

Entwicklung eines immune response assay (ira)

Ziel des Vorhabens

Ziel des Projekts war die Entwicklung eines innovativen Assays zur Untersuchung der Immunantwort auf Einzelzellebene. Immunzellen verändern sich nach Aktivierung durch Fremdkörper oder Pathogene und sekretieren Zytokine, die zentrale biologische Funktionen regulieren. Herkömmliche Methoden erlauben jedoch entweder nur eine Durchschnittsanalyse ganzer Zellpopulationen oder die Einzelzellbetrachtung ohne gleichzeitige Messung der Zytokinsekretion.

Der entwickelte "immune response assay" (ira) verbindet erstmals beide Aspekte: Er ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung der Zellmorphologie und der sekretorischen Aktivität einzelner Immunzellen. Diese Kombination erlaubt neue Erkenntnisse über die Heterogenität der Immunantwort und trägt zum besseren Verständnis der Mechanismen der Immunregulation bei.

Inhalt und methodische Umsetzung

Das Projekt kombinierte mikrofluidische Technologien mit einem Bead-basierten Detektionskit und KI-gestützter Bildanalyse. Der entwickelte mikrofluidische Chip zeichnet sich durch eine einfache Handhabung aus: Er kann mit einer Standardpipette befüllt werden und ist mit gängigen Mikroskopen kompatibel. Die einzelnen Messkavitäten können reversibel verschlossen werden und haben ein sehr geringes Volumen von nur 100 pl. Dies ermöglicht eine hochempfindliche Detektion von Zytokinen mit einer beliebig vergrößerbaren höheren Auflösung seltener Ereignisse im Vergleich zu etablierten Methoden.

Dank der kontinuierlichen Analyse können Sekretionsmuster einzelner Zellen über längere Zeiträume mit morphologischen Veränderungen korreliert werden. Dies erlaubt eine detaillierte Untersuchung des Immunprozesses, beispielsweise die Interaktion von Makrophagen mit Pathogenen oder die Rolle von T-Zellen in der Krebsbekämpfung.

Ein weiteres zentrales Element des Assays ist die KI-gestützte Software zur Bildanalyse. Diese erkennt automatisch Messkavitäten, Zellen und Beads und bestimmt die Fluoreszenzintensität der Beads als Maß für die Anzahl sekretierter Zytokine. Künftig könnte die KI auch dazu genutzt werden, Zellsubtypen zu identifizieren und weitere immunologische Fragestellungen zu beantworten.

Ergebnisse der Sondierungsphase

Im Rahmen der Projektphase wurden verschiedene Verwertungsoptionen geprüft. Basierend auf umfangreichen Marktrecherchen und direktem Feedback von potenziellen Nutzern wurde die Gründung eines Start-ups als beste Umsetzungsstrategie identifiziert. Eine zentrale Grundlage für diese Entscheidung war die hohe Nachfrage sowohl in der akademischen Forschung als auch in der biotechnologischen Industrie.

Es wurden 26 Interviews mit Fachleuten aus Wissenschaft und Industrie geführt, darunter Professor*innen, Postdocs, Doktorand*innen, technische Assistent*innen und Vertreter der Industrie. 24 der Befragten bestätigten einen konkreten Bedarf für den Assay, 16 davon äußerten spezifisches Interesse an einer direkten Nutzung. Bereits bestehende Methoden zur

Zytokinmessung auf Einzelzellebene wurden als unzureichend bewertet, da sie entweder keine Einzelzellauflösung ermöglichen oder keine gleichzeitige Korrelation mit Zellmorphologie erlauben.

Zur Validierung der Technologie wurden Kooperationen mit führenden akademischen Institutionen und Forschungseinrichtungen aufgebaut, darunter die LMU München, die TU München, das Helmholtz Zentrum München, die Ariel University (Israel) und das Memorial Sloan Kettering Cancer Center (USA). Erste Testmessungen wurden bereits durchgeführt oder befinden sich in Vorbereitung. Zusätzlich wurde das Projekt auf der Immunotherapy of Cancer Conference (ITOC) und dem Partnering-Event BIO-Europe vorgestellt, was wertvolle neue Kontakte in der Biotech-Industrie ermöglichte.

