

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR KERAMISCHE TECHNOLOGIEN UND SYSTEME IKTS

PULMONALES BLUT-LUFT-GRENZFLÄCHEN-MODELL ZUR UNTERSUCHUNG VON COVID-19 UND ZUM SCREENING VON THERAPEUTIKA

Mikrofluidisches Lunge-Auf-Chip-System und Wirkstoffträger-Nanopartikel mit hoher Affinität zu Alveolarepithelzellen

Dr. Natalia Beshchasna, Dmitry Belyaev, Aidee Itandehui Garcia-Zintzun

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

Projektträger/Auftraggeber: DLR Projektträger
Europäische und internationale Zusammenarbeit
Heinrich-Konen-Straße 5, 53227 Bonn
Dr. Adele Clausen

Förderkennzeichen/Auftragsnummer: 01DR21011
Zuwendungsbescheid/Auftrag vom: 15.09.2021

Dresden, 30.04.2025

Externe Freigabe

**Dmitry
Belyaev**

Digital unterschrieben
von Dmitry Belyaev
Datum: 2025.07.15
16:19:11 +02'00'

Projektmitarbeiter

**Natalia
Beshchasna**

Digital unterschrieben von
Natalia Beshchasna
Datum: 2025.07.15 16:15:56
+02'00'

Projektleiter



Zusammenfassung

Die Covid-19 Pandemie hat die dringende Notwendigkeit der Erforschung von Risiken und Folgen infektiöser Atemwegserreger aufgezeigt. Diesbezüglich ist es notwendig neuartige Therapeutika schnell zu evaluieren sowie das Wiederverwendungspotential von bereits auf dem Markt erhältlichen Medikamenten zu adressieren. Im Rahmen des Verbundvorhabens MicroLung wird ein optimiertes Gewebemodell der pulmonalen Blut-Luft-Schranke entwickelt, welches mittels eines mikrofluidischen Systems ein hochpräzises experimentelles Modell für Langzeitstudien im Zusammenhang mit Covid-19 und weiteren Atemwegserregern darstellt. Dabei werden Nanopartikel verwendet, welche das SARS-CoV-2 Virus nachahmen, um das künstliche Gewebemodell zu erproben. Des Weiteren wird eine zweite Klasse von Nanopartikeln, die Nanodiamanten, als "Virus-Anheftungsblocker" und Wirkstoffträger verwendet. Dies bildet die Grundlage für neue Verabreichungswege von Medikamenten und als Test für ein schnelles Screening von Arzneimitteln. Abschließend werden die Ergebnisse mit dem SARS-CoV-2-Virus-Isolat verglichen, um die erarbeiteten Modelle hinsichtlich ihrer Funktionalität zu validieren.

Das Ziel des Teilprojektes IKTS besteht in der Entwicklung eines Mikrofluidiksystems und der Entwicklung von Nanodiamanten-basierten Wirkstoffträgern. Außerdem unterstützt das IKTS die Zusammenstellung des Tissue-Engineered (TE)-Grenzflächenmodells mit dem Mikrofluidiksystem (TE/MF-Modell) sowie die Validierung des TE-MF-Modells im Zusammenhang mit dem Virusimitat und mit den Nanopartikel-basierten Wirkstoffträgern. Darüber hinaus partizipiert das IKTS in der Durchführung von Funktionstests mit Nanodiamanten-basierten Wirkstoffträgern im TE und TE-MF-Modell mit den SARS-CoV-2-Virusisolaten.

Der Bericht stellt die wesentlichen wissenschaftlichen und technischen Ergebnisse aus der Bearbeitung des Teilprojektes des Fraunhofer IKTS dar. Der Bericht bezieht sich auf den gesamten Projektzeitraum 01.11.2021 – 31.10.2024.

Keywords

Pulmonales Blut-Luft-Grenzflächenmodell, Lunge-auf-Chip-System, Mikrofluidik, Wirkstoffträger-Nanopartikel, Alveolarepithelzellen, Tissue-Engineered (TE)-Grenzflächenmodell, Covid-19.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

1.1 Aufgabenübersicht

Zu den Hauptaufgaben des IKTS im Verbundvorhaben gehört

- **Im Arbeitspaket 1:** Tissue Engineering (TE)-Grenzflächenmodell

Zusammenbau des TE-Modells mit dem Mikrofluidik (MF)-System, Validierung des TE-MF-Modells mit Virusimitaten und Wirkstoffträger-Nanopartikeln (NP). TE-Modell wird mittels Elektrosponnen als Polycaprolacton-basierte Matrix mit eingestellter Porosität in Acibadem University (ACU) hergestellt. Diese kann durch die Produktionsparameter der Nanofasern gesteuert werden. Humane primäre pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hPMEC) und primäre alveoläre Epithelzellen (pHAECs) werden auf den gegenüberliegenden Seiten nach der Beschichtung mit ECM-Proteinen (Collagen Typ IV und Laminin) ausgesät. Das TE-Modell wird mit dem MF-System von IKTS in Kooperation mit ACU zusammengebaut und getestet.

- **Im Arbeitspaket 2:** Mikrofluidiksystem

Erstellung eines detaillierten Konzepts zur Entwicklung eines Lunge-on-Chip-Mikrofluidiksystems für die Integration in TE-MF-Modell, insbesondere zum Nachweis von SARS-CoV-2, basierend auf einer fundierten Analyse des aktuellen Stands der Technik. Technologische Umsetzung – Herstellung des mikrofluidischen Systems: Designentwicklung unter Anwendung von Clewin-Design-Software. Herstellung von Masken. Herstellung von Prototypen des Mikrofluidiksystems mit verschiedenen Designs und Materialien. Charakterisierung, Tests und Optimierung im Zusammenhang mit den Testergebnissen in AP 1 und AP 5. Folgende Aufgaben werden bearbeitet.

- Definition der Anforderungen an Mikrofluidiksystem und Zusammenfassung in einer Spezifikation.
- Entwicklung verschiedener Mikrofluidikdesigns mittels Clewin-Design-Software.
- Vorbereitung von Si-Chips und Masken mittels klassischer Photolithographie.
- Herstellung von Mikrofluidikprototypen mittels Softlithographie.
- Prüfung der Qualität von Strukturen nach der Herstellung und Vergleich mit der Spezifikation.
- Charakterisierung und Nachweis der Qualität: Durchlässigkeitstests mit verschiedenen Testlösungen, Charakterisierung der Strukturabmessungen, Reproduzierbarkeit der Herstellung.
- Nachweis der Funktionalität und Optimierung.
- Optimierung nach dem Erhalt von Messdaten aus AP 1 und AP 5. Konzipierung des finalen Designs.

- **Im Arbeitspaket 4:** Nanodiamanten-basierte Wirkstoffträger (Drug Carrier)

Im Arbeitspaket 4 wurden die Nanodiamant (ND)-basierte Target-Delivery-Plattform konzipiert und die Herstellung sowie die Charakterisierung der ND-Konjugate geplant. Insbesondere soll die Beladungskapazität und die Abgabekinetik des Wirkstoffs von der ND-Oberfläche bestimmt werden, um Rückschlüsse auf die Eignung als Delivery-

Plattform und das in vitro Leistungspotential zu ziehen. Hierbei werden die folgenden Aufgaben bearbeitet:

- Kommerzielle ND werden mittels Festkörpermahlung de-agglomeriert
- Hochtemperaturoxidation der de-agglomerierten ND um die Anzahl der -COOH Gruppen zu erhöhen
- Anbindung von Amin-terminierten PEG mit unterschiedlichem Molekulargewicht
- Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung mittels Dynamische Lichtstreuung und Infrarotspektroskopie
- Physikalische Adsorption des Wirkstoffes mittels Ultraschalles und Orbitalmischer
- Beladungskapazität über UV/Vis Spektroskopie bestimmbar + Kalibrierungskurve
- Sequenz des SARS-CoV-2 Spike Proteins (welche an die ACE2 Rezeptoren bindet) and die ND-PEG mittels carboxyl-reaktiver Vernetzungsmittel (DCC oder EDC/NHS) anbinden
- ND-Oberfläche mittels Infrarotspektroskopie charakterisieren
- Mittels Dialyse und UV/Vis Spektroskopie die Abgabekinetik (Konzentration als Funktion der Zeit) für beladene ND-PEG und ND-PEG-liganden bestimmen.

- **Im Arbeitspaket 5:** Funktionstests mit SARS-CoV-2-Virusisolaten

Durchführung von Funktionstests von TE-MF-Modell mit NP und Virusisolat von Universitas Gadjah Mada (UGM). Analyse der Effizienz und Funktionalität um als pulmonales Blut-Luft-Grenzflächenmodells verwendet zu werden. Funktionale Assays und Mikroskopie werden eingesetzt, um die Fähigkeit zur Virusanbindung und -Replikation zu untersuchen (in Kooperation mit UGM). Funktionstests mit Favipiravir-beladenen ND im TE- und TE-MF-Modell. Analyse der Ergebnisse.

1.2 Stand der Arbeiten im Arbeitsplan IKTS

Alle Arbeiten haben einen guten Stand der Bearbeitung. Es bestehen gute Aussichten innerhalb des verbleibenden Zeitraums die Bearbeitung des Projektes erfolgreich abzuschließen. In der nachfolgenden Tabelle (Abbildung 1) sind die Arbeitspakete mit Status aufgelistet.

Arbeitspaket	Status
AP 1 Tissue Engineering (TE)-Grenzflächenmodell	abgeschlossen
AP 2 Mikroarchitekturdesign des Mikrofluidiksystems	abgeschlossen
AP 4 Nanodiamanten-basierte Wirkstoffträger	abgeschlossen
AP 5 Funktionstests mit SARS-CoV-2-Virusisolaten	abgeschlossen

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 1 Status der Bearbeitung von Arbeitspaketen IKTS

1.3 Beschreibung der Projektergebnisse in den Arbeitspaketen IKTS

1.3.1 Arbeitspaket 2: Mikrofluidiksystem

1.3.1.1 Literaturübersicht zu Lunge-Auf-Chip-Systemen

Mikrofluidikstrukturen in Lunge-Auf-Chip-Modellen

Die Entwicklung der Forschung in die Richtung der Organe-Auf-Chip-Modellen gewinnt in der wissenschaftlichen Gemeinschaft zunehmend an Interesse. Im Vergleich zu konventionellen in vitro Methoden ermöglichen diese Techniken ein verbessertes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Wirkstoffen und den modellierten Organen, Organteilen und biologischen Schnittstellen. Die Entwicklung von menschlichen Organ-Auf-Chip-Modellen für komplexe Krankheiten, welche als Alternative zu Tierversuchen eingesetzt werden, und die kommerziell erhältlichen Chips wurden an anderer Stelle ausführlich behandelt [1]. In diesem Abschnitt wird ein kurzer Überblick über die jüngsten Aktivitäten bei der Entwicklung des Lungenchipmodells und Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung gegeben. Die Recherche konzentriert sich auf die funktionalen Elemente der Lungen-Auf-Chipmodelle und deren Herstellungstechnologien, insbesondere die Herstellung selbst und die Funktionalität von Membranschnittstellen, der Mechanismus zur Nachahmung des Atmens, die Kanalkonfiguration, Grenzen des Modells und weitere wichtige Aspekte betrachtet.

Das von Huh et al. am Wyss-Institut entwickelte Lungen-Auf-Chip-Modell ist das am häufigsten verwendete und bekannteste Variante [2-5]. Es wurde auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) durch Softlithographie hergestellt. Das Modell bestand aus einer oberen und einer unteren mikrofluidischen Kammer mit Kanälen und einer 10 μm dicken, porösen Membran, welche die Bestandteile räumlich voneinander trennte und auf der Luftseite ein Flimmerepithel sowie auf der Basalseite ein Endothel trug. Um die Dehnung der Alveolarmembran durch die Atmung zu imitieren, wurden zyklische Druckimpulse von Seiten der Membran angelegt. Die Anwendung zyklischer Dehnungen auf die Alveolarmembran wurde von Stucki et al. [6] mit einem zerlegbaren Alveolus-on-Chip-Modell demonstriert. Das Modell wurde so konzipiert, dass es die Mikroumgebung des Lungen-Parenchyms nachbildet, während ein Mikrozwerchfellsystem verwendet wurde, um das native Zwerchfell zu simulieren. Ein weiteres Modell wurde von Zamprogno et al. unter der Bezeichnung "second generation lung-on-a-chip" vorgestellt und sollte die geometrischen Abmessungen der Alveolen in vivo besser nachahmen [7]. Für das Modell wurde eine Gelmembran aus einer Kollagen-Elastin-Mischung (CE) verwendet, die in ein Goldnetz mit einer Anordnung von 40 regelmäßigen Sechsecken eingefasst war (Abbildung 2). Die Membran wurde in einen mikrofluidischen Aufbau mit zwei Kompartimenten aus PDMS und Polycarbonat integriert und durch zyklischen Unterdruck ausgelenkt, um eine Atembewegung zu imitieren.

