen, in dem die rechtlichen Regelungen zu Schutzrechten, Foreground IP und Background IP präzisiert werden.

5 Der während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritt

5 Der während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordene Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens wurde Literatur- und Patentrecherche durchgeführt. Keinen relevanten Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen ist dem Konsortium bekannt geworden.

6 Die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Im Rahmen des Vorhabens wurden zwei gemeinsame Publikationen geschrieben. Diese sind aktuell eingereicht und werden begutachtet. Außerdem sind zwei gemeinsame Abstracts zur Teilnahme an der μ TAS-Konferenz in Adelaide eingereicht. (S. Anlage).

7 Literaturverzeichnis

1. G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *nature*, 442(7101), pp. 368-373, 2006.
2. C. Lu and S. S. Verbridge, *Microfluidic Methods for Molecular Biology (Vol. 1)*, Springer International Publishing, 2016.
3. T. H. Schulte, R. L. Bardell and B. H. Weigl, "Microfluidic technologies in clinical
4. diagnostics," *Clinica Chimica Acta*, 321(1-2), pp. 1-10, 2002.
5. M. T. Guo, A. Rotem, J. A. Heyman and D. A. Weitz, "Droplet microfluidics for highthroughput biological assays," *Lab on a Chip*, 12(12), pp. 2146-2155, 2012.
6. Elveflow, "PDMS: a review," 2022. [Online]. Available: elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics/.
7. Henniker Plasma, "Plasma Treatment of PDMS for Microfluidics," 2022. [Online]. Available: plasmatreatment.co.uk/pt/plasma-treatments/plasma-surface-activation-to-improve-adhesion/pdms-bonding-microfluidics.
8. Watts BR, Kowpak T, Zhang Z, et al. Fabrication and Performance of a Photonic-Microfluidic Integrated Device 2012; *Micromachines* 3:62–77
9. Lu and S. S. Verbridge, *Microfluidic Methods for Molecular Biology (Vol. 1)*, Springer International Publishing, 2016.
10. D. W. Inglis, J. A. Davis, R. H. Austin and J. C. Sturm, "Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement.," *Lab on a Chip*, 6(5), pp. 655-658, 2006.
11. J. McGrath, M. Jimenez and H. Bridle, "Deterministic lateral displacement for particle separation: a review," *Lab on a Chip*, 14(21), pp. 4139-4158, 2014.
12. D. J. Collins, T. Alan and A. Neild, "Particle separation using virtual deterministic lateral displacement (vDLD)," *Lab on a Chip*, 14(9), pp. 1595-1603., 2014.
13. Wyatt SIC, Catherine DR, Gabriel PL. Microfluidic Cell Sorting: A Review of the Advances in the Separation of Cells from Debulking to Rare Cell Isolation. *Lab on a Chip* 2015; 15(5):1230–1249
14. McGrath JMJ, Bridle H. Deterministic Lateral Displacement for Particle Separation: A Review. *Lab on a Chip* 2014; 14(21):4139–58
15. Huang Y, Mason AJ. Lab-on-CMOS integration of microfluidics and electrochemical sensors. *Lab on a Chip* 2013; 13:3929
16. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Apr 1;99(Pt A):28-51
17. Salafi, T., Zhang, Y. & Zhang, Y. A Review on Deterministic Lateral Displacement for Particle Separation and Detection. *Nano-Micro Lett.* **11**, 77 (2019).
18. Inglis, D. W., Davis, J. A., Austin, R. H., & Sturm, J. C. (2006). Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement. *Lab on a Chip*, 6(5), 655-658.