UNIVERSITÄTS
KLINIKUM
HEIDELBERG

ReinfChemo – Regelkreissystem zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien chemotherapeutischer Medikamente

Schlussbericht

Allgemeine Informationen

Förderkennzeichen:	031L0270
Förderzeitraum:	01.02.2021-30.04.2025
Projektleitung / Verantwortlicher Autor:	Dr. Dr. Stefan Kallenberger
Adresse:	Universitätsklinikum Heidelberg Health Data Science Unit BioQuant BQ054 Im Neuenheimer Feld 267 69120 Heidelberg

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Teil I: Kurzbericht

Chemotherapien zur Behandlung von Patienten mit Tumorerkrankungen werden üblicherweise mit konstanten Infusionsraten gemäß den in klinischen Studien entwickelten Schemata verabreicht. Die Dynamik der zellulären Prozesse im Tumor, welche durch die verabreichten Chemotherapeutika beeinflusst werden, bleibt dabei jedoch weitestgehend unberücksichtigt. Im Projekt *ReinfChemo* wurden mathematische Modelle zur quantitativen Beschreibung der durch Chemotherapeutika beeinflussten zellulären Prozesse mit Methoden aus dem Bereich des maschinellen Lernens kombiniert, um Konzentrationszeitverläufe chemotherapeutischer Medikamente zu optimieren und damit deren Effektivität zu maximieren. Die ursprüngliche Motivation des Projekts bestand darin, die Lücke zwischen dem Wissen aus systembiologischen Studien über die Dynamik zellulärer Prozesse und Anwendungen chemotherapeutischer Medikamente zu schließen.

Zur Anwendung des Konzepts wurde der „CytoScanner“, eine Kombination aus einem automatisierten Mikroskop, das in Inkubatoren verwendet werden kann, mit einem System aus Perfusoren, entwickelt. Mit diesem Untersuchungsaufbau wurden Krebszelllinien in einem Mikrofluidik-Chip variablen Konzentrationen verschiedener Chemotherapeutika ausgesetzt und die Effekte angewandter Konzentrationszeitverläufe charakterisiert. Pläne der entwickelten Hardware und die Steuerungs-Software des CytoScanners werden nach Abschluss des Projekts öffentlich verfügbar gemacht.

Das Konzept wurde zunächst anhand eines Systems zur Auslösung von programmiertem Zelltod mit Hilfe des Zelltodliganden CD95L bei einer Tumorzelllinie realisiert. Ein aus gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen bestehendes mathematisches Modell zur Beschreibung von programmiertem Zelltod wurde mit Reinforcement Learning (RL), einem Maschinenlernalgorithmus zur gezielten Optimierung von Handlungsabfolgen, kombiniert, um vorherzugsagen, wie eine bestimmte Menge an Zelltodligand am effektivsten eingesetzt werden kann, um in einer Tumorzellpopulation Zelltod auszulösen. Es gelang eine experimentelle Bestätigung des optimierten Verabreichungsprotokolls mit dem CytoScanner.

Als nächstes wurde das Konzept für die Anwendung des Chemotherapieschemas FOLFIRINOX am Beispiel der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 umgesetzt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Modellvarianten unterschiedlicher Komplexität entwickelt, um zytostatische und zytotoxische Effekte bei der kombinierten Anwendung von Chemotherapeutika zu beschreiben. Mit Hilfe von RL wurden für verschiedene Modelle zellzyklusabhängiger Effekte optimierte Konzentrationstrajektorien vorhergesagt, anhand derer, ausgehend von einer verfügbaren Dosis von Chemotherapeutika, eine Minimierung der Tumorzellpopulation erreicht werden konnte. Durch Model-Fitting an experimentelle Daten von Zellen, die mit Kombinationen der Chemotherapeutika 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan behandelt wurden, fand eine Schätzung der Modellparameter statt. Es wurde eine RL-Umgebung zur Verabreichung von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan, gekoppelt an das kalibrierte Modell, implementiert. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass die mittels RL anhand des kalibrierten Modells vorhergesagten Verabreichungstrajektorien von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan gegenüber einer nicht optimierten gleichzeitigen Verabreichung effektiver waren.

Im Weiteren wurde das Konzept zur RL-basierten Optimierung von Verabreichungstrajektorien für die Anwendung einer modifizierten Version des Chemotherapieschemas RIST bei der Glioblastomzelllinie U87-MG implementiert. Der Annahme folgend, dass die im Schema enthaltenen Kinaseinhibitoren eine Sensitivierung von Zellen für die zytotoxische Aktivität der enthaltenen Chemotherapeutika bewirken, wurden zunächst Experimente mit verschiedenen zeitlichen Abfolgen der Verabreichung von Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika getestet. Es wurde ein mathematisches Modell

entwickelt, durch das die Änderung der Zelltodkinetik von U87-MG Zellen, abhängig von der zeitlichen Verzögerung zwischen der Verabreichung von Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika, reproduziert werden konnte. Die Optimierungsaufgabe bestand nachfolgend darin, eine optimale zeitliche Abfolge der Verabreichung von Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika zu finden. Für die mittels RL vorhergesagten optimierten Verabreichungstrajektorien konnte schließlich eine effektivere Reduktion der Zellzahl als bei einer gleichzeitigen Verabreichung der Wirkstoffe, gezeigt werden.

Die Anwendungen des Verfahrens zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien chemotherapeutischer Medikamente konnten als Bestätigung des entwickelten Konzepts gewertet werden. Die Methodik zur Optimierung von Therapieprotokollen anhand von biomedizinischen Modellen ist universell anwendbar und bietet die Perspektive, in der Klinik angewandte Chemotherapieschemata zu verbessern. Das Verfahren kann genutzt werden, um Hypothesen für die Initiierung neuer klinischer Studien zur Verbesserung von Therapieprotokollen zu generieren.

Teil II: Eingehende Darstellung

In der klinischen Praxis werden zur Behandlung von Krebspatienten Chemotherapeutika gemäß empirisch ermittelter Therapieprotokolle für Einzelwirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen mit konstanter Geschwindigkeit infundiert. Im Rahmen des geförderten Projekts *ReinfChemo* wurden mathematische Modelle, durch welche in Tumorzellen dysregulierte zelluläre Prozesse beschrieben werden, mit Methoden der künstlichen Intelligenz kombiniert, um optimale Konzentrationstrajektorien für Chemotherapeutika zu finden, mit denen sich deren therapeutische Wirkung maximieren lässt. Zu diesem Zweck wurde der *CytoScanner*, ein automatisiertes Mikroskop, das in Inkubatorschränken betrieben werden kann und das programmierbare Experimente zur Mikroskopie und Perfusion von Zellen mit variablen Konzentrationen chemotherapeutischer Wirkstoffe ermöglicht, entwickelt. Nach Umsetzung vorbereitender Arbeiten (**AP1**) wurde das Konzept am Beispiel eines Modells CD95-abhängiger extrinsischer Apoptose realisiert (**AP2**). Im Weiteren wurden Optimierungen der Anwendungen des FOLFIRINOX-Chemotherapieschemas bei der Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC-1 (**AP3**) und des RIST-Chemotherapieschemas bei der Glioblastom-Zelllinie U87-MG (**AP4**) realisiert.

AP1: Vorbereitung des Systems und Kalibrationsexperimente

Zunächst erfolgte die Etablierung des experimentellen Aufbaus zur Durchführung von Perfusionsexperimenten, bei denen Zellen während der Lebendzell-Mikroskopie mit Chemotherapeutika variabler Konzentrationen behandelt wurden (**MS 1.1**). Zu diesem Zweck wurden mehrere Perfusoren nach einem selbstentwickelten Konzept aus 3D-gedruckten Bauteilen gefertigt. Zur Steuerung der Infusoren diente ein weiterer Single-Board-Computer (Raspberry Pi). Es wurde Software zur Kontrolle der Infusoren parallel zu Mikroskopie-Experimenten sowie ein MATLAB-Interface programmiert. Die Steuerung funktionierte dabei über asynchrone Request-Befehle, die über den zentralen Steuerungsprozess eines Experiments aufgerufen wurden. Es wurde ein Aufbau der Infusoren zusammen mit dem CytoScanner realisiert und experimentell eingesetzt (**Abb. 1**).

Abbildung 1. Aufbau des CytoScanners mit Infusoren in einem Zellinkubator. Mit dem gezeigten Aufbau erfolgten Applikationen variabler Konzentrationstrajektorien chemotherapeutischer Wirkstoffe. Die Infusoren befinden sich in einem geschlossenen Behälter unter dem CytoScanner-Mikroskop. Die Infusoren werden von einem Single-Board-Computer gesteuert, welcher über eine Internet-Verbindung (grünes Netzwerkkabel) kontrolliert wird. Zuleitungen (weiße Silikonschläuche auf der rechten Seite) werden vor einem Mikrofluidik-Chip auf dem CytoScanner zusammengeführt. Mit Hilfe dieses Setups können Zellen im Mikrofluidik-Chip innerhalb des Zellinkubators mikroskopiert und mit variablen Wirkstoffkonzentrationen perfundiert werden. Auf diesem Weg wurden durch RL optimierte Konzentrationstrajektorien experimentell getestet.