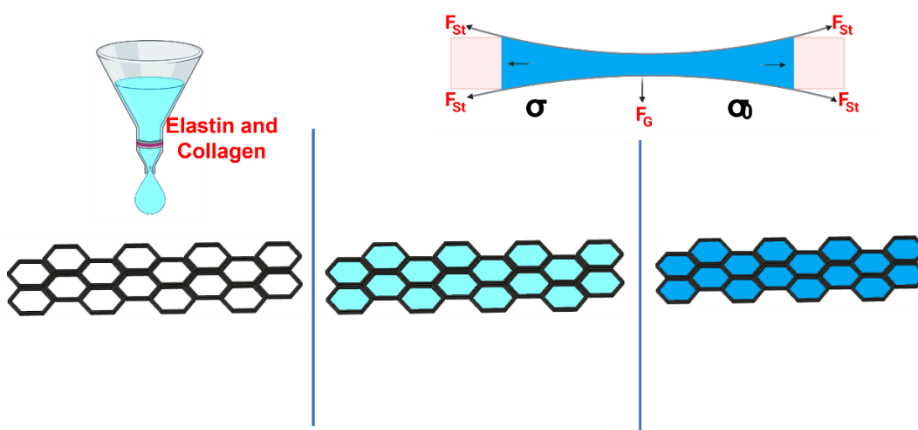


Abb. 2 Lungenmodell aus einer Gelmembran aus einer Kollagen-Elastin-Mischung (CE), in ein Goldnetz mit einer Anordnung von 40 regelmäßigen Sechsecken eingefasst.

Ein anderes Modell besteht aus drei vertikal gestapelten PDMS-Mikrofluidik-Kompartimenten, die durch nanoporöse Membranen getrennt sind, um das Epithel der Atemwege, primäre Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen zu kultivieren [8]. Ein weiteres Dreischichtmodell mit einer Hydrogelschicht wurde verwendet, um die Interaktion

zwischen Epithelzellen, glatten Muskelzellen und einer unterstützenden ECM (Kollagen, Hydrogel oder eine Kombination von beidem) zu untersuchen [9]. Die mikrofluidische Apparatur wurde aus Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt, einem thermoplastischen Polymer, das durch Mikrofräsen und lösungsmittelunterstützte thermische Bindungsmethoden hergestellt wurde, um die Massenherstellung zu erleichtern und die Extraktion des Hydrogels durch Zerlegen der Vorrichtung zu ermöglichen. Ein Airway-on-a-chip-Modell wurde durch 3D-Bioprinting eines vaskulären Netzwerks mit PCL, Biotin aus Lungenfibroblasten (LF) und Endothelzellen (EC) und PDMS hergestellt [10]. Die Plattform bestand aus einem zentralen Reservoir für EC und zwei seitlichen Reservoirs mit LF-Biotinte, die durch PCL-Mikrokanäle für den Medienfluss getrennt waren. Mit dieser Methode wurde erfolgreich ein Atemwegsmodell hergestellt, das eine funktionelle Schnittstelle mit dem Gefäßnetz bildet.

Membranen für Lunge-Auf-Chip-Modellen

PDMS-Membranen, die durch weiche Lithographie hergestellt wurden (Abb. 3), sind in Lunge-Auf-Chip-Modellen weit verbreitet, obwohl PDMS kleine hydrophobe Moleküle absorbieren kann [11, 12]. Um Membranen mit Poren zu erhalten, wird eine PDMS/Vernetzer-Mischung (Verhältnis 10:1) auf eine Siliziumvorlage gegossen, die Säulen mit vorgegebenem Durchmesser enthält. Das gegessene PDMS wurde komprimiert und thermisch behandelt, um das PDMS zu polymerisieren. Nach der Vernetzung von PDMS (ca. 24 h, 60°C) wurde die Membran von der Masterstruktur entfernt, wodurch eine Schnittstelle für die Vorbehandlung der Zellkultur (Bioadhäsionsmittel) und die Vorbereitung der Zellaussaat geschaffen wurde.

Ein in ein mikrofluidisches System integriertes Modell einer gekrümmten Mikro-Kulturmembran wurde von Di Huang et al. entwickelt, wobei die Auswirkungen gekrümmter Oberflächen im Mikrobereich auf das Zellverhalten im Vordergrund standen [13]. Bei der Herstellung der Membran werden Alginat-Mikrokügelchen zu einem geschlossenen Gitter mit möglichst geringem Abstand zueinander zusammengesetzt [14-18]. Der freie Raum zwischen den Mikrokügelchen wurde mit GelMA-Lösung gefüllt. Nach der Vernetzung von GelMA wurden die Alginat-Mikrokügelchen entfernt, so dass ein die Alveolen nachahmendes Hydrogel mit einheitlicher Porengröße und fensterartigen Verbindungen zwischen den Poren zurückblieb. Auf diese Weise wurde eine wirksame Luftzirkulation und Belüftung innerhalb des Hydrogels erreicht. Die Autoren berichteten von erfolgreicher Zellanhaftung, Proliferation und Ausbreitung der Zellen, die auf das Vorhandensein von Arg-Gly-Asp-Sequenzen und auf Matrix-Metalloproteinase ansprechende Peptidmotive in dem Modell zurückzuführen sind.

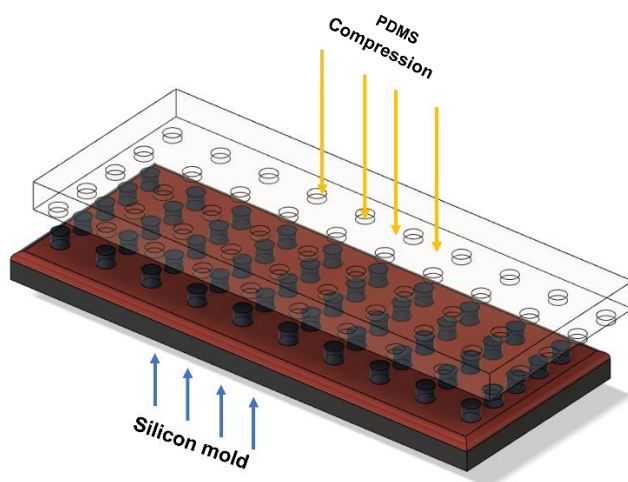


Abb. 3 Herstellung von PDMS-Membranen durch soft Lithographie.

1.3.1.2 Definition der Anforderungen an Mikrofluidiksystem und Zusammenfassung in einer Spezifikation

Die Anforderungen an das mikrofluidische System wurden definiert, um folgende Funktionalität zu gewährleisten: Eine dünne, poröse Membran sollte von beiden Seiten zugänglich sein, um die Zellkulturen in flüssiger Phase zu säen und zu ernähren. Hierdurch wird ein ausreichendes Mediovolumen und die Fähigkeit Nährstoffe ständig durch den Kanal zu pumpen, der mit der Membran in Kontakt steht gewährleistet. Darüber hinaus sollte die Membran dehnbar sein, um Atembewegungen nachzuahmen. Hierfür wurden dem Design zwei Luftkammern hinzugefügt, die durch eine dünne Wand vom Hauptflüssigkeitskanal getrennt sind. Die Ausübung von Unterdruck auf den Luftraum ermöglicht es, die dünnen Wände zu biegen und somit die angeschlossene Membran zu dehnen. Das Gerät sollte optisch transparent und biokompatibel sein. Nach ausführlicher Literaturrecherche und Definition des Systembedarfs wurde entschieden, ein zweischichtiges mikrofluidisches System aus PDMS herzustellen, das von einer Seite für den Schlauchanschluss zugänglich ist (für optische Mikroskopie-Untersuchungen verwendbar). Die gefertigte poröse Membran befindet sich zwischen zwei mikrofluidischen Zellen, welche Kanäle für Zellkulturmedien und Luftkammern zur Dehnung der Membran enthält. Die Entwicklung des PDMS-basierten mikrofluidischen Systems erfolgte nach den bereitgestellten Informationen der verantwortlichen Partner für Membranherstellung und nach Protokollen zur Zellkulturaussäung. Die Abmessungen des fluidischen Kanals (Höhe, Breite und Länge) sowie die Parameter und Lage der Luftkammern, die für die Atem-Nachahmung verantwortlich sind, wurden definiert. Mehrere Varianten des Designs wurden vorgeschlagen und weiter optimiert. Die erste Baureihe umfasste mikrofluidische Kanäle sowohl für den oberen als auch den unteren Kanal des Systems, zwei Ein- und zwei Ausgänge sowie eine Luftkammer, die durch eine dünne Wand vom Hauptkanal getrennt war. In der zweiten Charge wurde die Luftkammer optimiert: Ein Lufteinlass anstelle von zwei (erste Charge) wurde für die Luftmanipulation vorgesehen und die Form der Luftverbindung wurde geändert, um eine bessere Ausrichtung des oberen und unteren Zellbereichs und eine bessere Gesamtstabilität des Gerätes zu gewährleisten. Systeme der zweiten Baureihe wurden in zwei unterschiedlichen Kanalhöhen (50 µm und 100 µm) gefertigt. So wurden für jeden Kanalhöhenwert drei Versionen der mikrofluidischen Zellen mit unterschiedlichem Abstand zwischen Kanal und Luftkammer hergestellt, um vom Partner getestet zu werden. Die endgültigen Spezifikationen der mikrofluidischen Zelle werden nach dem testen mit der Membran und Zellkultur definiert. Die Werte der aktuellen Kanalabmessungen und weitere Spezifikationen sind Abschnitt 1.3.1.2 zu entnehmen.

1.3.1.2 Entwicklung verschiedener Mikrofluidikdesigns mittels Clewin-Design-Software

Die Clewin-Software wurde für den Entwurf der mikrofluidischen Zellen verwendet. Die erste Charge enthielt Variationen in der Dünnwanddicke (Abbildung 4).

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

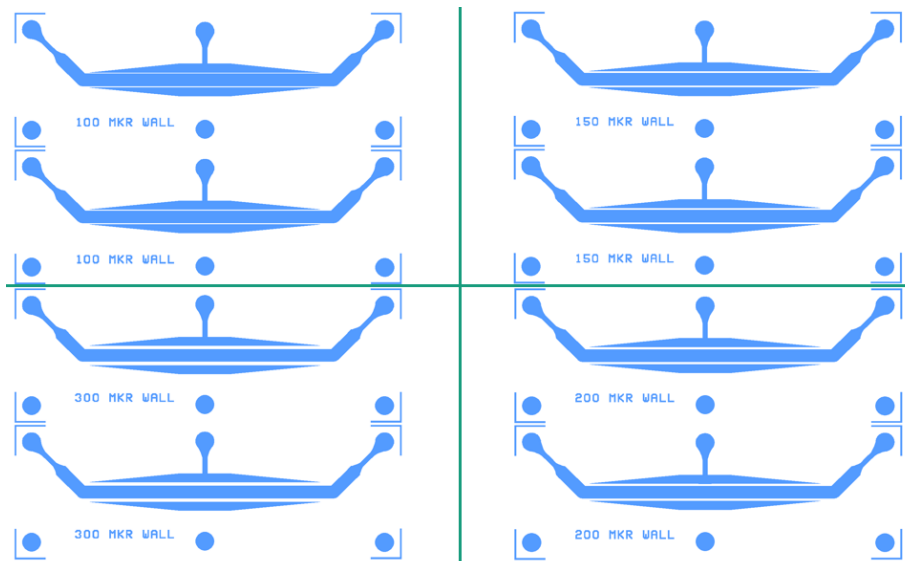


Abb. 4 Erste Baureihe: 20 mm x 1 mm Hauptkanal, Ein- und Ausgänge für Zellkulturen und Luft, vier verschiedene Wanddickenwerte.