Parallel dazu wurde die Produktion des Chips optimiert. Eine Kleinserienproduktion mit einer Kapazität von bis zu 100 Chips pro Woche wurde etabliert. Zudem wurde das Prototypen-Design weiterentwickelt, um eine Skalierbarkeit für industrielle Fertigung sicherzustellen. Hierfür wurden Gespräche mit Stratec Consumables GmbH geführt, um eine mögliche Serienproduktion mittels Spritzgussverfahren zu ermöglichen. Die optimale Detektionsbeadgröße wurde festgelegt auf den Bereich von $8\mu\text{m} < x < 15\mu\text{m}$, hierfür wurden orientierende Voruntersuchungen mit Detektionskits von zwei unterschiedlichen Herstellern (PolyAn und BD) durchgeführt.

Konkreter Nutzen und Anwendungsmöglichkeiten

Obwohl keine Folgeförderung gewährt wurde, bietet der entwickelte Assay bereits jetzt einen erheblichen wissenschaftlichen Mehrwert. Er kann in der Grundlagenforschung zur Immunantwort genutzt werden, insbesondere zur Untersuchung von Zell-Interaktionen und Zytokin-Sekretionsmustern.

Mögliche Anwendungsfelder umfassen die Immunologie, die Krebsforschung sowie die Diagnostik von Immunerkrankungen. So könnte der Assay beispielsweise zur Analyse der Kommunikation zwischen Immunzellen und Krebszellen verwendet werden, um neue Therapieansätze zu entwickeln. Ebenso könnten neue Erkenntnisse über die Rolle unterschiedlicher Immunzell-Subtypen in entzündlichen Prozessen gewonnen werden.

Durch die Kombination aus hoher Sensitivität, einfacher Handhabung und kosteneffizienter Herstellung stellt der Assay eine vielversprechende neue Technologie für die Einzelzellanalytik dar und eröffnet innovative Möglichkeiten für zukünftige Forschungsprojekte.

F2_Ausführl. Schlussbericht

1) Einleitung

Da das Projekt aufgrund fehlender Anschlussförderung nicht weitergeführt werden kann, wird nicht auf den voraussichtlichen Nutzen oder die Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans eingegangen.

Es sind keine Veröffentlichungen der Ergebnisse gemäß Nr. 5 der NKBF/NABF erfolgt oder geplant.

Während der Durchführung des Vorhabens ist dem Zuwendungsempfänger kein Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden.

2) Ausführliche Darstellung der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten.

Es folgt eine ausführliche Darstellung der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung. Die Nummerierung der Arbeitspakete (AP) ist zur besseren Übersicht identisch zu der im Antrag.

AP 1: Evaluation der Verwertungsoptionen und Auswahl einer Option

AP 1.1: Bestimmung Anwendungsfälle und Schärfung Produktidee (Dauer: 10/23-03/24)

Ziel: Es werden alle nötigen Informationen gesammelt und Parameter definiert, um für die anschließende Machbarkeitsphase die vielversprechendste Verwertungsoption auszuwählen und **ira** auf die gewählte Strategie abzustimmen. Dafür werden Anwendungsfälle bestimmt, in denen **ira** einen großen Mehrwert bringt und eine Fokusgruppenanalyse durchgeführt. Ein Vergleich mit Konkurrenztechniken (technische Unterschiede, Umsatzpotential, Markt etc.) wird detailliert ausgearbeitet. Es wird eine ausführliche Marktanalyse erstellt, um die Marktgröße der verschiedenen Anwendungsfälle zu bestimmen und herauszufinden, welche Anpassungen am Produkt vorgenommen werden müssten. Um die Verwertungs idee und das Produkt iterativ zu verbessern, werden potentielle Anwender, Experten aus Kooperationen, akademischem Netzwerk sowie Clustern wie BioM und CENS gezielt befragt und potentielle Kunden direkt kontaktiert.

Durchgeführte Arbeiten: Kooperationspartner, potentielle Kooperationspartner, potentielle Kunden wurden befragt, Konkurrenzprodukte analysiert und die vielversprechendste Kommerzialisierungsstrategie bestimmt. Es wurde mit Key-Opinion-Leadern aus den Bereichen Grundlagenforschung und Medizin in Kontakt getreten, hierzu wurden u.a. Netzwerke wie CENS und Bio^M genutzt. Für die Evaluierung von konkreten Anwendungsfällen wurden verschiedene Anwendungen nach folgenden Gesichtspunkten analysiert Welche Arbeits- und Forschungs- bzw. Analyseschritte können **A**) ermöglicht **B**) präzisiert und/oder beschleunigt werden? **C**) Sind signifikante Kosteneinsparungen möglich? Weiter wurden neuartige, erfolgsversprechende Therapien gesucht (z.B. CAR-T-Zell-Therapie) und mit KOL diskutiert, ob **ira** bei deren Umsetzung und Etablierung einen Mehrwert bringen kann. Geprüft wurde weiter u.a. wer potentielle Kunden sind (Arztpraxen, Krankenhäuser, Labore etc.) und die daraus folgenden Implikationen auf eine potentielle Anpassung des Assays auf