Mit dem Aufbau am CytoScanner wurde eine Serie von Experimenten zur Kalibration mit gefärbten und transparenten Flüssigkeiten durchgeführt, um die Kontrolle von Konzentrationstrajektorien über die Zeit bei verschiedenen Flussraten zu testen (**Abb. 2**). Es wurden Kalibrationsexperimente zur Evaluation der Fokus- und Positionsstabilität durchgeführt (**MS 1.2**).

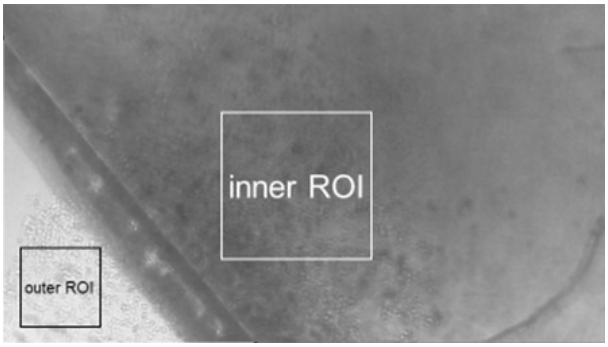

Abbildung 2. Mikroskopaufnahme des Mikrofluidik-Chips. Für Kalibrationsexperimente wurde farbige Tinte verwendet. Es wurden Farbintensitäten innerhalb von Regions of Interest (ROIs) quantifiziert.

Weiterhin wurden im Rahmen von AP1 verschiedene technische Verbesserungen des CytoScanners realisiert, u. a. eine Relais-Schaltung für Hochleistungs-LEDs zur Probenbeleuchtung sowie die Einbringung eines Ausrichtungsrahmen, in welchem Zellkulturgefäße auf einer hochtransparenten Glasplatte gelagert werden, um die Bildqualität zu verbessern.

AP2: Anwendung bei einem Modell CD95L-induzierter extrinsischer Apoptose

Als erste Anwendung zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien basierend auf Reinforcement Learning (RL) diente ein Modell der CD95L-induzierten extrinsischen Apoptose, welches aus gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen (ODEs) bestand.

Zunächst wurden Routinen zur Anwendung von RL, gekoppelt an das Apoptosemodell, programmiert. Dabei wurde der Actor-Critics-Algorithmus angewandt. Die von einem RL-Agenten zu lösende Aufgabe bestand darin, eine Konzentrationstrajektorie zu ermitteln, durch deren Anwendung mit einer eingesetzten Gesamtmenge von 500ng CD95L in der exponierten Zelllinie schnellstmöglich und bei einem maximalen Anteil der Zellen Apoptose ausgelöst werden kann. Hierfür wurden verschiedene Reward-Funktionen zur Trajektorienoptimierung getestet und die beste Version weiter eingesetzt (**MS 2.1**).

Im Modell wurde die Aktivierung von Caspase-8 und die Prozessierung von BID zu tBID in HeLa-Zellen, welche den CD95-Liganden überexprimierten (CD95-HeLa), simuliert. Apoptose wurde dabei als Schellwertprozess betrachtet. Das Überschreiten einer kritischen Konzentration von tBID wurde als auslösendes Kriterium für Apoptose angenommen. Eine heterogene Zellpopulation wurde durch Sampling lognormal-verteilter Anfangskonzentrationen der beteiligten Signaltransduktionsproteine und der tBID-Schwellwerte simuliert. Durch Fitting an experimentelle Daten erhaltene Schätzungen der Modellparameter wurden für Modellsimulationen verwendet.

Anhand des Modells zur Beschreibung CD95L-abhängiger extrinsischer Apoptose wurden erste Perfusionsexprimente mit dem CytoScanner realisiert. Mit dem RL-basierten Ansatz wurde eine CD95L-Konzentrationstrajektorie vorhergesagt, durch welche ein höherer Wert der kumulativen Reward-Funktion als durch die Anwendung einer konstanten Konzentration von CD95L erreicht werden konnte (**Abb. 3**). Durch den Actor-Critic-Agenten wurde eine Trajektorie vorgeschlagen, anhand derer zu Beginn des Experiments höhere Konzentrationen von CD95L appliziert wurden. Die Trajektorien wurden mit Hilfe des selbstentwickelten Infusorsystems realisiert. Zu diesem Zweck wurden $2 \cdot 10^4$ CD95-HeLa-Zellen in einem Mikrofluidik-Chip kultiviert, welcher an zwei Infusoren angeschlossen wurde. Der erste Infusor wurde mit 1,6ml CD95L-Lösung einer Konzentration von 250ng/ml beladen, der zweite Infusor mit 6,4ml Zellkulturmedium ohne Wirkstoff. Die Zellen wurden in zehn Zeitschritten mit einem Gesamtvolumen von jeweils 800µl als Mischung der CD95L-Lösung und leerem Zellkulturmedium perfundiert. Aus den aufgenommenen Mikroskopiebildern wurden die Zellzahlen lebendiger und apoptotischer Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert. Die mit Hilfe von RL vorhergesagte CD95L-Trajektorie führte dabei, wie beabsichtigt, zu einer beschleunigten Zelltodkinetik (**MS 2.2**, **Abb. 3**).

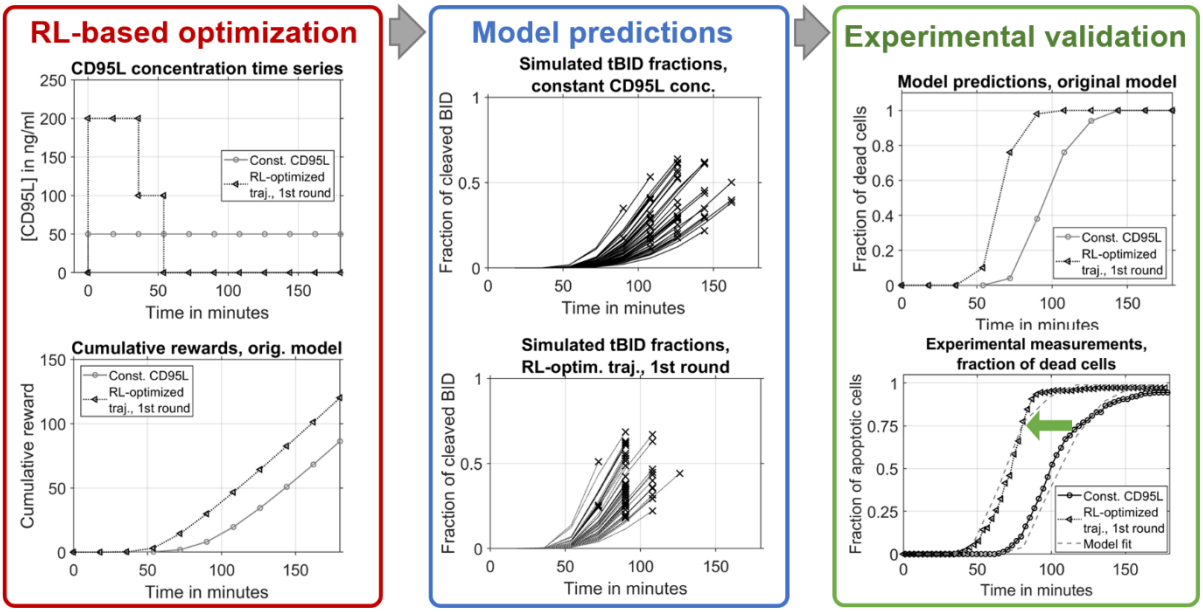

Abbildung 3. Optimierung der CD95L-Konzentrationstrajektorie. *Links:* Mittels RL wurde eine gegenüber einer konstanten CD95L-Konzentration (graue Linie, kreisförmige Symbole) optimierte Verabreichungstrajektorie derselben CD95L Dosis vorhergesagt, mit der das Ergebnis der kumulativen Reward-Funktion gesteigert werden konnte (schwarze Linie, dreieckige Symbole). *Mitte:* Modellsimulationen der tBID-Konzentrationen in einzelnen Zellen (n=50). Die Vorhersage von Zelltod für einzelne Zellen wird durch Symbole (×) angezeigt. Die mittels RL gewonnene Trajektorie führt zu beschleunigtem Zelltod (unteres Panel). *Rechts:* Die Modellvorhersagen einer beschleunigten Zelltodkinetik wurden durch am CytoScanner gemessene experimentelle Daten überprüft und erneut gefittet (graue gestrichelte Linie). Es zeigt sich, wie vorhergesagt, eine beschleunigte Zelltodkinetik (grüner Pfeil).

Die Zellzahlen wurden verwendet, um erneut ein Model-Fitting zum Schätzen der Parameter der tBID-Schwellwerte durchzuführen. Mit den Ergebnissen der Parameterschätzung wurde das RL-Environment aktualisiert. Danach wurde erneut mittels RL eine optimierte Konzentrationstrajektorie vorhergesagt, durch welche eine Zunahme der kumulativen Reward-Funktion erreicht werden konnte. Die vorhergesagte Trajektorie wurde erneut experimentell am CytoScanner angewandt. Mit der weiter optimierten Trajektorie wurde eine weitere Beschleunigung der Zelltodkinetik erreicht (**MS 2.3**, **Abb. 4**).