Im vorliegenden Entwurf werden Ober- und Unterkanäle gleichzeitig hergestellt und übereinander platziert. Das Öffnen der Ein- und Ausgänge sollte nur auf einem der Kanäle erfolgen (Eingänge ausgerichtet). Die Topansicht des ausgerichteten Systems kann in Abbildung 5 gesehen werden. Der vorliegende Entwurf wurde nach Montageversuchen und Modifikationen der Luftkammer als nicht optimal befunden.

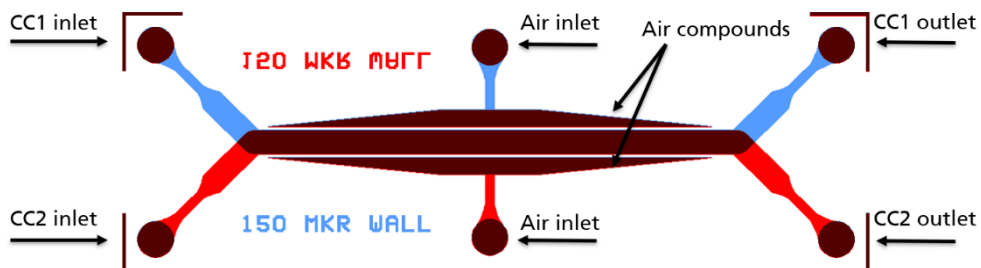


Abb. 5 Topansicht des ausgerichteten Systems (150 µm Wand Beispiel).

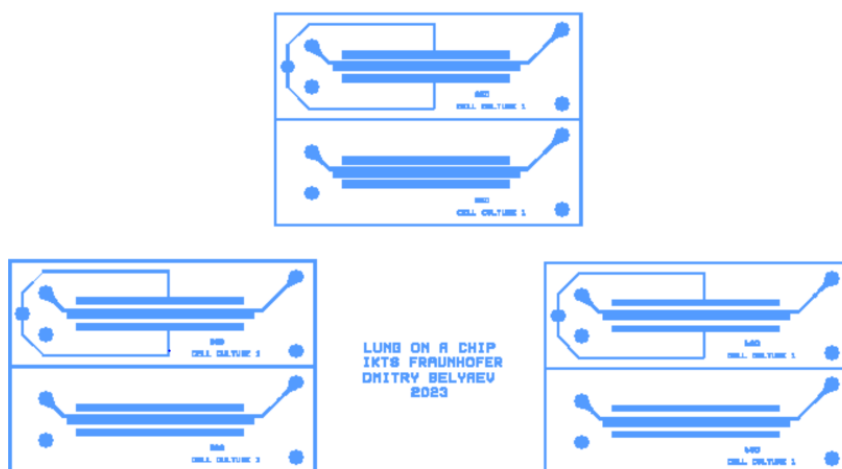


Abb. 6 Zweite Baureihe: 20 mm x 1 mm Hauptkanal, Ein- und Ausgänge für Zellkulturen und Luft, drei verschiedene Wanddickenwerte (350 µm, 500 µm und 650 µm)

Die Änderungen beinhalteten eine Verbesserung der Luftkammern, so dass der Druck in beiden Teilen der Kammern über nur einen Einlass geregelt werden kann. Darüber hinaus wurden die Form und der Abstand der Luftkammern für eine bessere physikalische Stabilität und Ausrichtung optimiert. Abbildung 7 stellt die Topansicht des aktuellen mikrofluidischen Systems dar.

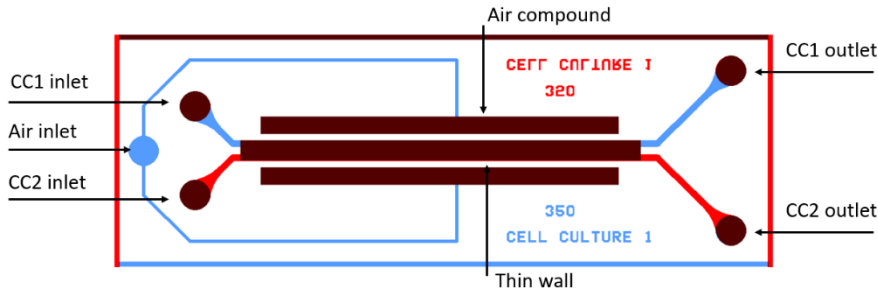


Abb. 7 Topansicht des ausgerichteten Systems (350 µm Wand Beispiel)

1.3.1.3 Vorbereitung von Si-Chips und Masken mittels klassischer Photolithographie

Die Herstellung der mikrofluidischen Bauelemente erfolgte über einen Laser-UV-Softlithographie-Workflow. Zuvor vorgestellte Entwürfe wurden durch Laserbeschriftungen auf Glaschrommasken übertragen (Heidelberg Instruments DWL 66, Deutschland). Die Glasmaske enthält zwei Schichten aus Chrom und Photoresist. Ein Laser malte das Design auf die Oberfläche des Photoresists (über 8 Stunden im Scan-Modus), welches dann mit dem AZ371B-Entwickler entwickelt wurde. Nachdem das Chrommuster freigelegt wurde, wurde es mit Chromätzter geätzt. Die für UV-Lithographie fertige Glasmaske ist auf der Abbildung 8 dargestellt.

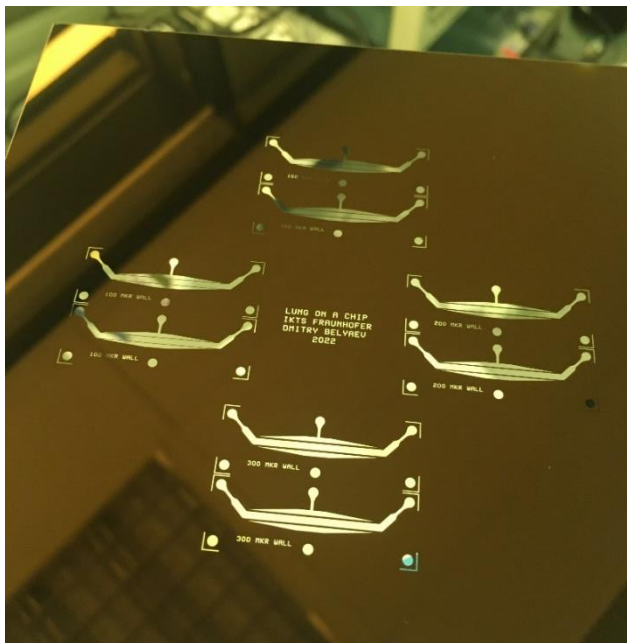


Abb. 8 Gebrauchsfertige Chrom-Glasmaske mit mikrofluidischem Lunge-auf-Chip-System-Design.

Die Chromglasmaske wurde für die Herstellung der Si-basierten SU8-Masterstruktur für die Softlithographie verwendet. Je nach gewünschter Höhe der mikrofluidischen Kanäle wurde SU8 2050 Photoresist auf der Oberfläche des Siliziumwafers drehbeschichtet. Masterstrukturen mit Kanalhöhen von 50 µm und 100 µm wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

1. Reinigung - Ultraschallbad in Aceton: 3 min, ohne Heizung Ultraschallbad in IPA: 3 min, ohne Heizung, Pinzette säubern
2. Adsorbiertes Wasser entfernen: Kochplatte 120°C für 10 min
3. Ti Prime: Wafer/Substrate mit Ti Prime bedecken und drehbeschichten mit 4000 rpm, 4000 rpm/s, 50 s
4. 2 Minuten bei 120°C auf die Heizplatte legen
5. SU8 2010/2050 Drehbeschichtung:
Drehbeschichtungs Parameter (15 m/ 50 m/100 m):
500 rpm, 100 rpm /s, 10 s /500 rpm, 100 rpm/s, 10 s / 500 rpm, 100 rpm /s, 10 s
2000 rpm, 300 rpm /s, 1 min / 3250 rpm, 300 rpm /s, 30 s / 1700 rpm, 300 rpm /s, 30 s
6. Vor backen:
1) 65°C, 1 min / 65°C, 2 min / 65°C, 2 min
2) Up to 95°C, 3 min / Up to 95°C, 3 min / Up to 95°C, 3 min
3) 95°C, 7 min /95°C, 7 min / 95°C, 14 min
7. Lithographie: Ausrichten und Belichten WEV ~18
8. Belichtung: 7.5 s /10 s / 12 s
9. Nach backen:
1) 65°C, 2 min / 65°C, 1 min / 65°C, 3 min
2) Up to 95°C, 3 min / Up to 95°C, 3 min / Up to 95°C, 3 min
3) 95°C, 5 min / 95°C, 6 min / 95°C, 10 min
10. Entwickeln in mr 600 dev für 2.5 min / 6 min / 9 min
11. 30 min bei 180°C hart backen.

Gebrauchsfertige SU8-Masterstruktur wird in Abbildung 9 gezeigt.

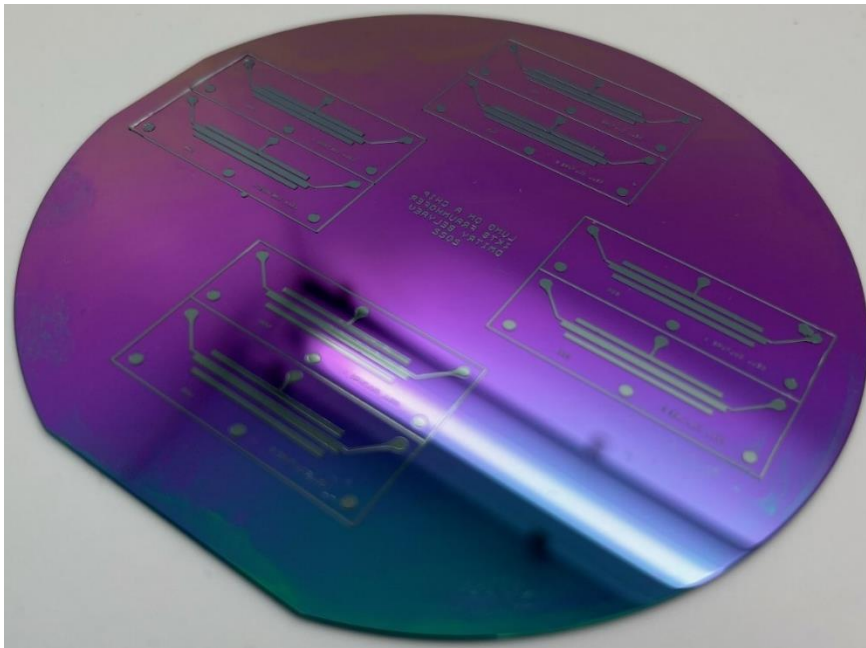


Abb. 9 - Gebrauchsfertige SU8-Masterstruktur mit Muster für ein 100µm hohe, mikrofluidische Lunge-auf-Chip Zelle.

Poly-Dimethylsiloxan (PDMS) wurde als Material für die Herstellung von mikrofluidischen Zellen verwendet. Es bietet optische Transparenz, Biokompatibilität, Flexibilität und ist ungiftig. Die PDMS-Basis wurde mit dem Crosslinker im Verhältnis 1 / 7,5 vermischt, entgast und auf die SU8-Masterstruktur gegossen. Nach einer Wärmebehandlung von 30 min bei 75 C wurde die Struktur vom Master getrennt, die Eingänge mit dem Biopsiewerkzeug durchstochen und die oberen und unteren Kammern nach der Plasmatherapie übereinander ausgerichtet. Die Abdichtung des Systems ist dauerhaft und auslaufsicher. Das gebrauchsfertige System ist in Abbildung 10 dargestellt.