Kundenbedürfnisse, z.B. in Bezug auf Kompatibilität Hardware (vorhandene Messgeräte, Autofokus etc.) und Software (Dateiformate und Qualität der Aufnahmen). In Diskussion mit Herstellern und Anwendern wurde ein Überblick darüber erstellt, in welcher Qualität (Fokus/Helligkeit) die Daten auf Anwenderseite aufgenommen werden, sowie über Parameter wie die Anzahl, Art und Kombination der zu messenden Moleküle, die gewünschte Anzahl der Zellen pro Experiment und dem internen Volumen der Messkammer welche eine direkte Implikation auf das - adaptierbare - Design der Messkammer und der Software haben. Verschiedene Kommerzialisierungswege für das Detektionskit wurden evaluiert (z.B. Lizenzierung). Weiter wurden Einzel-Vertriebsoptionen für die Software und den Chip und die Möglichkeit zur Erschließung weiterer Geschäftsfelder geprüft.

Ressourcen: 3 Personenmonate P. Böhm

AP 1.2: Markt- und Konkurrenzsituation (Dauer: 10/23-03/24)

Ziel: Zur besseren Evaluation der Verwertungsoptionen, des potentiellen Bedarfs, der Preisgestaltung, des Produkt-Markt-Fit und der Limitationen der Konkurrenzprodukte muss die Markt- und Konkurrenzsituation evaluiert werden.

Durchgeführte Arbeiten: Iterativ mit AP1.1 wurde die korrespondierende Markt- und Konkurrenzsituation recherchiert. Dies wurde von von Bio^M zugänglich gemachten Marktstudien unterstützt. Regulatorische Rahmenbedingungen (ISO/FDA-Normen) und potentielle Markteintrittsbarrieren wurden bestimmt sowie Entwicklungs- und Dokumentationskosten und -zeit abgeschätzt. Dies geschah im engen Austausch vor allem mit der Stratec Consumables GmbH. Kosten von Konkurrenzprodukten (Anschaffung Messgerät und Kosten für Experimente) wurden in Erfahrung gebracht und verglichen. Weitere Verwertungsmöglichkeiten wie z.B. ein Servicemodell wurden evaluiert.

Ressourcen: 2 Personenmonate P. Böhm.

Ergebnis AP 1: Basierend auf den Ergebnissen der Sondierungsphase wurde die Gründung eines Start-Ups als Verwertungsoption ausgewählt. Neben der großen Motivation in unserem Team (siehe Kapitel 2.3) waren hierfür die Identifizierung eines großen Marktpotentials (Kapitel 4.1) sowie von klaren Alleinstellungsmerkmalen gegenüber der Konkurrenz (Unterpunkt 4 in diesem Kapitel) ausschlaggebend. Die Entscheidung wurde gestärkt durch die Feststellung eines hohen Kundennutzens und großer Nachfrage potentieller Kunden in direkten Gesprächen. Es wurden während der Sondierungsphase 26

Befragte Personen, davon:	26
Professor*innen	10
Postdocs	6
Doktorand*innen / Student*innen	5
Technische Assistent*innen	1
Industrie	4
sehen Bedarf	24
eigener Bedarf	16
bereits Verwendung von Bulktechniken zur Sekretionsanalyse	15
Zugang Mikroskop	24
Regelmäßige Versuche	10
Befragte Personen, davon:	26

Interviews geführt, das Feedback der Professoren, Doktoranden, TAs und Gesprächspartner aus der Industrie war durchweg positiv, siehe hierzu Tabelle 1. Das bevorzugte Anwendungsfeld für die Identifizierungs- und Validierungsphase ist die Immunologie. U.a. für das grundlegende Verständnis der Funktion unseres Immunsystems und für die Entwicklung