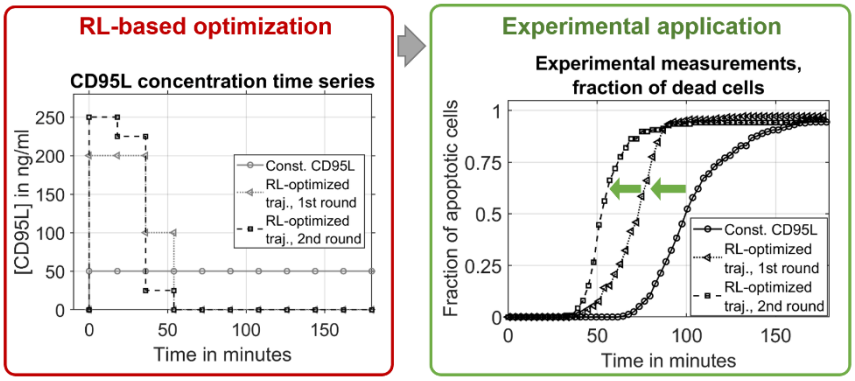

Abbildung 4. Zweiter Optimierungszyklus der CD95L-Konzentrationstrajektorie. *Links:* Mittels RL wurde eine weiter verbesserte CD95L-Verabreichungstrajektorie vorhergesagt. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung der experimentellen Daten aus dem ersten Optimierungsschritt das RL-Environment aktualisiert. *Rechts:* Bestätigung einer erneut beschleunigten Zelltodkinetik durch am CytoScanner gemessene Daten (grüne Pfeile).

Die Funktionalität des im Rahmen des geförderten Projekts entwickelten Verfahrens, welches aus einem inneren Regelkreis zur RL-basierten Trajektorienoptimierung und einen äußeren Regelkreis zur experimentellen Anwendung und Verbesserung des RL-Environments besteht, wurde damit konzeptionell bestätigt.

Im Weiteren wurde die Methodik zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien um weitere Verfahren erweitert, durch welche eine präzisere und effizientere Vorhersage von optimalen Trajektorien ermöglicht wird. Recurrent Neural Networks (RNNs) und neurale CDEs (Controlled Differential Equations) wurden genutzt, um das Lernen einer Folge von Zeitschritten oder kontinuierlichen Konzentrationszeitverläufen zu ermöglichen.

AP3 Anwendungen auf Protokolle zur Chemotherapie von Pankreaskarzinomen

Im Hinblick auf eine mechanistische Beschreibung der Wirkung von etablierten Chemotherapieschemata zur Behandlung von Pankreaskarzinomen, insbesondere zur Beschreibung des FOLFIRINOX-Schemas, wurden mathematische Modelle aus gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen entwickelt. Es wurden Modellvarianten unterschiedlicher Komplexität entwickelt, um zytostatische und zytotoxische Effekte bei der kombinierten Anwendung von Chemotherapeutika zu beschreiben (**Abb. 5**). Insbesondere wurden in den Modellen Synergismen und Antagonismen sowie Unterschiede in Bezug auf die Wirkung in verschiedenen Zellzyklusphasen berücksichtigt.

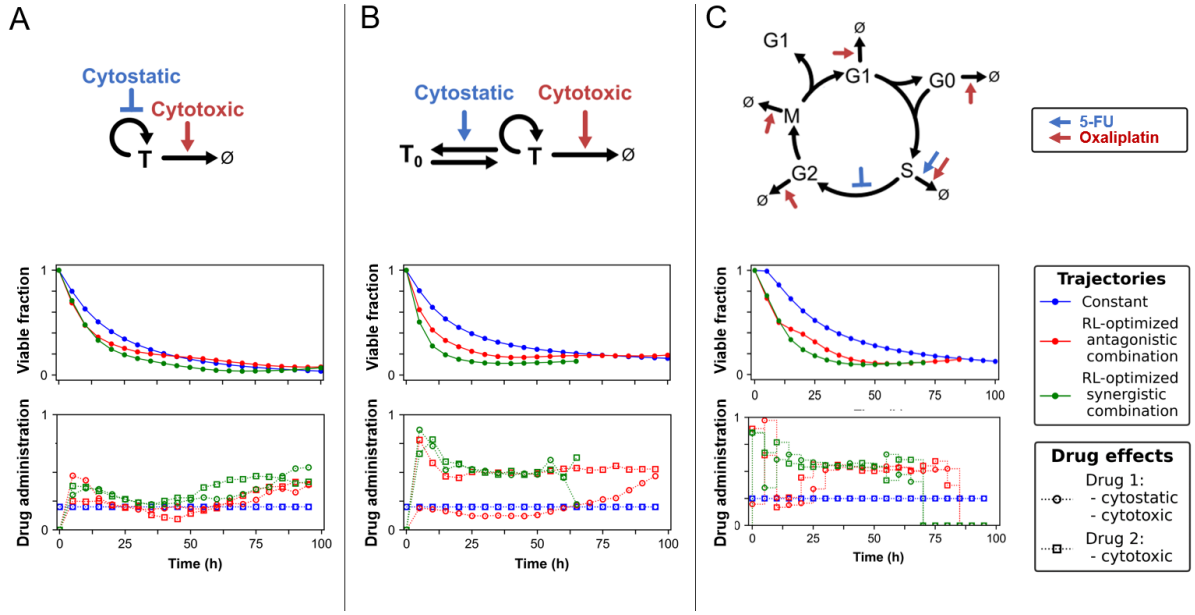

Abbildung 5. Entwicklung von Modellen zur Beschreibung der Effekte von Chemotherapeutika. (**A**) *Oben:* Skizze eines minimalen ODE-Modells zytostatischer und zytotoxischer Effekte von Chemotherapeutika auf proliferierende Tumorzellen T. Es wurden Effekte der Kombination eines zytostatischen und zytotoxischen (Kreissymbole in der mittleren Teilabbildung) sowie eines ausschließlich zytotoxischen Chemotherapeutikums (Quadratsymbole in der mittleren Teilabbildung) simuliert; *Mitte:* Simulation von Anteilen lebendiger Zellen unter konstanter (blau), RL-optimierter antagonistischer (rot) oder synergistischer Chemotherapeutika (grün); *unten:* Schritte der Verabreichung eines zytostatischen und zytotoxischen Chemotherapeutikums (Kreissymbole) in Kombination mit einem ausschließlich zytotoxischen Chemotherapeutikums (Quadratsymbole), wobei eine konstante Verabreichung (blau) mit RL-basiert optimierten Trajektorien (rot, unter Annahme antagonistischer Effekte; grün, unter Annahme synergistischer Effekte) verglichen wurde. (**B**) Abbildungen wie in (A) für ein erweitertes ODE-Modell, bei dem zusätzlich ein Zustand T_0 nicht proliferierender Tumorzellen berücksichtigt wurde. (**C**) Abbildungen wie in (A) für ein ODE-Modell, bei dem Effekte von 5-FU (blaue Symbole) und Oxaliplatin (rot Pfeile) in verschiedenen Zellzyklusphasen bis zur Zellteilung beschrieben wurden. Zusätzlich zu den zytotoxischen Effekten in verschiedenen

Zellzyklusphasen wurde die Inhibition der Progression von der S- in die G2-Phase durch 5-FU berücksichtigt.

Es waren Weiterentwicklungen der Software zur Realisierung von Experimenten mit der im Rahmen des Projekts entwickelten CytoScanner-Plattform erforderlich. Für die Mikroskopie in 96-Well-Platten wurden Routinen zur exakten Positionierung in der Mitte jedes Wells programmiert. Des Weiteren wurden Autofokus-Routinen entwickelt, um die Bildqualität zu steigern. Zur automatischen Erkennung der Well-Grenzen wurde eine Routine basierend auf einem Convolutional Neural Network (CNN) etabliert. Nachfolgend wurden mit dem CytoScanner Experimente im 96-Well-Format durchgeführt (**Abb. 6**).