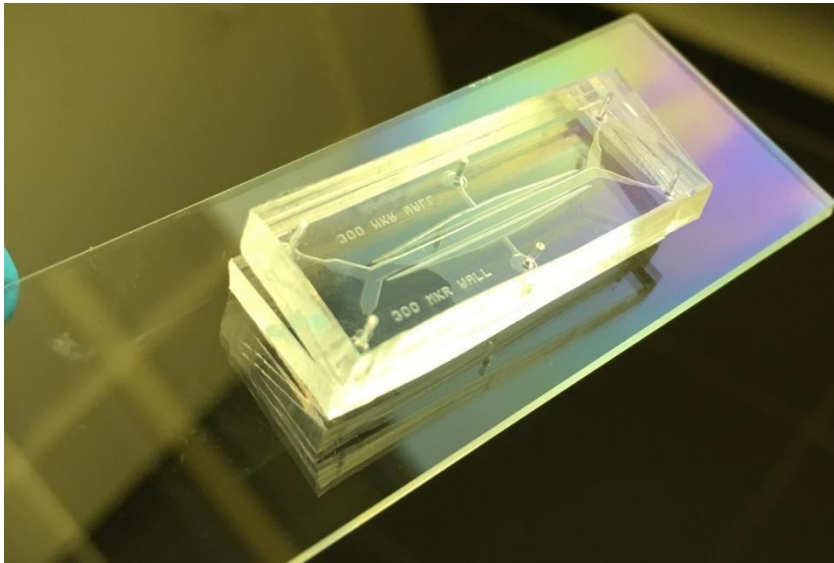


Abb. 10 - Gebrauchsfertiges mikrofluidisches Lunge-auf-Chip-System aus PDMS.

Prototypen von mikrofluidischen Modulen, die mit verschiedenen Parametern hergestellt wurden (Variation von Wanddicke und Kanalhöhe) wurden den Partnern für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Bei Bedarf werden weitere Optimierungsschritte durchgeführt.

Die PDMS Dünnschicht (10 μm Dicke) befindet sich in der Entwicklung. Nach Herstellung der jeweiligen Masterstruktur mit μ -Säulen von 4, 7 und 10 μm Durchmesser wird PDMS auf der Masteroberfläche mit anschließender Wärmebehandlung drehbeschichtet. An diesem Punkt hat die Membran geschlossene Poren und ist an der Masterstruktur befestigt. Mittels reaktiver Ionenätzung (RIE) können die Poren geöffnet werden, da während des RIE-Prozesses die obere Schicht der Probe entfernt wird. Die Ablösung der Membran und weitere Eingliederung in das mikrofluidische System sind in Arbeit. Abbildung 11 zeigt das Design der Membran.

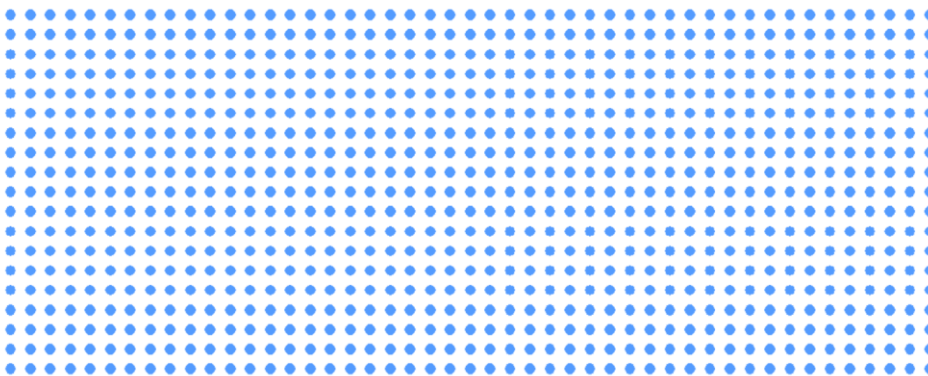


Abb. 11 - Design einer einfachen porösen PDMS-Membran (10 μm Dicke). Der Porendurchmesser beträgt hier 7 μm .

Die endgültige Version des Prototyps wurde umgesetzt, und die mikrofluidischen Geräte wurden mit Hilfe von Lithografieprotokollen in verschiedenen Varianten (Wandstärke und Schichtdicke) hergestellt (Abbildungen 12-14). Der Versuchsaufbau wurde zusammengebaut (einschließlich Schläuchen, Anschlüssen und benötigtem Verbrauchsmaterial) und an die Kooperationspartner zur Implementierung der Membranen geschickt.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse



Abb. 12 - Zusammengebaute mikrofluidische Vorrichtung

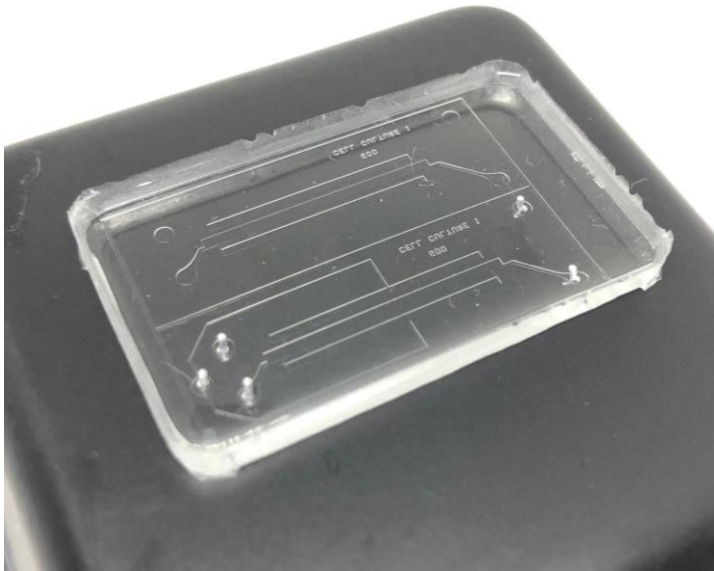


Abb. 13 - Unmontiertes mikrofluidisches Gerät

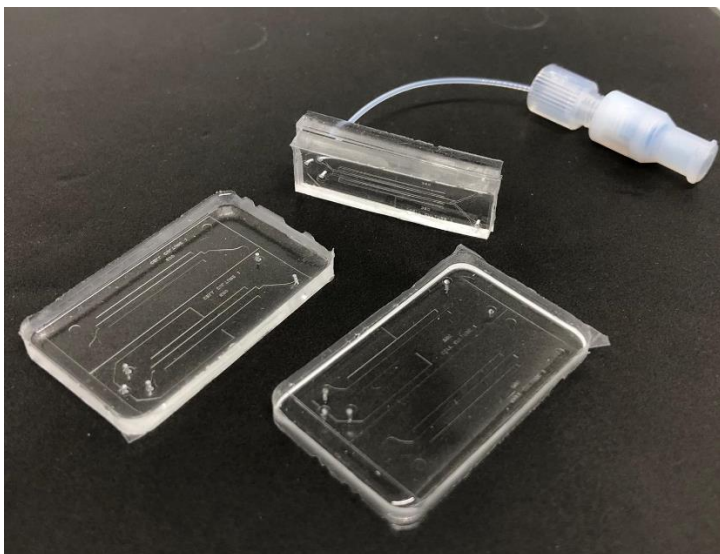


Abb. 14 - Verschiedene mikrofluidische Lunge-auf-Chip Geräte für die Implementierung von Membranen

Beim Zusammenbau des Geräts, einschließlich der Einführung der μ -Membran, wurden mehrere erfolgreiche Versuche unternommen. Die Membran wurde an beiden Teilen des Geräts befestigt. Die Verklebung erfolgte durch O_2 -Plasmaexposition. Bei den Versuchen mit Wasser war die Abdichtung zwischen den PDMS-Teilen der Vorrichtung nicht komplett hermetisch, was zu Leckagen führte. Eine weitere Anpassung der Plasmastrahlungszeit war daher erforderlich.

Um eine Rückgewinnung der verwendeten Membran zu ermöglichen, wäre eine Plasmapersiegelung keine Option, da sie dauerhaft ist. Hier soll ein neues Material für das Gerät zum Einsatz kommen. Ostemer ist ein transparentes, biokompatibles Photopolymer. Das UV-behandelte Polymer verfestigt sich und ist gleichzeitig sehr klebrig. Um eine neue Lunge auf einem Chip aus Ostemer herzustellen, wurde das Design angepasst: Luftkammern wurden gestrichen und mehrere „verschließende“ Strukturen wurden eingeführt. Das neue Gerät ist in der Abbildung dargestellt.

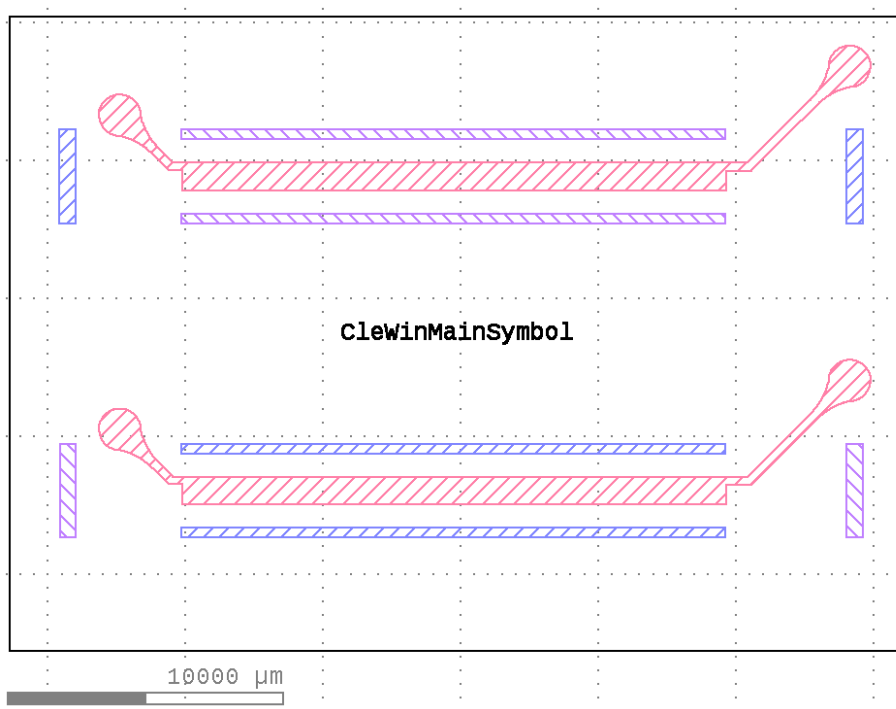
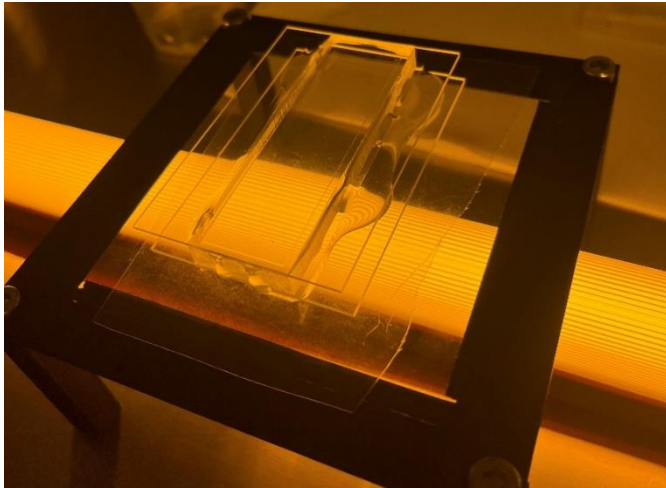


Abb. 15 - Lunge-auf-Chip Design zur Herstellung mit Ostemer

Die Herstellung mit Ostemer folgt der UV-Lithographie, beinhaltet aber die Herstellung einer negativen PDMS-Form. Der Herstellungsprozess ist in Abbildung 16 zu sehen.



1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 16 - Lunge-auf-Chip Design zur Herstellung mit Ostermer

Bei dem neuen Design wird die Membran nicht durch Plasmabehandlung an der Vorrichtung befestigt, sondern mechanisch gehalten, wobei auch die Möglichkeit besteht, die Vorrichtung zu demontieren und die Membran für weitere Analysen zu entnehmen. Die Herstellung des optimierten Prototyps ist im Gange.