von Therapien wurden Fragestellungen identifiziert, für deren Beantwortung die gemeinsame Analyse von Zellphänotyp bzw. Morphologie und Sekretion auf Einzelzellbasis essentiell ist (z.B. der Einfluss von Morphologie und Kommunikation in Zell-Triaden bei Tumor-Killing oder die Rolle von morphologisch unterscheidbaren Zellsubtypen in der Diagnose von Nasennebenhöhlenerkrankungen). Der Assay wurde in persönlichen Gesprächen an der Technischen Universität München (TU), der LMU, dem Helmholtz Zentrum München, der Ariel University (Israel) und auf der 11th Immunotherapy of Cancer Conference (ITOC) vorgestellt. Es befinden sich bereits weitere Kooperationen in Vorbereitung (NDAs verschickt, erste Testmessungen in Vorbereitung: Ariel University / Israel, Memorial Sloan Kettering Cancer Center / USA; NDA unterzeichnet, erste Testmessungen bereits durchgeführt: Helmholtz Zentrum München, siehe Unterstützungsschreiben). Bereits bestehende Kooperationen (Uniklinikum Würzburg und Genzentrum LMU München, siehe Unterstützungsschreiben) laufen, bringen erste wichtige Erkenntnisse, der Assay wird hier bereits eigenständig verwendet. Der Assay wurde auch auf dem Partnering-Event BIO-Europe vorgestellt, hier konnte ein Kontakt zur Telexos GmbH geknüpft werden.

AP 2: Analyse der IP- und FtO-Situation

AP 2.1: Freedom-to-Operate-Analyse (Dauer: 02/24-05/24)

Ziel: Mit der Patentanwaltskanzlei Hofstetter, Schurack und Partner wird im engen Austausch eine initiale Freedom-to-Operate-Analyse erstellt..

Durchgeführte Arbeiten: Gemeinsam mit der Patentanwältin Vera Kühr der Patentanwaltskanzlei Hofstetter, Schurack und Partner wurde eine initiale FtO-Analyse erarbeitet. Eine Anpassung des Vermarktungs- und des technischen Konzepts wurde geprüft, ebenso ob das Produkt frei von Rechten Dritter ist und ob Rechte lizenziert werden müssen.

Ressourcen: 1 Personenmonat P. Böhm; Die im Finanzplan des Antrags unter dem Punkt Aufträge an Dritte beantragten Mittel wurden hauptsächlich hier verwendet (ca. 6000 € für Auftrag an Dritte für initiale FtO-Analyse incl. Patentierbarkeitsanalyse (AP 2.2)).

AP 2.2: Schutzrechtsstrategie (Dauer: 04/24-09/24)

Ziel: Eine Schutzrechtsstrategie wurde erarbeitet, die Einreichung möglicher Patente geprüft und ggf. eine mögliche Patenteinreichung vorbereitet..

Durchgeführte Arbeiten: Es wurde eine Patentrecherche durchgeführt und mit der Patentanwältin Vera Kühr der Patentanwaltskanzlei Hofstetter, Schurack und Partner eine Patentierbarkeitsanalyse erstellt.

Ressourcen: 1 Personenmonat P. Böhm.

Ergebnis AP 2: Im Rahmen der Sondierungsphase wurde von einer Patentanwaltskanzlei eine Analyse der Freedom-to-Operate (FtO) sowie zur Patentierbarkeit für den **ira** Chip durchgeführt. Eine dem Antragsteller als Miterfinder bereits in allen Details bekannte Schutzrechtsanmeldung (WO 2023/088563 A1) wurde in der FtO-Analyse als relevant bezüglich dem Produktionsprozess im Labormaßstab eingestuft.

AP 3: Evaluierung der Produktionsmöglichkeiten incl. technischer Risikoeinschätzung

AP 3.1: Technische Risikoeinschätzung Materialenauswahl und Design (Dauer: 02/24 - 04/24)

Ziel: Eine Kombination verschiedener Materialeigenschaften (CO₂-Permeabilität, optische Reinheit, Transparenz, Weichheit) erlaubt es, im aktuellen Prototypendesign des mikrofluidischen Chips die Messungen durchzuführen. Die Kombination von Materialien wurde untersucht, welche eine skalierbare Herstellung erlaubt, dabei die aktuelle Kombination der Eigenschaften abbildet und günstig zu produzieren ist.

Durchgeführte Arbeiten: Verschiedene Produktionsmöglichkeiten und Materialkombinationen für die skalierbare Herstellung der Messkammer wurden mit der Stratec Consumables GmbH diskutiert und evaluiert und Daten für eine technische Risikoabschätzung gesammelt. Anschließend wurde ein Plan für die Umsetzung der Produktion erstellt. Das Design wurde auf potentielle Herstellungsrisiken geprüft.