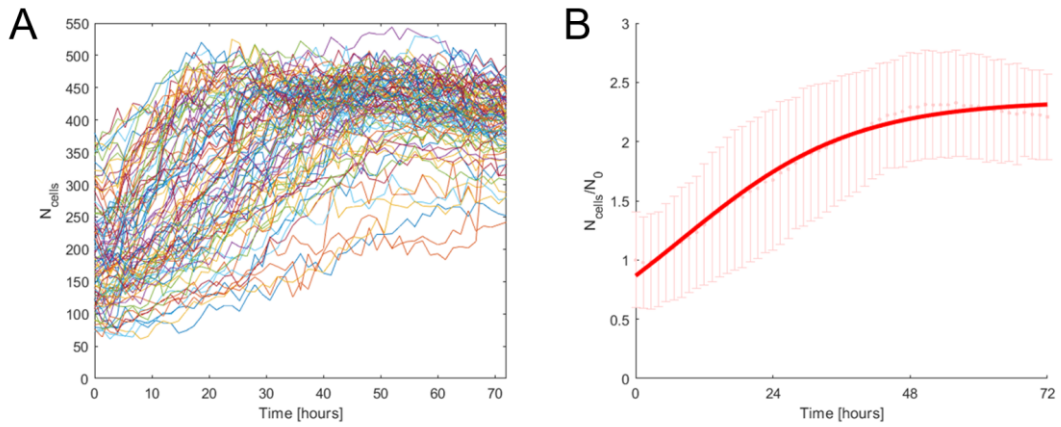

Abbildung 6. Beispieldaten aus einem Live-Cell-Imaging Experiment mit dem CytoScanner. (**A**) Über 3 Tage wurden im Zentrum jedes Wells einer 96-Well-Platte im stündlichen Intervall Mikroskopiebilder aufgenommen, Zellen segmentiert und klassifiziert. (**B**) Mittelwerte (hellrote Symbole), Standardabweichungen (Fehlerbalken) und Model-Fit (rote Linie).

Zur Umsetzung von Mikrofluidik-Experimenten für die Testung der mittels RL vorhergesagten optimierten Konzentrationstrajektorien musste das ursprünglich entwickelte Setup von Infusoren, bei denen Spritzen verwendet wurden, weiterentwickelt werden. Bei über mehrere Tage dauernden Experimenten konnte in dem bisherigen System aus Spritzen zur Wirkstoffperfusion der pH-Wert und die Sauerstoffversorgung im Mikrofluidik-System nicht ausreichend stabilisiert werden. Aus diesem Grund wurde ein neues Mikrofluidik-Setup mit Peristaltik-Pumpen aus Schrittmotoren und 3D-gedruckten Bauteilen entwickelt, das einen verbesserten Gasaustausch ermöglichte (**Abb. 7**).

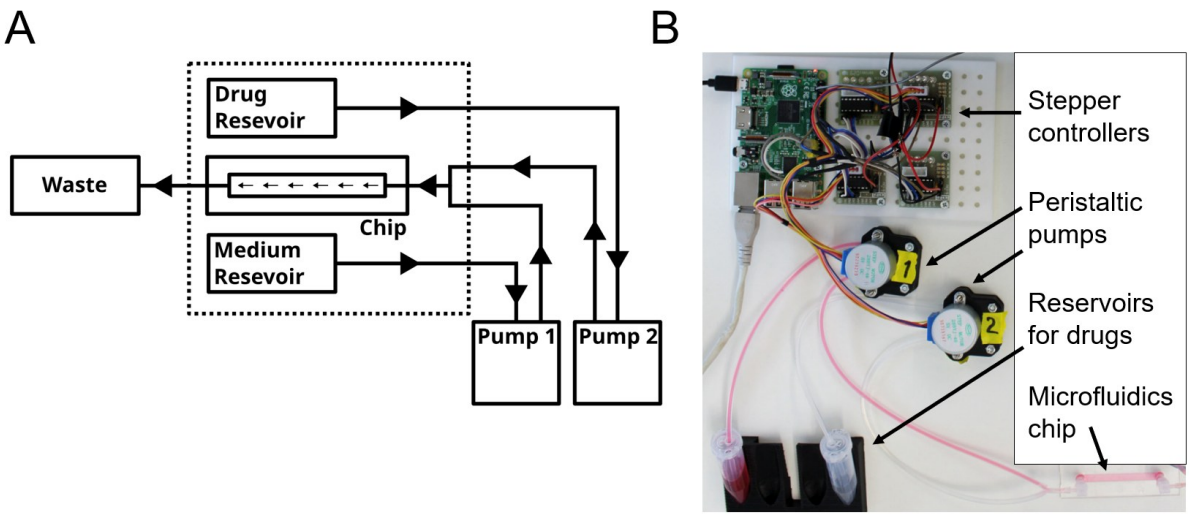

Abbildung 7. Verbessertes experimentelles Setup zur Perfusion von Zellen in einem Mikrofluidik-Chip. (**A**) Schemazeichnung des Aufbaus bestehend aus Reservoirs für einen Wirkstoff oder Zellkulturmedium ohne Wirkstoff. Durch gleichzeitig betätigte Peristaltikpumpen erfolgt eine Mischung im Mikrofluidik-Chip, sodass Zellen mit variablen Wirkstoffkonzentrationen perfundiert werden können. (**B**) Abbildung des Aufbaus zur Perfusion von Zellen mit veränderlichen Wirkstoffkonzentrationen.

Es fanden darüber hinaus Weiterentwicklungen der Bildauswertungs-Software, durch welche mit Hilfe von CNNs Zellen in apoptotisch, lebendig oder sich teilend (mitotisch) klassifiziert wurden, statt. Es wurden zusätzliche effizientere Machine-Learning-Umgebungen (JAX, Optax) eingesetzt, um die Performance der RL-basierten Trajektorienoptimierung zu verbessern.

Mit Hilfe von RL wurden für verschiedene Modelle zellzyklusabhängiger Effekte optimierte Konzentrationstrajektorien vorhergesagt, anhand derer, ausgehend von einer verfügbaren Dosis von Chemotherapeutika, eine Minimierung der Tumorzellpopulation erreicht werden kann. Es konnte dabei gezeigt werden, dass mittels Reinforcement Learning (RL) die Zeitverläufe chemotherapeutischer Medikamente optimiert werden können (**Abb. 8**). Beispielsweise ist für das in **Abb. 8A** gezeigte Modell eine sequenzielle Verabreichung von Wirkstoffen, die in verschiedenen Zellzyklusphasen effektiv sind (**Abb. 8B**), in einem bestimmten zeitlichen Abstand gegenüber einer parallelen Verabreichung bei konstanter Infusionsrate überlegen (**Abb. 8D–F**).

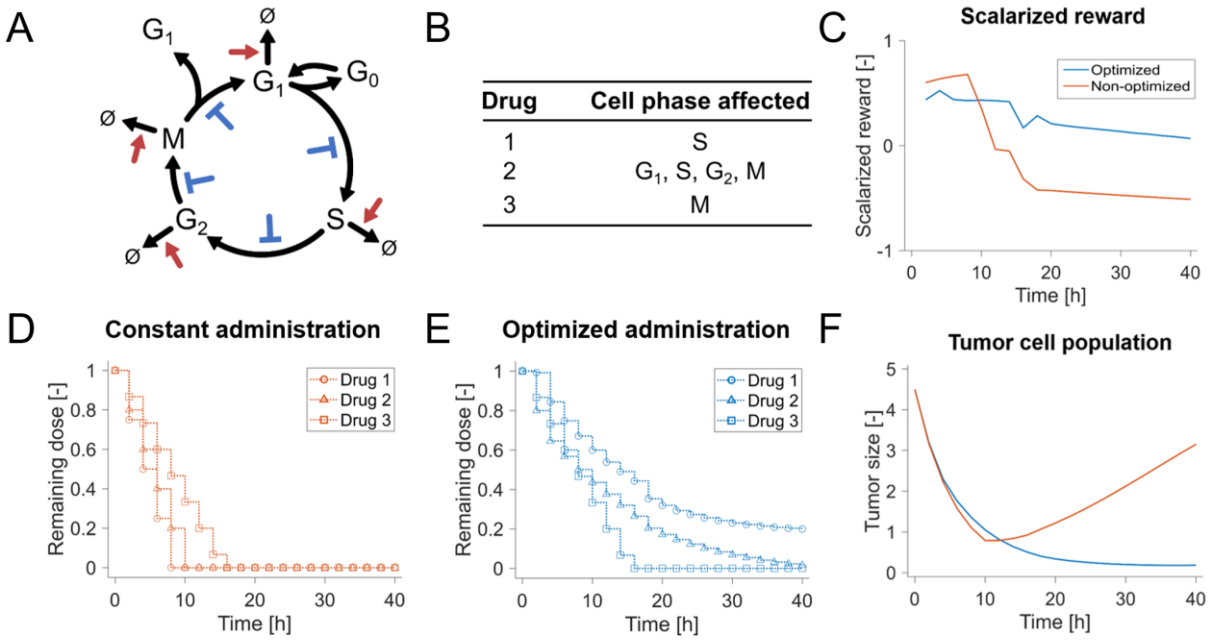

Abbildung 8. RL-basierte Optimierung der Konzentrationsverläufe chemotherapeutischer Wirkstoffe. (**A**) ODE-Modell zytostatischer (blaue Symbole) und zytotoxischer Effekte (rote Pfeile) von Chemotherapeutika in verschiedenen Zellzyklusphasen. (**B**) Es wurden Effekte von drei chemotherapeutischen Wirkstoffen berücksichtigt, welche vorrangig in der S-Phase (*Drug 1*, Irinotecan), in verschiedenen Zellzyklusphasen (*Drug 2*, Oxaliplatin) oder der M-Phase (*Drug 3*, 5-FU) wirksam sind, berücksichtigt. (**C**) Mittels RL (Soft-Actor-Critic Algorithmus) wurde eine Reward-Funktion maximiert. Im optimierten Verlauf (blau) werden höhere Werte der Reward-Funktion als bei konstanter Verabreichung (rot) erreicht. (**D, E**) Konzentrationsverläufe von *Drug 1* bis *3* bei konstanter Infusionsrate (D) oder optimierter Verabreichung (E). (**F**) Durch die optimierte Verabreichung (blaue Trajektorie) wird eine stärkere Abnahme der Tumorzellpopulation als bei konstanter Verabreichungsrate (rote Trajektorie) vorhergesagt. Dabei ist eine sequenzielle Verabreichung (*Drug 3* → *Drug 2* → *Drug 1*) gegenüber einer parallelen Verabreichung überlegen.