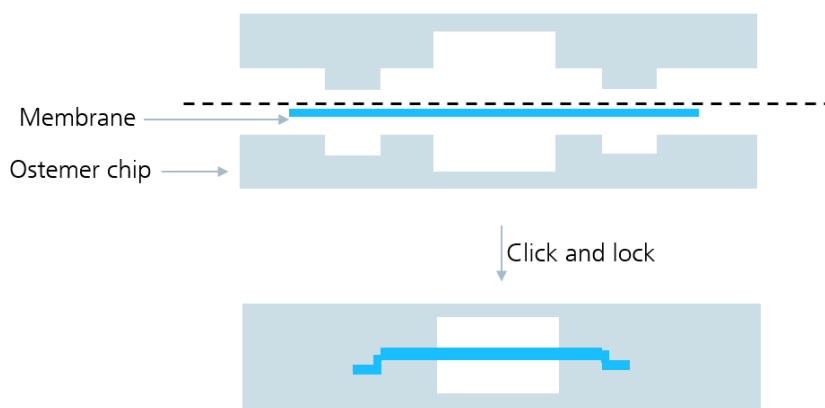
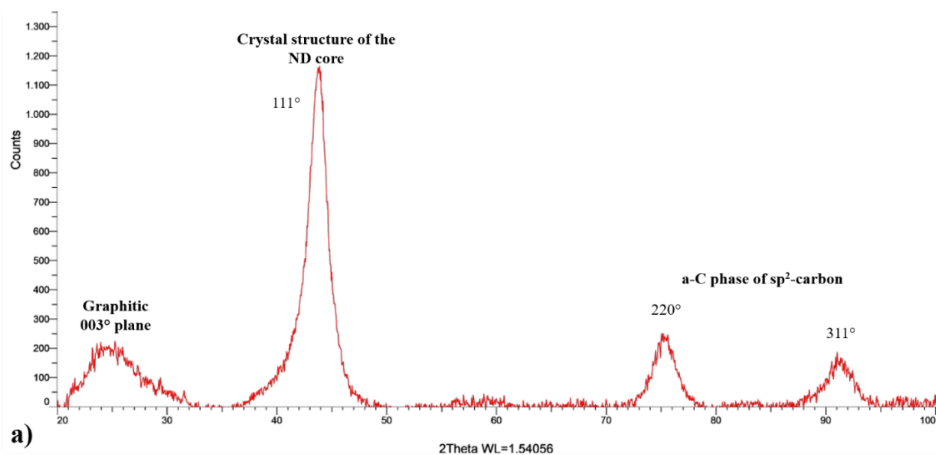


Abb. 17 - Lunge-auf-Chip Design zur Herstellung mit Ostermer

1.3.2 Arbeitspaket 4: Nanodiamanten-basierte Wirkstoffträger (Drug Carrier)

1.3.2.1 Herstellung, Modifizierung und Charakterisierung von Nanodiamanten

Das Ausgangsmaterial für dieses Projekt waren Nanodiamanten (ND), die mit der Detonationsmethode hergestellt wurden, mit einer durchschnittlichen Agglomeratgröße von 140 nm und einem Zetapotenzial von -15 mV und einer Reinheit von 98% (Lieferant: Adámas Nanotechnologies).



1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 18 - XRD-Analyse von nicht modifiziertem ND mit dem charakteristischen Peak der Kristallstruktur des ND-Kerns bei 111°, der a-C-Phase des sp²-Kohlenstoffs bei 220° und 311° sowie einem breiten Peak, der dem Graphit bei 003° entspricht.

Die Modifikation der ND begann mit einer Reinigungsmethode, die als salzunterstützte Luftoxidation (SAAO) bekannt ist, um Verunreinigungen und Schadstoffe in der ND-Probe zu beseitigen und einen Großteil der Carboxylgruppen in die Oberfläche der ND einzubringen. Anschließend wurden diese carboxylierten NDs einem De-agglomerationsprozess unterzogen, entweder durch salzunterstützte Ultraschalldeaggregation (SAUD) oder durch Sonden-Ultraschall. Die für die weitere Funktionalisierung verwendeten ND-Proben wurden aus dem Ergebnis der Sonden-Ultraschallbehandlung ausgewählt, da diese Technik zu einer besseren Deagglomeration der NDs führte. Anschließend wurden die NDs entweder mit PEG-Bis(amin) oder H₂N-PEG-COOH durch carboxyl-reaktiven Reaktionen angebunden. Daher wurden die NDs mittels TEM, DLS, FTIR und TIRF charakterisiert, wie in 3.3 Methoden zur Charakterisierung von Nanodiamanten beschrieben.

Salzunterstützte Luftoxidation (SAAO)

ND in Pulverform wurden gemischt mit NaCl in einem Massenverhältnis von 1:5 (NDs:NaCl) gemischt. Die Mischung wurde in Keramiktieglern gegeben und unter Luftatmosphäre bei 415°C für 5 Std. erhitzt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend gewogen, um die Massenausbeute nach der thermischen Behandlung zu berechnen. Anschließend wurde die Mischung in Reinstwasser dispergiert und in einem Ultraschallgerät bei 45 kHz eine Stunde lang bei Raumtemperatur beschallt. Die ND wurden final mit Reinstwasser gewaschen und das NaCl durch Zentrifugation wie folgt entfernt: 1000 RCF für 5 Min., 3000 RCF für 5 Min., 8000 RCF für 10 Min. und 8000 RCF für 20 Min. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt aufgefangen und die NaCl-Konzentration wurde mit einer Standardtitrationmethode zur Quantifizierung von Chloridionen, der Mohr-Titration, gemessen. Das Präzipitat der Probe wurde zur weiteren Charakterisierung 48 Std. in einem Exsikkator getrocknet.

Das Ziel dieser ND-Behandlung bestand in der Beseitigung von Metall- und Nicht-Diamant-Kohlenstoffverunreinigungen sowie die Homogenisierung ihrer Oberflächenchemie durch die Einführung der Carboxylgruppen. Dies wurde durch eine thermische Oxidationsbehandlung erreicht, die durch die Zugabe von NaCl unterstützt wurde, das den Oxidationsprozess durch Schaffung einer Ätzatmosphäre bei hohen Temperaturen beschleunigt. Der Massenertrag der ND-NaCl-Mischung nach der SAAO betrug 93,62 %. Das nach jedem Zentrifugationsschritt im Überstand verbliebene NaCl wurde durch die Mohrsche Titration quantifiziert. Die Ergebnisse der NaCl-Quantifizierung durch die Mohrsche Titration sind in Abbildung 19 dargestellt. Die NaCl-Konzentration ist im Überstand nach der vierten Zentrifugation mit 0,02% sehr gering, so dass weitere Charakterisierungs- und Funktionalisierungsschritte mit dieser Vorbehandlung (8000 RCF und 20 min) durchgeführt wurden sind.

RCF	1000 g	3000 g	8000 g	8000 g
Zeit in min	5	5	10	20
Na-Konzentration im Überstand in %	27,1	1,1	0,2	0,02

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen
Abb. 19 Na-Konzentration der ND-Proben nach SAAO und Zentrifugation.

Als Nächstes wurde die Oberflächenchemie der unbehandelten NDs und der NDs nach SAAO mittels FTIR untersucht und verglichen, um ihre Oberflächenchemie zu bewerten. Die resultierenden FTIR-Spektren beider Proben sind in Abbildung 20 dargestellt.

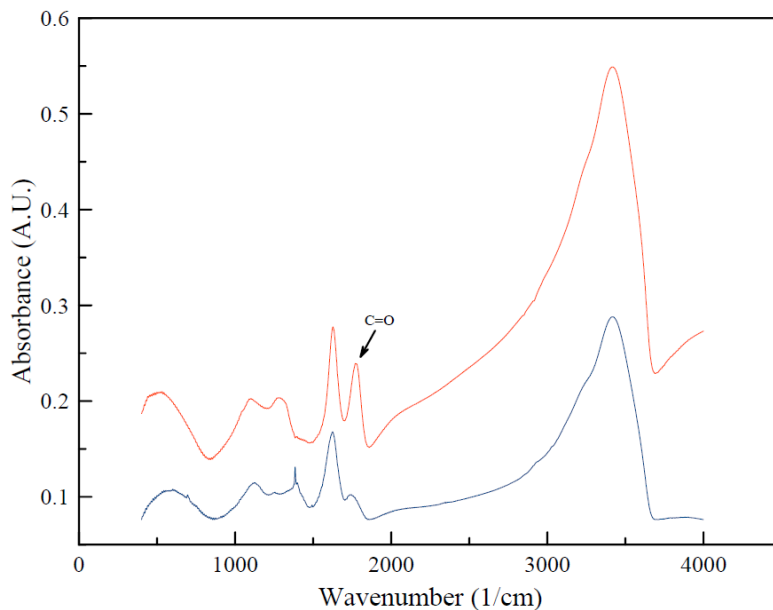


Abb. 20 FTIR-Spektren der unbehandelten NDs (blau) und NDs, die mit SAAO behandelt wurden (rot).

Es ist zu erkennen, dass die Spektren beider Proben sehr ähnlich sind, mit Ausnahme einer ausgeprägten Bande bei 1723 cm^{-1} in der Probe, die der SAAO unterzogen wurde. Diese Bande kann auf die C=O-Streckschwingung der Carbonsäuren zurückgeführt werden. Eine Intensitätszunahme der Bande legt die Zunahme der -COOH Verbindungen an der ND-Oberfläche nahe. Darüber hinaus ist das Auftreten einer breiten Bande bei $1250\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ für die oxidierten NDs zu sehen, welche der C-O-Streckung der Carbonsäuren zugeschrieben werden kann. Die Bande mit der höchsten Intensität befindet sich in beiden Proben bei derselben Wellenzahl von 3420 cm^{-1} . Dies ist ein sehr breiter Peak, der der O-H-Streckung zugeschrieben wird, die in COOH- oder OH-Gruppen auftritt. All dies deutet auf eine verstärkte Einführung von Carboxylgruppen in die Oberfläche von NDs hin, die einer SAAO unterzogen wurden. Es kann die Carboxylierung von NDs, die mittels SAAO behandelt wurden, bestätigt werden. Abgesehen davon gibt es in den Spektren beider Proben keine weiteren Peaks, die auf das Vorhandensein von metallischen oder diamantfremden Verunreinigungen in den NDs hindeuten. Daher werden die carboxylierten NDs für den nächsten Funktionalisierungsschritt verwendet.

De-agglomeration der carboxylierten ND

Nach der SAAO-Behandlung wurden die Größe und Morphologie der NDs mittels TEM charakterisiert. Es wurden TEM-Hellfeldbilder von unbehandelten und carboxylierten ND aufgezeichnet, um ihre Größe und Morphologie zu vergleichen. In Abbildung 21 sind Aufnahmen von beiden ND-Proben dargestellt. Die Bilder sind repräsentativ für die beiden Hauptpopulationen von ND, die in beiden Proben gefunden wurden, wobei die Agglomeratgröße zwischen $5\text{ }\mu\text{m}$ und 200 nm variierte. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in Form und Größenverteilung der beiden ND-Proben festgestellt.

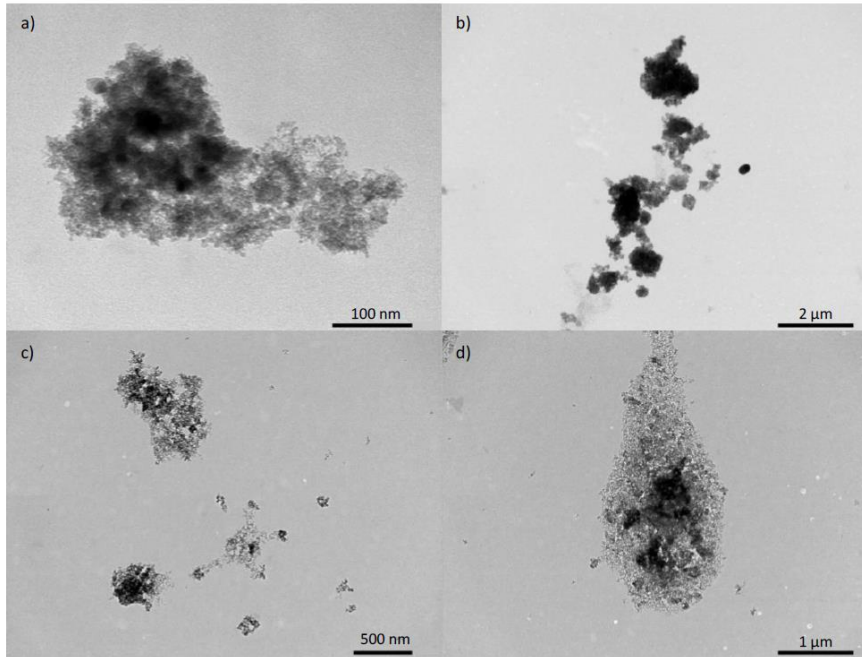


Abb. 21 TEM-Aufnahmen von un-
behandelten ND (a-b) und carboxy-
lierten ND (c-d).