Ressourcen: 1 Personenmonat P. Böhm.

AP 3.2: Technische Risikoeinschätzung Detektionskit (Dauer: 05/24 - 07/24)

Ziel: Minimierung technisches Risiko Detektionskit.

Durchgeführte Arbeiten: Potentielle technische Risiken der Anwendung des Detektionskits im **ira** CHIP (z.B. Sensitivität, unspezifisches Binden) wurden erarbeitet. In den Laboren des Lehrstuhls Rädler wurde in einfachen, standardisierten orientierenden Voruntersuchungen die optimale Größe der Detektionsbeads bestimmt.

Ressourcen: 1 Personenmonat P. Böhm; die im Finanzplan des Antrags unter dem Punkt Sachausgaben beantragten Mittel wurden hauptsächlich hier verwendet.

Ergebnis AP 3: Um die während der Machbarkeitsphase geplanten eigenen und ihm Rahmen der Kooperationen durchgeführten Experimente ermöglichen zu können, wurde das Prototypen-Design angepasst und eine Produktion incl. Qualitätskontrolle, Qualitätsmanagement und Inventarisierungssystem aufgebaut. Dadurch ist eine ausreichende Produktionskapazität sichergestellt, es können aktuell bis zu 100 Chips pro Woche hergestellt werden. Für eine Übersetzung des aktuellen Prototypendesigns in ein skalierbar herstellbares Design wurden verschiedene Design- und Materialparameter mit der Stratec Consumables GmbH diskutiert. Die Anpassung des Designs for Manufacturing ermöglicht eine Herstellung im Spritzgußverfahren. Die optimale Detektionsbeadgröße wurde festgelegt auf den Bereich von $8\mu\text{m} < x < 15\mu\text{m}$, hierfür wurden orientierende Voruntersuchungen mit Detektionskits von zwei unterschiedlichen Herstellern (PolyAn und BD) durchgeführt.

AP 4: Definition benötigter zusätzlicher Ressourcen

Team und externe Expertise (Dauer: 10/23 - 09/24)

Ziel: Passend zur gewählten Verwertungsstrategie soll die Fachkompetenz im Team ausgebaut werden, im Idealfall durch eine Person mit komplementärem Fachwissen und Interesse, sich kreativ und führend in den Gründungsprozess mit einzubringen. Es wird geprüft, wo die Zusammenarbeit mit externen Beratern oder Kooperationspartnern (ISO-Zertifizierung, Produktentwicklung, Business) sinnvoll ist.

Durchgeführte Arbeiten: Es wurde geklärt, ob und wann zusätzliches Fachwissen durch neue Teammitglieder und/oder die Einbindung externer Berater gebraucht wird. Welche Kooperationen sind notwendig, um die Ziele der Machbarkeitsphase umzusetzen (z.B. Studien mit Patientenzellen)? Hierfür wurden persönliche Kontakte im akademischen Netzwerk ausgebaut und Gespräche geführt.

Ressourcen: 1 Personenmonat P. Böhm.

AP 5: Entwicklungsplan Machbarkeitsphase

Projektantrag (Dauer: 01/24-05/24)

Ziel: Bis Mai 2024 wird eine Projektplanung für die Machbarkeitsphase mit Meilensteinen, Ressourcenplanung, Budgets für die jeweiligen Arbeitspakete und möglichen Ausweichstrategien erstellt. Noch zu erledigende Forschungs- und Entwicklungsarbeiten werden definiert. Es wird für die Anschlussphase an GO-Bio initial ein klarer primärer Verwertungsplan für **ira** vorhanden sein. Dieser Plan wird mit mindestens einem zweiten sekundären Verwertungsplan ergänzt.

Durchgeführte Arbeiten: Der Antrag für die Machbarkeitsphase wurde erstellt und eine Projektpräsentation ausgearbeitet.

Ressourcen: 2 Personenmonate P. Böhm; Reise Auswahlstzung GO-Bio (und Projektbesprechung mit Kooperationspartner), Berlin.

Ergebnis AP 4 und 5: Ein Antrag incl. Projektplanung für die Machbarkeitsphase mit Meilensteinen, Ressourcenplanung, Budgets für die jeweiligen Arbeitspakete und möglichen Ausweichstrategien wurde erstellt und eingereicht. Noch zu erledigende Forschungs- und Entwicklungsarbeiten wurden definiert. Die Fachkompetenz im Team wurde ausgebaut.