Um Modellparameter der Wachstumsinhibition und Zelltodinduktion für untersuchte Zelllinien zu schätzen, erfolgten Lebendzellexperimente (**MS 3.1**). Zunächst wurden Experimente am CytoScanner mit HeLa Zellen durchgeführt. Bei PANC-1 Zellen kam es aufgrund einer heterogenen Zellmorphe und ausgeprägter Migration von Zellen während des dreitägigen Bildgebungszeitraums zu Problemen bei der Segmentierung. Für Screening-Experimente wurde daher ein kommerzielles Mikroskop (Olympus IX81 ScanR) verwendet. Die Segmentierung erfolgte mit Convolutional Neural Networks (CNNs) aus Bildkacheln, welche durch Anwendung des Watershed-Algorithmus zur Segmentierung gewonnen wurden. Vergleichsweise wurde ein präkalibriertes CNN angewandt (Cellpose, Stringer et al., Nat Methods 2021). Es fielen phänomenologisch adhärente oder abgerundete Zellen auf. Der Phänotyp abgerundeter Zellen konnte keinem eindeutigen Verlauf (Mitose, Zelltod, erneutes Adhärieren) zugeordnet werden und war zumeist reversibel. Es kann hypothetisiert werden, dass dieser Zustand bei Zellen mit aktivierter integrierter Stress-Response auftritt.
Zur Untersuchung von Synergismen bzw. Antagonismen wurden variable Kombinationen von Chemotherapeutika über einen breiten Konzentrationsbereich getestet (**MS 3.2**). Durch ODE-Model-Fitting an verschiedene Modellvarianten fand zunächst, basierend auf Modelldiskrimination, die Entwicklung eines optimalen Modells zur Beschreibung der experimentellen Daten statt (**MS 3.3**). Dabei wurden Modelle mit minimalen Anzahlen von Parametern aufgrund einer verbesserten Identifizierbarkeit geschätzter Modellparameter bevorzugt. Beim Fitting der optimalen Modellvariante wurden Zellen mit adhärentem Phänotyp oder einem rundlichen Phänotyp verschiedenen zellulären Zuständen zugeordnet (**Abb. 9A**).

Zur Beschreibung der beobachteten Verzögerung in der Zelltodkinetik wurden lineare Ketten aus Intermediärzuständen im Modell berücksichtigt.
Durch Model-Fitting an experimentelle Daten wurden Parameter, welche Zellwachstum, Sensitivierung gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen und Zelltodkinetik beschreiben, aus experimentellen Daten geschätzt (**Abb. 9**). Experimente und Model-Fitting wurden für Kombinationen von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan durchgeführt. In **Abb. 9B** sind beispielhaft Model-Fits an Daten für Kombinationen von Oxaliplatin und Irinotecan gezeigt.

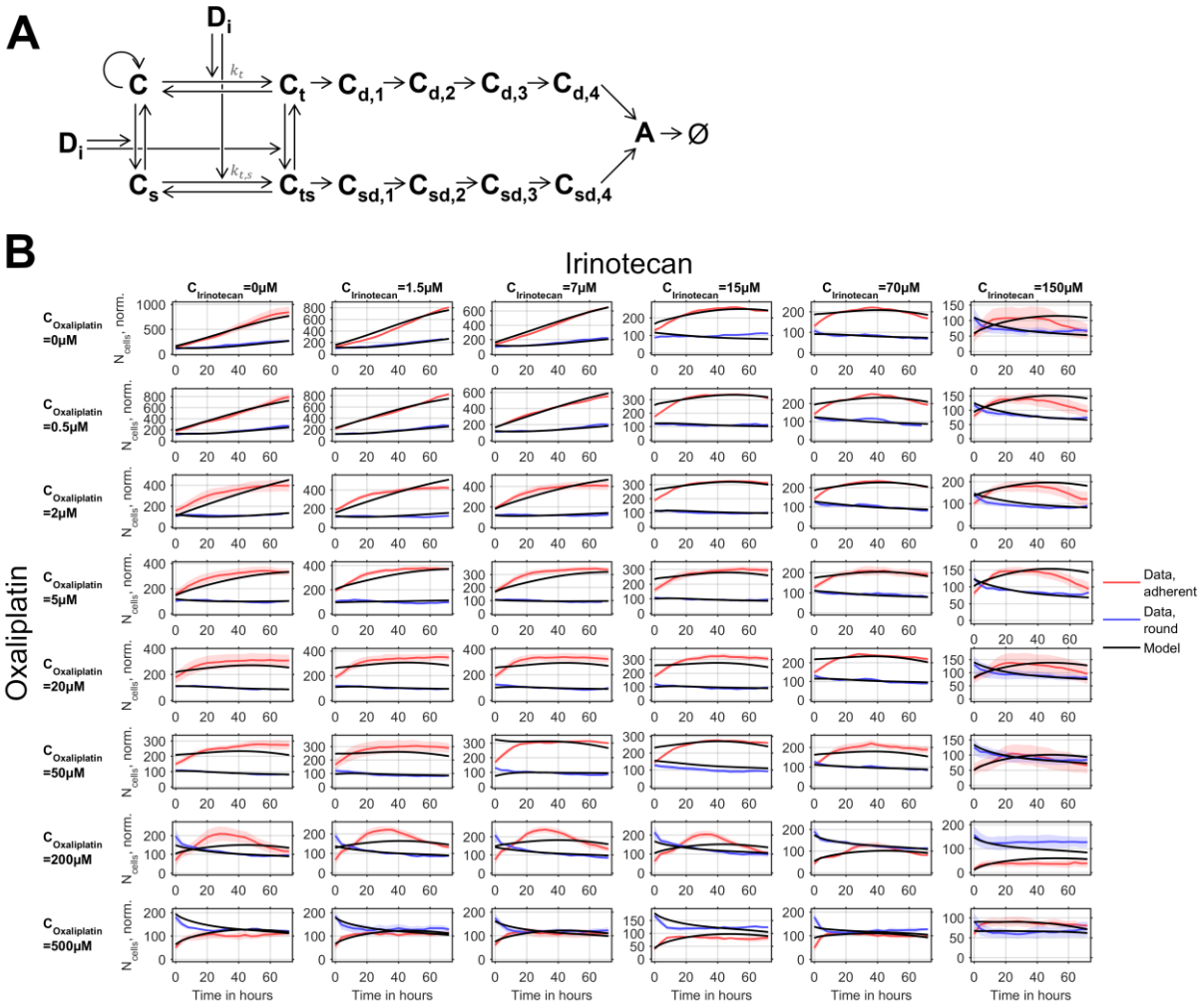

Abbildung 9. Modellierung des Effekts von Oxaliplatin und Irinotecan an PANC-1 Zellen. (**A**) ODE-Modell zur Beschreibung der Effekte verschiedener Wirkstoffe D_i, mit $i \in \{1,2\}$ bzw. $i \in \{1,2,3\}$ für Anwendungen von Wirkstoffkombinationen, durch welche zytostatische und zytotoxische Effekte verursacht werden. Neben sich teilenden Zellen C werden Zellen C_t beschrieben, welche einem zytotoxischen Effekt ausgesetzt sind, Zellen C_s, welche einem rein zytostatischen Effekt bzw. zellulären Stress ausgesetzt sind sowie Zellen C_{ts}, bei welchen beide Effekte vorliegen. Sowohl der zytotoxische als auch der zytostatische Effekt können durch D_i verursacht werden, wobei sowohl Effekte einzelner Wirkstoffe als auch Synergismen und Antagonismen berücksichtigt werden. Die zeitliche Verzögerung beim Zelltod wird durch eine lineare Kette aus Interimszuständen $C_{d,j}$ und $C_{sd,j}$ mit $j \in \{1,2,3,4\}$ in apoptotische Zellen A beschrieben. Außerdem wird die Entfernung von A aus dem beobachteten System durch Verlust der Adhärenz berücksichtigt. Beim Model-Fitting wurden Anzahlen von Zellen im abgerundeten Zustand den Zuständen C_s, C_{ts}, $C_{sd,j}$ und A zugeordnet (zellulärer Stress bzw. Apoptose), die Anzahl adhärenter Zellen der Summe aller übrigen Zustände. (**B**) Experimentelle Daten komplett adhärenter (rote Linien) oder rundlicher Zellen (blaue Linien) von PANC-1 Zellen, welche mit verschiedenen Konzentrationen von Oxaliplatin und Irinotecan behandelt wurden, zusammen mit Model-Fits. Farbige Flächen stellen geschätzte experimentelle Fehler dar.