Anschließend wurde mittels DLS die Partikelgrößenverteilung der Agglomerate von un-
behandelten und carboxylierten NDs analysiert. Die Größenverteilung der beiden Proben
ist in Abbildung 22 dargestellt.

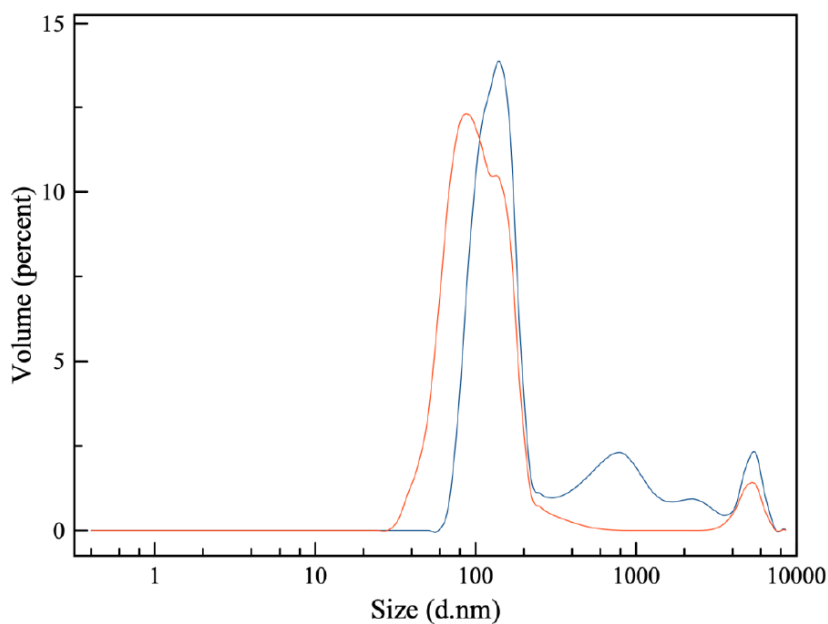


Abb. 22 Partikelgrößenverteilung
von un-
behandelten und carboxy-
lierten NDs anhand einer DLS-Mes-
sung

Hier ist zu erkennen, dass die durchschnittliche Größe der unbehandelten ND in wässri-
gen Suspensionen höher ist als die vom Hersteller angegebene Größe von 140 nm. Dies
kann auf die lange Lagerzeit zurückgeführt werden. Aufgrund von Kapillarkräften be-
ginnen die ND zu agglomerieren, wenn sie in Pulverform gelagert werden. Vergleicht
man die DLS-Ergebnisse der unbehandelten ND mit denen der carboxylierten ND, so ist
festzustellen, dass die durchschnittliche Größe der ND-Agglomerate nach SAAO von
277 nm auf 169 nm gesunken ist und der Polydispersitätsindex (PI) entsprechend von
0,399 auf 0,267. Trotz der Verringerung der durchschnittlichen Agglomeratgröße der

ND nach der SAAO sind mikrometergroße ND-Agglomerate vorhanden, welche vor dem nächsten Schritt des ND-Funktionalisierungsprozesses aufgebrochen werden müssen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei De-agglomerationstechniken getestet: Die salzunterstützte Ultraschalldeaggregation (SAUD) und die Sonden-Ultraschallbehandlung. Die ND-Proben wurden nach jeder Deagglomerationsmethode mittels DLS charakterisiert und die Ergebnisse verglichen. Die gemessene Größenverteilung der NDs vor und nach jeder Deagglomerationsmethode ist in Abbildung 23 dargestellt.

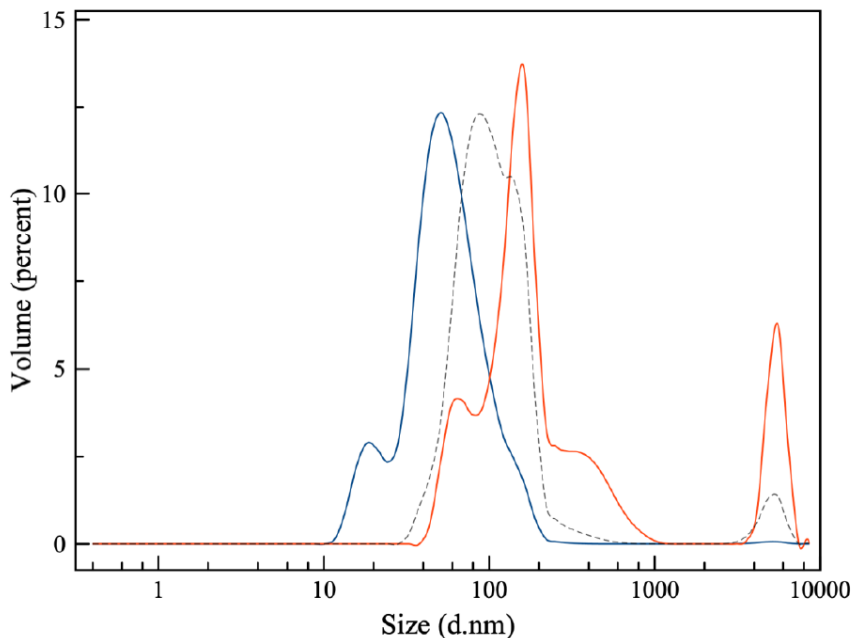


Abb. 23 Agglomeratgröße der carboxylierten ND nach der SAUD-Behandlung (rot), Sonden-Ultraschallbehandlung (blau) und der unbehandelten ND (gestrichelt).

Es ist zu erkennen, dass die Ultraschallbehandlung mit dem Sonden-Ultraschallgerät zu einem vollständigen Abbau der mikrometergroßen Agglomerate führte, die in der carboxylierten ND-Probe vorhanden waren, sowie zu einer Verringerung der durchschnittlichen Größe der Agglomerate auf 92 nm mit einer monodispersen Verteilung (PDI=0,209). Interessanterweise wies die ND-Probe nach SAUD einen Anstieg der durchschnittlichen Agglomeratgröße von 306 nm auf und auch das Gesamtpartikelvolumen der mikrometergroßen Agglomerate nahm um 9 % zu. Die Tatsache, dass die großen ND-Agglomerate durch SAUD nicht aufgelöst werden konnten, könnte auf die Verwendung eines Ultraschallsignals mit niedrigerer Frequenz zurückzuführen sein (45 kHz statt 60 kHz verwendeten). Die zunehmende Agglomeration der ND kann auf die Zugabe des NaCl beruhen, welche die kolloidale Stabilität der ND und die Ionenstärke des Suspensionsmediums verändert hat. Daher wurden nur die carboxylierten ND-Proben, die einer Sonden-Ultraschallbehandlung unterzogen wurden, für die nachfolgenden Funktionalisierungsschritte bzw. der Wirkstoffbeladung verwendet.

1.3.2.2 Wirkstoffbeladung und Bestimmung der Oberflächenladungskapazität

Der Wirkstoffbeladung der ND geht eine Anbindung von Polyethylenglykol (PEG) an die carboxylierten ND voraus. Hierbei wurde PEG durch EDC/NHS-Chemie kovalent auf die carboxylierten NDs aufgepfropft. Zunächst wurde PEG bis(amine), ein PEG mit einer Aminogruppe an jedem Ende des Moleküls, auf die carboxylierten NDs aufgepfropft, indem eine Amidbindung zwischen einer Aminogruppe von PEG bis(amine) und einer Carboxylgruppe auf der Oberfläche der ND durch EDC/NHS-Aktivierung gebildet wurde. Die NDs werden zunächst mit PEG konjugiert, um die Zirkulationszeit der NDs bei der Verabreichung im Körper zu verlängern, indem die unspezifische Bindung der NDs an Biomoleküle während ihres Transits durch den Organismus verringert wird. PEG verringert

die Nebenwirkung und erhöht den therapeutischen Index sowie die Wirksamkeit der Arzneimittel. Weitergehend bietet PEG die Möglichkeit, hydrophile Wirkstoff durch sterische Immobilisierung, unterstützt durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, zu binden.

PEG wurde mittels Carbodiimid-Vernetzer-Chemie kovalent an carboxylierte ND gebunden. In der Planungsphase dieses Projekts wurde die Verwendung von PEG bis(amine), einem PEG mit zwei Aminoenden, für die PEGylierung von NDs und die anschließende Biokonjugation des S1-Proteins von SARS-CoV-2 unter Verwendung der freien Amino-Gruppe des konjugierten PEG mit der Carboxygruppe des c-Terminus des Proteins erörtert. Um eine eigenständig induzierte Polymerisation der Proteine zu vermeiden, wurde zudem ein heterofunktionelles PEG mit einer Amino- und einer Carboxylgruppe an jedem Ende des Moleküls ($\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$) angefügt. In Abbildung 24 sind die FTIR-Spektren von $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$, carboxylierten ND und PEGylierten ND mit $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ abgebildet.

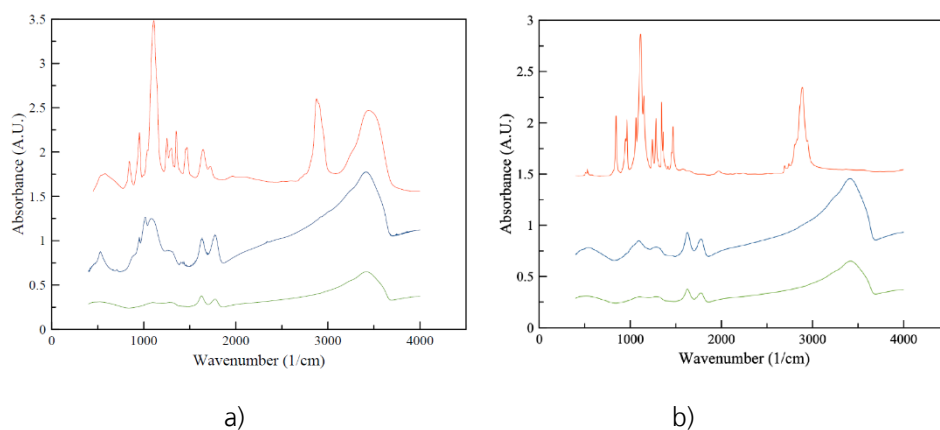


Abb. 24 (a) FTIR-Spektren von $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ (rot), carboxylierten ND (grün) und mit $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ konjugierten ND (blau). (b) FTIR-Spektren von PEG-Bis(amin) (rot), carboxylierten ND (grün) und mit PEG-Bis(amin) konjugierten ND (blau).

Die Abbildung 20 (a) zeigt das FTIR-Spektrum von $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ mit den charakteristischen Banden von ungebundenen PEG wie z.B. C-C-, C-O- und CH_2 -Schwingungen im unteren Bereich des FTIR-Spektrums (840 cm^{-1} - 1440 cm^{-1}). Die gleichen Banden sind ebenfalls bei den mit $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ konjugierten ND ersichtlich. Die PEG-Anbindung konnte durch die Amin-spezifischen Banden der konjugierten ND nachgewiesen werden, welche bei 1020 cm^{-1} bis 1240 cm^{-1} auftreten. Dadurch kann die erfolgreiche PEGylierung der ND bestätigt werden. In Abbildung 20 (b) sind die FTIR-Spektren von carboxylierten NDs, PEG-Bis(amin) und carboxylierten NDs nach PEGylierung mit PEG-Bis(amin) dargestellt. Hier zeigt das PEG-Bis(amin)-Spektrum ebenfalls die charakteristischen Banden von ungebundenen PEG am unteren Ende des Spektrums. Die Amin-spezifischen Banden des PEG-Bis(amin) sind bei den konjugierten ND ersichtlich. Was auf die erfolgreiche Konjugation von PEG mit den ND deuten lässt.

Mittels der UV/Vis Spektroskopie kann die Anbindung von PEG quantifiziert werden. Hierfür wird die Menge der ungebundenen PEG-Moleküle nach der Konjugation erfasst. Dadurch kann die Menge des an die ND-Oberfläche gebundenen PEGs berechnet werden. Hierfür wird eine Kalibrierungskurve aufgenommen, welche die Korrelation von PEG-Konzentration zur Intensität darstellt. In Abbildung 25 sind diese Kalibrierungskurven sowie die UV/Vis Spektren dargestellt.