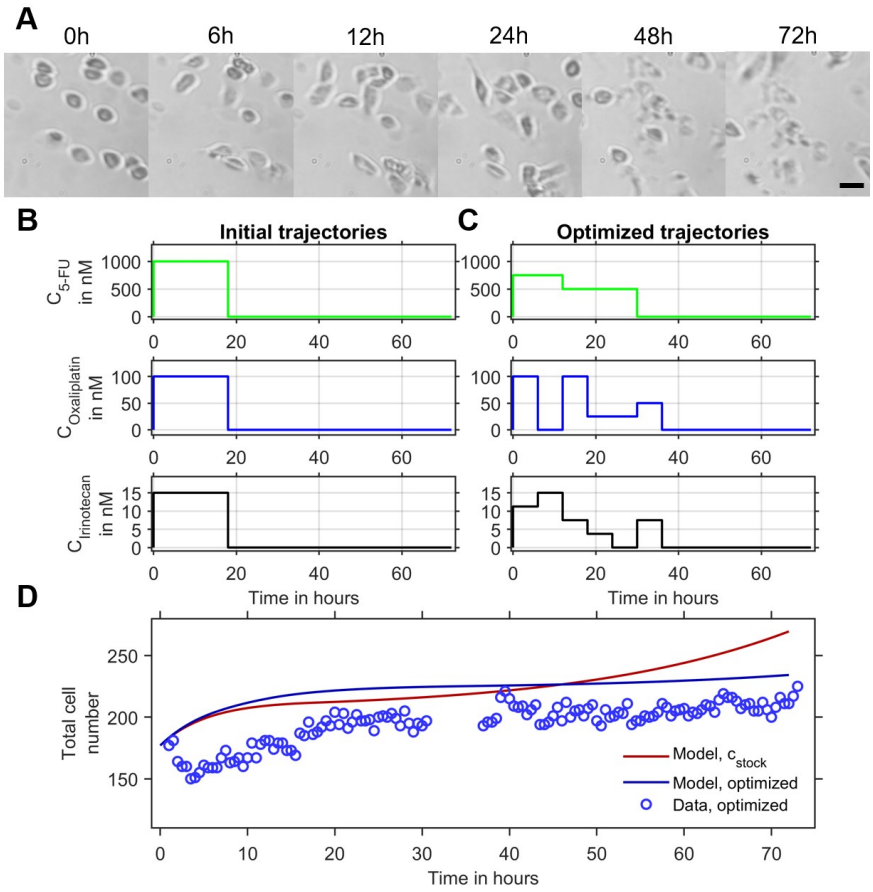

Abbildung 10. RL-basierte Optimierung der Verabreichung von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan. (**A**) Mikroskopiebilder von PANC-1 Zellen im CytoScanner (Skalierungsbalken, 50µm). (**B**) Trajektorien der parallelen Verabreichung von 5-FU (grüne Linie) Oxaliplatin (blaue Linie) und Irinotecan (schwarze Linie) bei Anwendung der Stocklösungen über 18 Stunden. (**C**) RL-basiert optimierte Trajektorien mit demselben Zeitintegral bzw. derselben Gesamtmengen wie in (B). (**D**) Modellvorhersagen für die gesamte Zellzahl bei statischer Anwendung von Stocklösungen (rote Linie) und für optimierte Verabreichungstrajektorien (blaue Linie) zusammen mit den am CytoScanner gemessenen Zellzahlen für den optimierten Verlauf. Aufgrund dessen, dass sich PANC-1 Zellen teilweise in einem abgerundeten Zustand befanden, welcher sich lichtmikroskopisch nicht von einem apoptotischen Zustand unterscheiden ließ, fand hier eine Betrachtung der Gesamtzahl von detektierten Zellen statt. Das freie Intervall zwischen 31 und 36 Stunden ist durch mangelnde Bildqualität aufgrund einer Luftblase im System bedingt, welche im Verlauf aus dem System beseitigt wurde.

Es wurde eine RL-Umgebung zur Verabreichung von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan, gekoppelt an das kalibrierte Modell, implementiert (**MS 3.4**). Es konnte schließlich gezeigt werden, dass die mittels RL anhand des kalibrierten Modells vorhergesagten Verabreichungstrajektorien von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan gegenüber einer nicht optimierten gleichzeitigen Verabreichung effektiver waren (**MS 3.5**, **Abb. 10**).

Es fanden darüber hinaus Weiterentwicklungen des CytoScanners statt. Einerseits wurde die Kontroll-Software verbessert (Auswahl von Positionen, Bedienbarkeit über Web-Interface, Betrieb über einen Computer-Cluster). Andererseits wurde die Hardware optimiert, um die Positionierung in x- und y-Richtung zu präzisieren. Zu diesem Zweck wurde der Betrieb mit Transportbändern, wie sie bei 3D-Druckern angewandt werden, durch Schraubspindeln ersetzt, welche eine genauere Positionierung erlauben. Für eine schnellere Positionierung wurden die vorherigen Schrittmotoren (28BYJ-48) durch stärkere Schrittmotoren (NEMA17)

ersetzt. Des Weiteren fanden Erweiterungen des Setups zur Perfusion mit variablen Konzentrationen verschiedener chemotherapeutischer Medikamente statt, u. a. eine Erweiterung auf vier Peristaltikpumpen für verschiedene Wirkstoffe (**Abb. 11**).

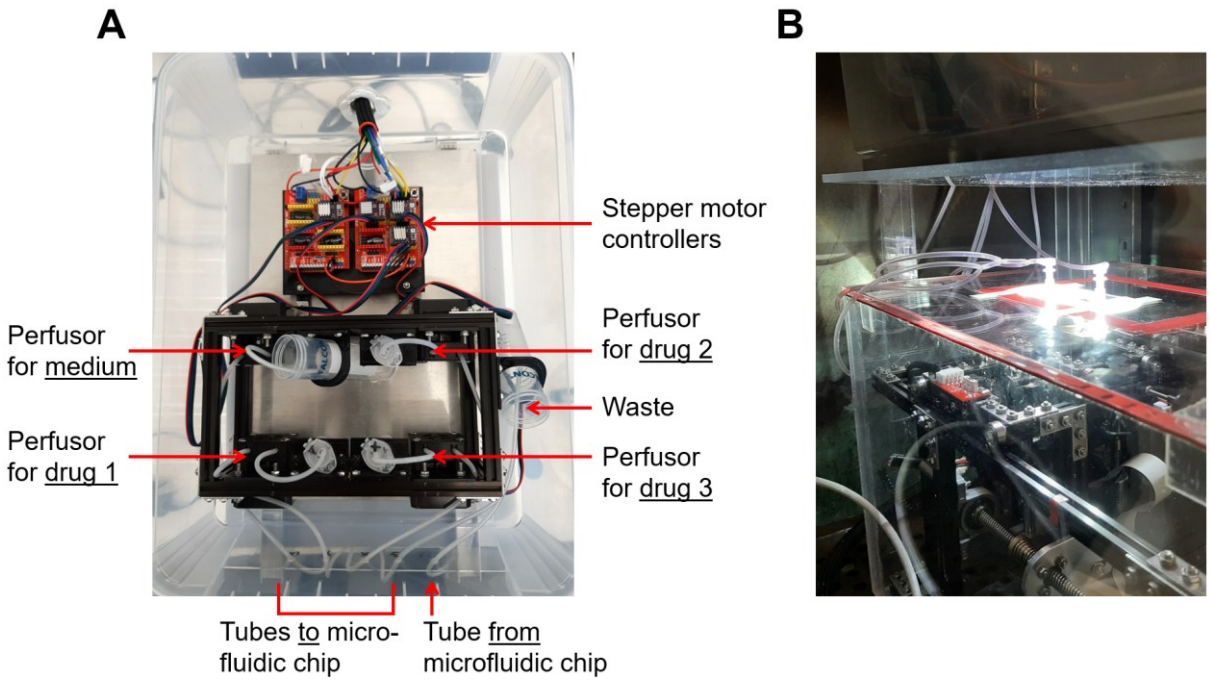

Abbildung 11. Setup zur Wirkstoffperfusion am CytoScanner. (**A**) Aufbau der vier Peristaltikpumpen aus 3D-gedruckten Bauteilen, betrieben durch NEMA 17 Schrittmotoren, für drei Wirkstoffe und Zellkulturmedium zur Perfusion mit variablen Wirkstoffkonzentrationen. (**B**) Mikrofluidik-Chip mit Anschlüssen der Zuleitungen aus Perfusoren. Der in (A) gezeigte Aufbau befindet sich auf der Spiegelplatte über dem Mikrofluidik-Chip.

AP4 Anwendung auf das RIST-Protokoll zur Therapie von Glioblastomen

Im Weiteren erfolgte eine Anwendung des Konzepts zur RL-basierten Optimierung der Verabreichungstrajektorien chemotherapeutischer Medikamente für eine Variante des RIST-Chemotherapieschemas, welches experimentell an der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG angewandt wurde.

Gemäß der Publikation von Nonnenmacher *et al.* zum RIST-Schema (Int J Cancer, 2015) wurde die Annahme getroffen, dass Kinaseinhibitoren zytostatische Effekte aufgrund einer Hemmung des MAPK- und des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs sowie eine Sensitivierung von Zellen für die zytotoxische Aktivität von Chemotherapeutika bewirken. Das RIST-Schema wurde aus diesem Grund zuvor in klinischen Studien metronomisch angewandt, d. h., in abwechselnden einwöchigen Blöcken, in denen entweder Kinaseinhibitoren oder Chemotherapeutika verabreicht wurden (Nonnenmacher et al., Int J Cancer 2015). Es existieren mehrere Varianten des RIST-Schemas (ursprünglich Dasatinib, Rapamycin, Irinotecan und Temozolomid) mit Abwandlungen der Kinaseinhibitoren. In Abweichung zum Basisschema wurde der mTOR-Inhibitor Rapamycin durch das effektivere und klinisch etabliertere Rapamycin-Derivat Everolimus ersetzt. Zunächst erfolgten Experimente zur Messung der zytostatischen und zytotoxischen Effekte der einzelnen Komponenten (Dasatinib, Everolimus, Irinotecan, Temozolomid, **MS 4.1**). Für die Auswahl des untersuchten Konzentrationsbereichs wurden die Konzentrationen der kombiniert eingesetzten Wirkstoffe gegenüber in den in der Literatur berichteten IC50-Konzentrationen, allerdings für eine

kontinuierliche Anwendung über drei Tage und eine andere Zelllinie, skaliert. Über einen Konzentrationsbereich zwischen dem 10^{-2}- und 10-fachen der IC50-Referenzwerte wurden lediglich schwache Effekte beobachtet. Wesentlich stärkere Effekte wurden für Wirkstoffkombinationen beobachtet. Aufgrund der Annahme, dass durch eine Behandlung mit den Kinaseinhibitoren Dasatinib und Everolimus (D/E) eine transiente Sensitivierung für die zytostatische Wirkung von Irinotecan und Temozolomid (I/T) erreicht werden kann, wurden Messungen der Zelltodkinetik für Wirkstoffkombinationen mit verschiedenen zeitlichen Verzögerungen der Anwendung von D/E und I/T durchgeführt (**MS 4.2**). Die Messungen erfolgten über einen weiten Konzentrationsbereich, um die Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu charakterisieren (**Abb. 12**).

Aufgrund starker Verzweigungen im zweidimensionalen Wachstum sowie teilweise schwer erkennbaren Grenzen zwischen U87-MG-Zellen und der damit einhergehenden Erschwernis der automatisierten Segmentierung von Zellen wurde für die in **Abb. 12** gezeigten Experimente mit statischen Wirkstoffkonzentrationen ein kommerzielles Mikroskop (Olympus IX81 ScanR) verwendet. Wie auch bei PANC-1 Zellen wurde bei U87-MG Zellen ein reversibler abgerundeter Zustand beobachtet (**Abb. 12B**), der mit zellulärem Stress assoziiert wurde. Eine Verzögerung von 4 Stunden der Verabreichung von I/T nach D/E führte zur stärksten Reduktion der Zellzahl (**Abb. 12C**).

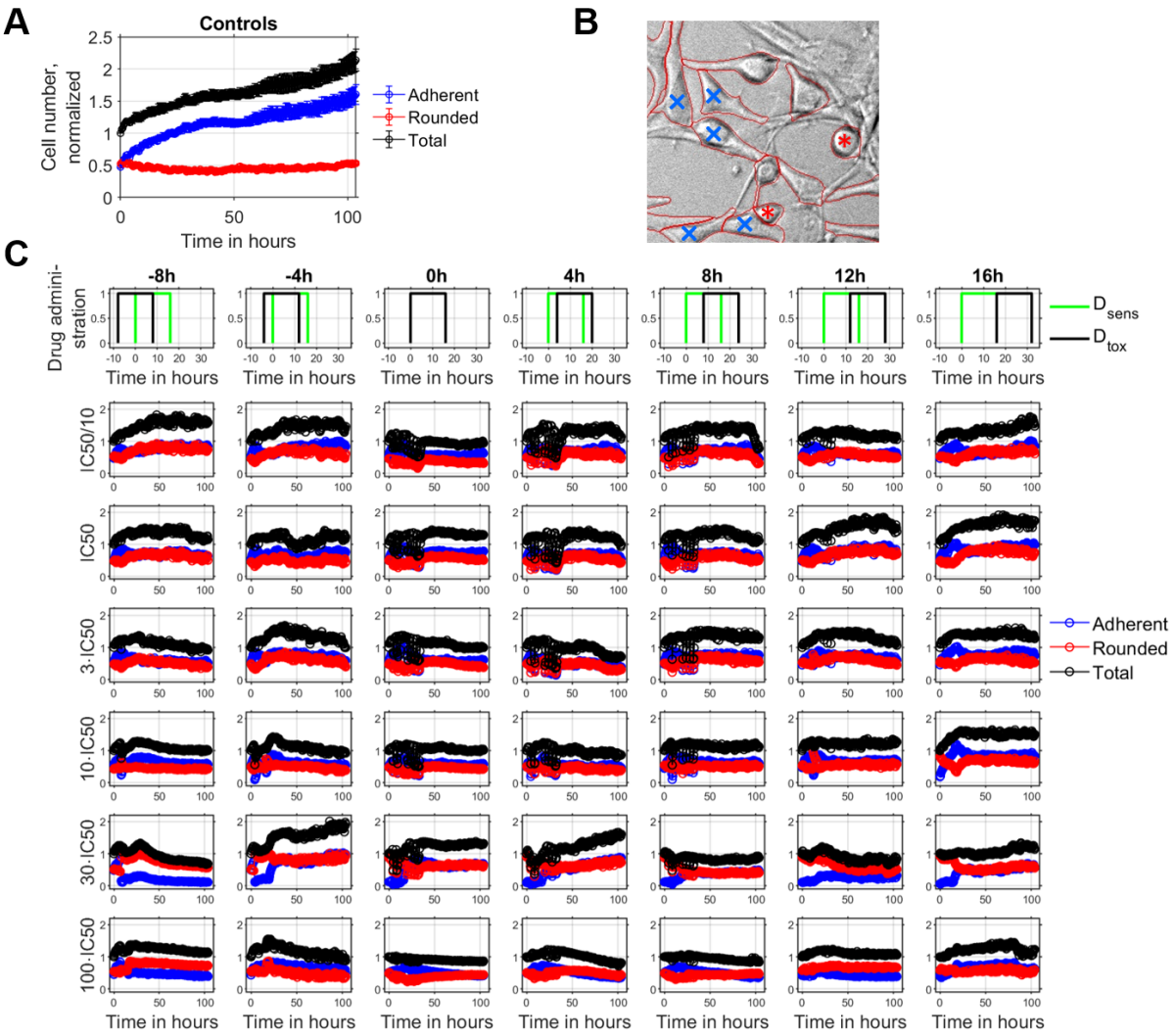

Abbildung 12. Zelltodkinetik von U87-MG Zellen. (**A**) Wachstum von unbehandelten Zellen. (**B**) Es konnten adhärente Zellen (rotes Symbol ∗) oder rundliche Zellen (blaues Symbol ×) unterschieden werden (rote Linien, Ergebnisse der Segmentierung). (**C**) *Oberste Zeile:* Es wurden zeitliche Abfolgen

der sensitivierenden Kinaseinhibitoren Dasatinib/Everolimus (zusammengefasst als D_{sens}, grüne Linien) und der zytotoxischen Chemotherapeutika Irinotecan/Temozolomid (zusammengefasst als D_{tox}, schwarze Linien) verabreicht. Gegenüber einer gleichzeitigen Verabreichung über 16 Stunden („0h“) wurde die Verabreichung der zytotoxischen Chemotherapeutika vor („-8h“ und „-4h“) oder nach der Verabreichung der Kinaseinhibitoren („4h“ bis „16h“) getestet.

Zur Beschreibung der zytostatischen und sensitivierenden Effekte von D/E und der zytotoxischen Effekte von I/T wurden verschiedene ODE-Modelle unterschiedlicher Komplexität implementiert (**MS 4.3**). Es wurde zunächst mit einem Modell begonnen, in welchem proliferierende Zellen C durch Sensitivierung mit D/E (D_{sens}) in einen Zustand C_s und durch zytotoxische Effekte von I/T (D_{tox}) in einen Zustand C_t übergehen, von dem aus Apoptose stattfindet. Durch Fitting an experimentelle Daten, Modifikationen des Modells und Modelldiskrimination wurde eine optimale Modellversion entwickelt (**Abb. 13**). In der optimalen Modellvariante wird zusätzlich zu C, C_s und C_t der Zustand C_{ts} von Zellen, die einem sensitivierenden und einem zytotoxischen Effekt ausgesetzt wurden, beschrieben. Für die Zustände C_s , C_t und C_{ts} wurden reduzierte Proliferationsraten angenommen. Des Weiteren wurde, aufgrund der Sensitivierung, ein beschleunigter Übergang des Zustands C_s in C_{ts} gegenüber dem Übergang von C nach C_t angenommen. Aufgrund der Verzögerung zwischen der Behandlung mit D_{sens} und D_{tox} und der beobachteten Zelltodkinetik wurde eine lineare Kette von Intermediärzuständen $C_{i,j}$ mit $j \in \{1,2,3,4\}$ vor dem Zelltod von Zellen im Modell berücksichtigt.