Die UV/VIS-Spektren der gemessenen Proben zeigten ein Muster der Absorptionsabnahme mit zunehmender Verdünnung der Probe, was aufgrund der linearen Beziehung zwischen Absorption und Konzentration zu erwarten ist. Der am stärksten ausgeprägte und markanteste Peak in den UV/VIS-Spektren (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 25) wurde ausgewählt, um die Kalibrierungskurve zu erstellen. Im Falle des PEG-Bis(amin) wurde der Absorptionspeak bei 220 nm zur Erstellung der Kalibrierungskurve gewählt,

während der Absorptionspeak bei 329 nm für $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ gewählt wurde. Nach der Durchführung einer linearen Anpassung durch Summierung der Datenpunkte konnte die Kalibrierkurve erstellt werden. Die Güte der linearen Anpassung wurde durch einen hohen R^2 -Wert (Gütemaß der linearen Regression) mit $R^2 > 0,95$ nachgewiesen. Diese Kalibrierungskurven können im nächsten Schritt verwendet werden, um die Menge der angebundenen PEG zu quantifizieren.

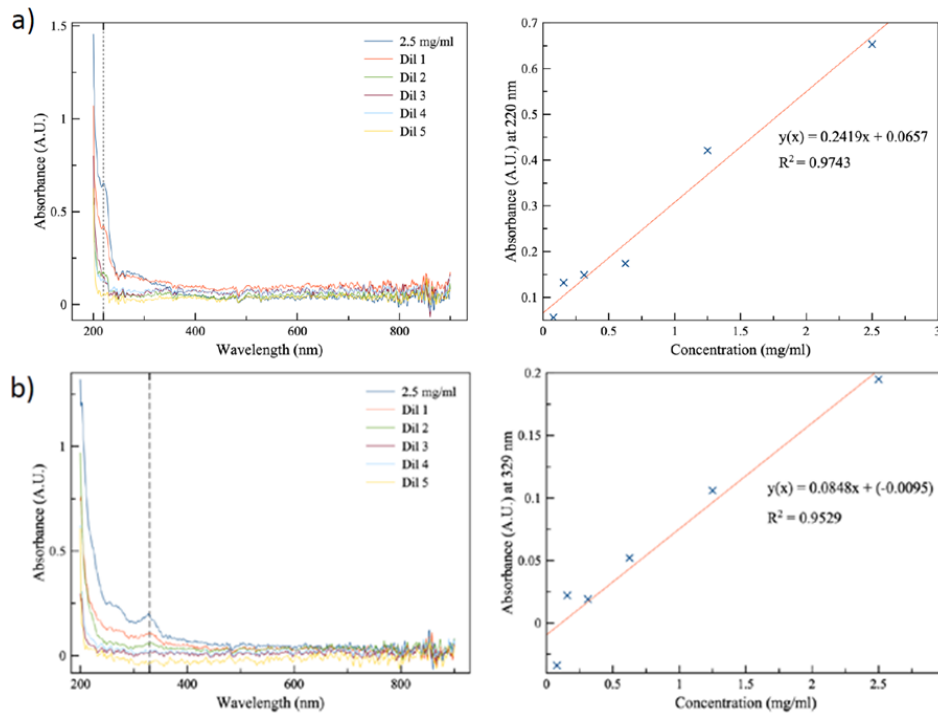
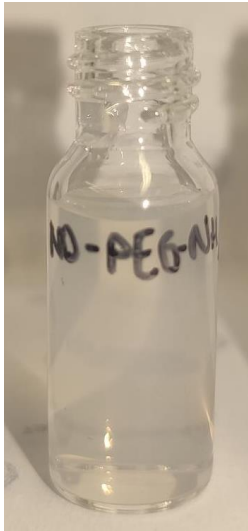


Abb. 25 UV/VIS-Spektren mit den resultierenden Kalibrierungskurven von (a) PEG-Bis(amin) und (b) $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$. Ausgehend von einer Stamm-lösung mit der PEG-Konzentration von 2,5 mg/ml wurde eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 (Dil 1-5) angefertigt. Die gestrichelte Linie in den UV/VIS-Spektren kennzeichnet den Absorptionspeak, der für die Erstellung der Kalibrierkurve verwendet wurde.

Die UV/VIS-Spektren der gemessenen Proben zeigten ein Muster der Absorptionsabnahme mit zunehmender Verdünnung der Probe, was aufgrund der linearen Beziehung zwischen Absorption und Konzentration zu erwarten ist. Der am stärksten ausgeprägte und markanteste Peak in den UV/VIS-Spektren (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 25) wurde ausgewählt, um die Kalibrierkurve zu erstellen. Im Falle des PEG-Bis(amin) wurde der Absorptionspeak bei 220 nm zur Erstellung der Kalibrierkurve gewählt, während der Absorptionspeak bei 329 nm für $\text{H}_2\text{N-PEG-O-C}_3\text{H}_6\text{-COOH}$ gewählt wurde. Nach der Durchführung einer linearen Anpassung durch Summierung der Datenpunkte konnte die Kalibrierkurve erstellt werden. Die Güte der linearen Anpassung wurde durch einen hohen R^2 -Wert (Gütemaß der linearen Regression) mit $R^2 > 0,95$ nachgewiesen. Diese Kalibrierungskurven können im nächsten Schritt verwendet werden, um die Menge der angebundenen PEG zu quantifizieren.

Die mit $\text{PEG-(NH}_2)_2$ funktionalisierten NDs wurden als 1 mg/mL-Suspension in bidestilliertem Wasser (Abbildung 26) mit nachfolgendem Verfahren hergestellt: 80 mg ND-PEG- NH_2 wurden in 15 mL ddH_2O homogenisiert und der pH-Wert auf 7,84 eingestellt. 0,8 g ZrO_2 -Perlen wurden für eine Perlenmahlbehandlung mit 2 Zyklen bei 700 U/min für 30 Minuten zugegeben, mit einer Pause von 10 Minuten dazwischen. Die ZrO_2 -Perlen wurden anschließend durch Filtration entfernt, und es wurde eine 1 mg/mL-Suspension in ddH_2O hergestellt. Im Anschluss daran wurde der pH-Wert auf 9 eingestellt, und die Sonde wurde 30 Minuten lang bei 70 % Leistung mit Ultraschall beschallt. Schließlich wurde der pH-Wert nach der Sterilisation in einem Autoklaven auf 6,93, ohne Anpassung, gemessen.



1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 26 ND-Suspension bei 1 mg/mL in ddH₂O von PEG-Diamin modifiziertem ND, bei 23°C.

Die sterile Probe wies eine durchschnittliche Partikelgröße von $108 \pm 0,5$ nm auf, mit einer Polidispersität von 0,3 und einem Zetapotenzial von -33 ± 3 mV. Die Aufrechterhaltung der PEG(NH₂)₂-funktionalisierten Oberfläche wurde durch FTIR-Messungen (Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy) nach der Desagglomerationsbehandlung nachgewiesen (Abbildung 28).

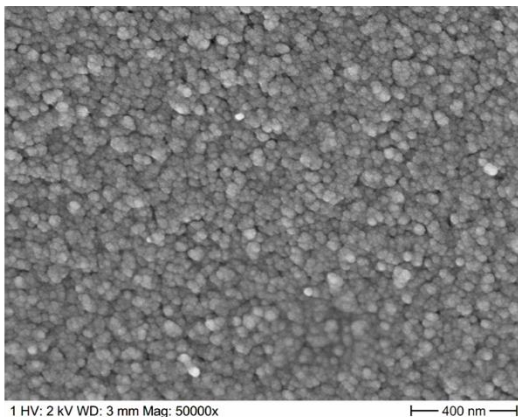


Abb. 27 REM-Aufnahme einer sterilen, mit PEG-Diamin modifizierten ND-Suspension von 1 mg/ml in ddH₂O, die eine einheitliche Partikelgröße zeigt.

Um zu bestätigen, dass die chemischen Modifikationen nach der Deaggregationsbehandlung beibehalten wurden, wurden mehrere Charakterisierungsmethoden angewandt. Die FTIR-Spektroskopie ergab charakteristische Peaks von PEG-Diamin, das auf das ND aufgepfropft wurde; deutliche Peaks bei 1103 cm^{-1} , $951,5 \text{ cm}^{-1}$ und 1252 cm^{-1} , die zu PEG-Diamin gehören, sind auf dem modifizierten ND vorhanden. C-O- und OH-Schwingungen werden auch bei $1781,5 \text{ cm}^{-1}$ und $1629,5 \text{ cm}^{-1}$ festgestellt.

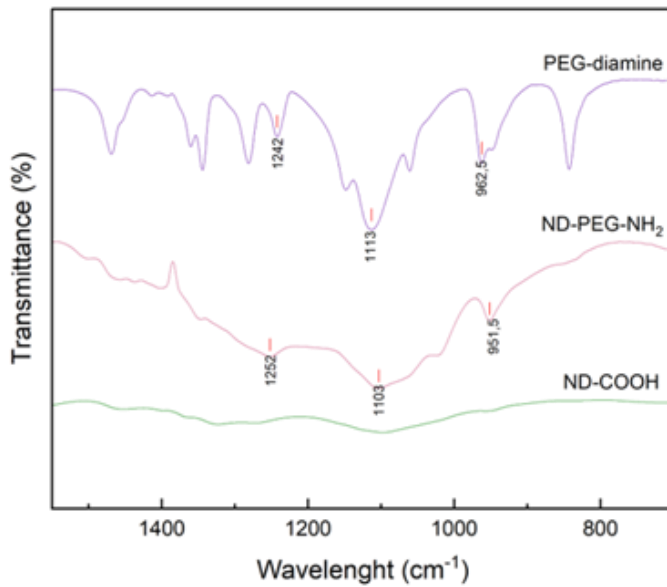


Abb. 28 FTIR-Analyse von carboxylierten NDs (grün), de-agglomerierter ND-PEG-NH₂-Suspension (rosa) und Vergleich mit PEG(NH₂)₂-Verbindung (violett).

Die Oberflächenchemie wurde mittels XPS-Analyse weiter analysiert, wobei die Atomkonzentration in Prozent der modifizierten ND-Proben wie in Abbildung 29 dargestellt erfasst wurde. Zusätzlich wurden die charakteristischen Peaks von PEG und die Kristallstruktur des ND-Kerns durch XRD-Analyse nachgewiesen (Abbildung 30).

Proben	Atomare Konzentration [%]					
	C 1s	C 2p	F 1s	N 1s	O 1s	Si 2p
Nicht modifizierte NDs	91,6	0,7	0,1	1,8	5,8	
PEG diamine modifizierte NDs	51,2			2,0	7,4	

Abb. 29 Analyse der Atomkonzentration der ND-Suspensionen mit Hilfe von XPS.

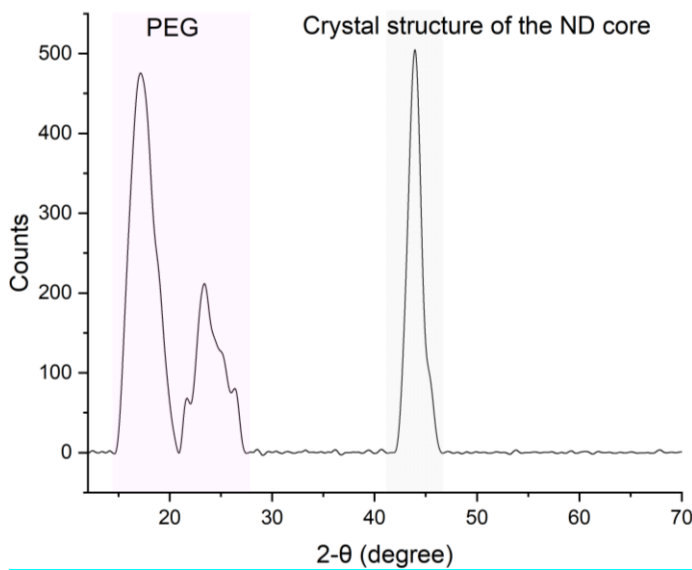
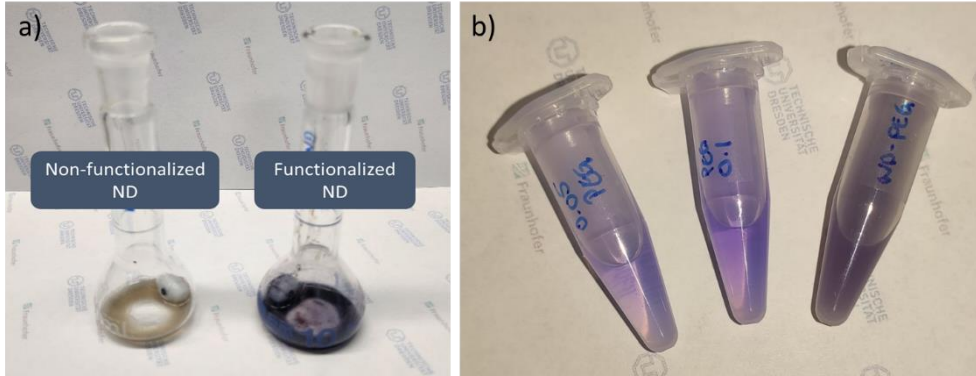


Abb. 30 XRD-Profil von ND-PEG-NH₂ mit dem typischen PEG-Peak im Bereich von 15 – 27 Grad.

Ninhydrin-Test

Die qualitative Charakterisierung von Amingruppen auf der ND-Oberfläche wurde mit einem Ninhydrintest (Kaiser-Testkit, 60017-Sigma-Aldrich) durchgeführt bei dem Ninhydrin mit freien primären Aminen reagiert, was zu einer Farbänderung führt (Abbildung 31), die als Ruhemanns Violett bekannt ist. Die quantitative Analyse ergab eine Absorption von $0,72 \pm 0,01$ nm für ND-PEG-NH₂. Daraus wurde eine Konzentration von $0,02$ μ M/mg für das PEG-Diaminmolekül berechnet.



1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 31 a) Nach Abschluss des Ninhydrin-Tests zeigen links nicht funktionalisierte NDs (handelsübliche Roh-NDs) eine hellbraune/gelbliche Farbe. Und die PEG(NH₂)₂-funktionalisierten NDs rechts zeigen das charakteristische Blauviolett des Ninhydrinkomplexes (positiver Ninhydrin-Test für die ND-PEG-NH₂-Partikel). **b)** Positiver Ninhydrintest für 0,05 mg und 0,1 mg PEG(NH₂)₂ im Vergleich zu 2 mg ND-PEG-NH₂, verdünnt in 1 ml 60 % Et.OH.

Schließlich wurden Fluoreszenzmessungen der modifizierten ND-Suspension mit einem FLS920-Spektrofluorometer von Edinburgh Instruments, UK, durchgeführt. Obwohl die ND nicht als fluoreszierende Nanopartikel im Handel erhältlich sind, ist bekannt, dass NDs eine natürliche NV-Fluoreszenz haben; die mit PEG-Diamin modifizierte ND-Suspension zeigte einen Anregungspeak bei 352 nm und eine Emissionskurve von 330 nm bis etwa 500 nm, mit einem schmalen Peak bei 314 nm (Abbildung 32).

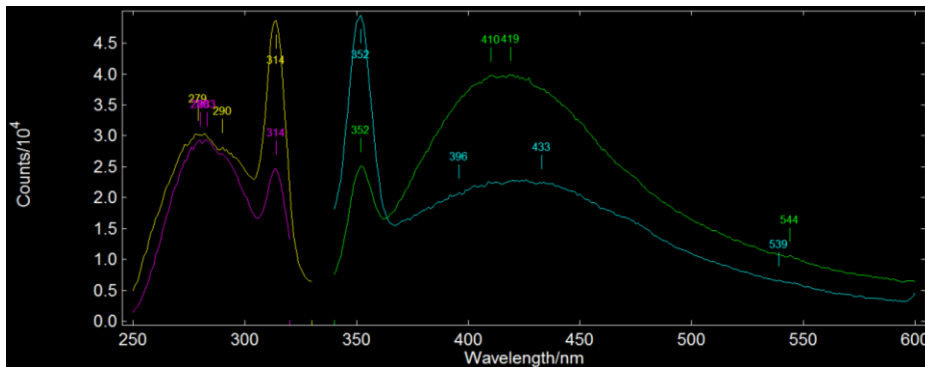


Abb. 32 Fluoreszenzanalyse der PEG-Diamin-ND-Suspension.

Um die gleichen Protokolle für ND-PEG-NH₂- und APTES-funktionalisierte Chitosanpartikel zu verwenden, wurde eine Probe der ND-PEG-NH₂-Suspension den UGM-Mitarbeitern für weitere Proteinfunktionalisierungs- und Wirkstoffbeladungsschritte sowie für zusätzliche Charakterisierungen zur Verfügung gestellt.

2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Bearbeitung des Projektes ist entsprechend des ursprünglichen Arbeits- und Zeitplanes durchgeführt worden. Die Finanzmittel in Positionen 0813 Material, 0837 Personalkosten und 0838 Reisekosten 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 ACU übergeben, um die Integration des Tissue-Engineering-Membrans abzuschließen und damit die Fertigstellung des Lunge-auf-Chip-Demonstrators für die geplante Testphase zu ermöglichen. Die beschriebene Funktionalisierung der Nanodiamanten war erforderlich, um ihre Eigenschaften als "Virus-Anheftungsblocker" und Wirkstoffträger zu erreichen. Die funktionalisierten Nanodiamanten wurden an Projektpartner UGM für geplante Experimente übergeben.

4 Voraussichtliche Nutzen und die Verwertbarkeit des Ergebnisses

Das zu entwickelnde pulmonale Blut-Luft-Grenzflächenmodell oder Lunge-on-Chip-Modell ist zum Screening von Therapeutika bestimmt und kann nach dem Projektende in Kooperation mit interessierten Unternehmen zu einem kommerziellen Testsystem zur Durchführung von pharmazeutischen Studien neuer Medikamente verwendet werden. Für die weitere Validierung und Optimierung der Technologie können weitere gemeinsame nationale und internationale Projekte durch das Micro-Lung-Konsortium vorbereitet werden. Der große Vorteil der MicroLung-Technologie ist ihre Zugänglichkeit und die damit verbundene Möglichkeit ohne zusätzlichen Aufwand diverse Arzneimittel zu überprüfen. Im Falle von Pandemien, wie die Corona-Pandemie, geht es häufig um schnelles „Repurposing“ von bereits zugelassenen Arzneimitteln. Bei diesen Arzneimitteln ist die grundsätzliche Verträglichkeit schon nachgewiesen worden. Die Untersuchungen beschränken sich daher auf den Nachweis der Wirksamkeit. Doch klinische Studien sind in der momentanen Situation schwierig durchzuführen sowie zeitaufwändig und kostenintensiv. Kleintiermodell für Covid-19 sind kaum vorhanden. Aufgrund der Komplexität der SARS-CoV-2-Infektion, des fehlenden Wissens zur genauen Pathogenese und der besonderen Bedeutung des humanen Immunsystems, bieten Lab-on-Chip-Systeme eine neue Möglichkeit, Medikamente aussagekräftig in nicht-klinischen Studien schnell zu testen. Das Fraunhofer IKTS betreibt anwendungsorientierte Forschung und entwickelt industrierelevante Herstellungsverfahren sowie prototypische Bauteile und Systeme in vollständigen Fertigungslinien bis in den Pilotmaßstab. Durch das gute Industriennetzwerk des Fraunhofer IKTS wird nach dem Projektende eine enge Kooperation mit Industriepartnern etabliert. Es bestehen sehr gute Kontakte zu den Firmen nal von minden GmbH, FRIZ Biochem GmbH, BioSciTec GmbH, microfluidic ChipShop und Eden Microfluidics, die an den Projektergebnissen interessiert sind. Die beteiligten Projektpartner werden ihre Kompetenzen auf den Arbeitsfeldern der Lab-on-Chip-Systeme sowie Nanomaterialbasierte medikamentenfreisetzende Systeme durch die Entwicklung innovativer Testmodelle und deren Validierung stärken. Sie werden ihr Wissen, ihre Ideen und die Forschungsergebnisse nutzen, um eine gemeinnützliche Technologie mit großen medizinischen Auswirkungen zu entwickeln. Für das Fraunhofer IKTS wird die Kooperation mit beiden Projektpartnern neue Perspektiven für die weitere Zusammenarbeit,

Industrieraufträge und Kunden-beziehungen eröffnen. Die Zusammenarbeit innerhalb des transnationalen Aufrufes JFS ist für alle beteiligten Partner vorteilhaft, da sie als Ausgangspunkt für die Realisierung größerer Projekte, insbesondere für die Teilnahme am HORIZON EUROPE dienen wird.

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 wurde eine gemeinsame Publikation veröffentlicht (s. Anlage). Außerdem sind zwei weitere gemeinsame Publikationen in Vorbereitung.

7 Literaturverzeichnis

1. Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet* 2022;23(8):467-491, doi:10.1038/s41576-022-00466-9
2. Bai H, Si L, Jiang A, et al. Mechanical control of innate immune responses against viral infection revealed in a human lung alveolus chip. *Nat Commun* 2022;13(1):1928, doi:10.1038/s41467-022-29562-4
3. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010;328(5986):1662-8, doi:10.1126/science.1188302
4. Nawroth JC, Lucchesi C, Cheng D, et al. A Microengineered Airway Lung Chip Models Key Features of Viral-induced Exacerbation of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020;63(5):591-600, doi:10.1165/rcmb.2020-0010MA
5. Si L, Bai H, Oh CY, et al. Self-assembling short immunostimulatory duplex RNAs with broad-spectrum antiviral activity. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022;29(923-940), doi:10.1016/j.omtn.2022.08.031
6. Stucki AO, Stucki JD, Hall SR, et al. A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab Chip* 2015;15(5):1302-10, doi:10.1039/c4lc01252f
7. Zamprognio P, Wuthrich S, Achenbach S, et al. Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Commun Biol* 2021;4(1):168, doi:10.1038/s42003-021-01695-0
8. Sellgren KL, Butala EJ, Gilmour BP, et al. A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab Chip* 2014;14(17):3349-58, doi:10.1039/c4lc00552j
9. Humayun M, Chow CW, Young EWK. Microfluidic lung airway-on-a-chip with arrayable suspended gels for studying epithelial and smooth muscle cell interactions. *Lab Chip* 2018;18(9):1298-1309, doi:10.1039/c7lc01357d
10. Park JY, Ryu H, Lee B, et al. Development of a functional airway-on-a-chip by 3D cell printing. *Biofabrication* 2018;11(1):015002, doi:10.1088/1758-5090/aae545
11. Toepke MW, Beebe DJ. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip* 2006;6(12):1484-6, doi:10.1039/b612140c
12. van Meer BJ, de Vries H, Firth KSA, et al. Small molecule absorption by PDMS in the context of drug response bioassays. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(2):323-328, doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.062

13. Huang D, Liu T, Liao J, et al. Reversed-engineered human alveolar lung-on-a-chip model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118(19), doi:10.1073/pnas.2016146118
14. 61. Choi SW, Zhang Y, Macewan MR, et al. Neovascularization in biodegradable inverse opal scaffolds with uniform and precisely controlled pore sizes. *Adv Healthc Mater* 2013;2(1):145-54, doi:10.1002/adhm.201200106
15. 62. Choi SW, Zhang Y, Xia Y. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: the importance of uniformity in pore size and structure. *Langmuir* 2010;26(24):19001-6, doi:10.1021/la104206h
16. 63. Zhang Y, Choi SW, Xia Y. Modifying the pores of an inverse opal scaffold with chitosan microstructures for truly three-dimensional cell culture. *Macromol Rapid Commun* 2012;33(4):296-301, doi:10.1002/marc.201100695
17. 64. Zhang YS, Regan KP, Xia Y. Controlling the pore sizes and related properties of inverse opal scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Rapid Commun* 2013;34(6):485-91, doi:10.1002/marc.201200740
18. 65. Zhang YS, Zhu C, Xia Y. Inverse Opal Scaffolds and Their Biomedical Applications. *Adv Mater* 2017;29(33), doi:10.1002/adma.201701115

Anlage I. Gemeinsame Publikation