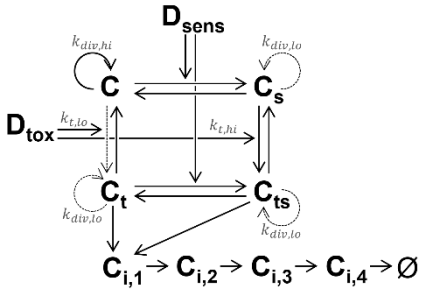

Abbildung 13. Modell zytostatischer, sensitivierender und zytotoxischer Effekte durch Irinotecan/Temozolomid (D_{sens}, Kombination Dasatinib/Everolimus; D_{sens}, Kombination Irinotecan/Temozolomid; C, native Zellen; C_s, sensitivierte Zellen; C_t, einem zytotoxischen Effekt ausgesetzte Zellen; C_{ts} sensitivierte und zytotoxisch behandelte Zellen; $C_{i,1}$ bis $C_{i,4}$, Zwischenstufen der Zelltodprogression als Verzögerungsreaktion; $k_{div,hi}$, $k_{div,lo}$, hohe bzw. niedrige Proliferation; $k_{t,hi}$, $k_{t,lo}$, hoher bzw. geringer Toxizitätseffekt.

In **Abb. 14** wir ein Teildatensatz des simultanen Model-Fittings an gesamte Zellzahlen von U87-MG Zellen gezeigt. Das Modell kann hier reproduzieren, dass eine Verzögerung von vier Stunden (**Abb. 14B–D**, Panels mit dt=4h) zwischen Everolimus/Dasatinib und Temozolomid/Irinotecan die stärkste Reduktion der Zellzahl verursachte.

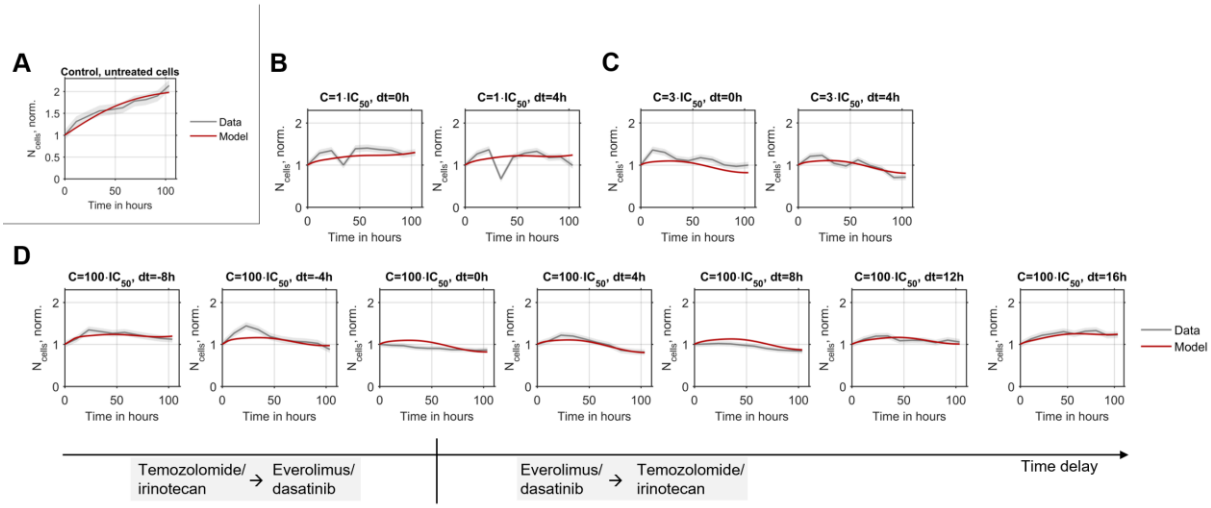

Abbildung 14. Model-Fitting an Messungen der Viabilität von U87-MG Zellen. (**A**) Model-Fit an Daten unbehandelter Zellen. (**B**) Model-Fit an Daten von Zellen, welche mit der IC50-Äquivalentkonzentration behandelt wurden mit 0 oder 4 Stunden Verzögerung zwischen E/D und I/T. (**C**) Daten wie in (B) für eine Behandlung mit dem dreifachen der IC50-Äquivalentkonzentration. (**D**) Daten für eine Behandlung mit 100-facher IC50-Äquivalentkonzentration. Der stärkste zytotoxische Effekt wurde bei einer Verzögerung um 4 Stunden beobachtet.

Die Optimierungsaufgabe bestand darin, eine optimale zeitliche Abfolge der Verabreichung von D/E, gefolgt von I/T zu finden. Für das anhand von experimentellen Daten kalibrierte Modell wurden verschiedene RL-Algorithmen (u. a. Proximal Policy Optimization, Soft Actor-Critics) angewandt, um optimale Konzentrationstrajektorien vorherzusagen, die experimentell angewendet werden können (**MS 4.4**). Am CytoScanner erfolgte die Testung der mittels RL vorhergesagten optimierten Verabreichungstrajektorien von D/E (D_{sens}) und I/T (D_{tox}, **Abb. 15**, **MS 4.5**). Es konnte schließlich gezeigt werden, dass die optimierten Verabreichungstrajektorien gegenüber der Anwendung konstanter Konzentrationen und einer gleichzeitigen Anwendung eine effektivere Reduktion der Zellzahl bewirkten (**Abb. 15D**). Das Konzept der RL-basierten Trajektorienoptimierung wurde somit am weiteren Beispiel des modifizierten RIST-Schemas bei U87-MG Zellen bestätigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass beim RIST-Schema im Gegensatz zur klinisch angewandten wöchentlich abwechselnden Verabreichung von Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika geringere zeitliche Abstände der Verabreichung zwischen Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika effektiver sind.

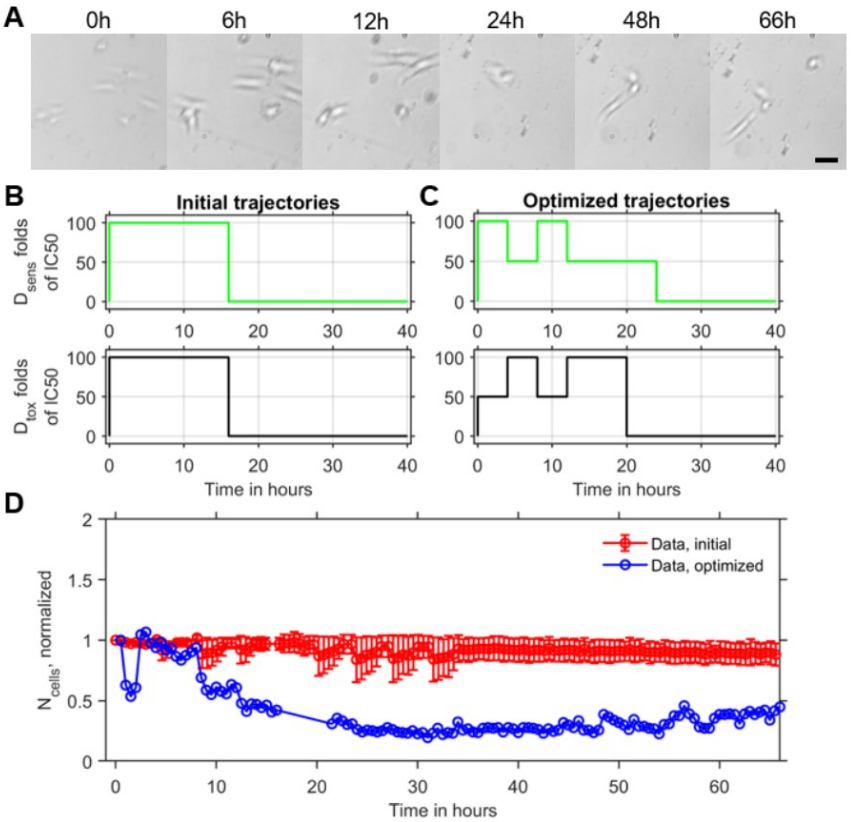

Abbildung 15. Optimierter Verabreichungstrajektorien bei U87-MG Zellen. Anhand des kalibrierten Modells zur Beschreibung der Abfolge einer Behandlung mit sensitivierenden Wirkstoffen (D_{sens}, Dasatinib/Everolimus) und zytotoxischen Wirkstoffen (D_{tox}, Temozolomid/Irinotecan) wurden RL-basiert verbesserte Verabreichungstrajektorien vorhergesagt und im Perfusions-Setup des CytoScanners angewandt. (**A**) CytoScanner-Aufnahmen von U87-MG Zellen (Skalierungsbalken, 50µm). (**B**) Statische Trajektorien der parallelen Verabreichung sensitivierender Wirkstoffe (grüne Linie) und zytotoxischer Wirkstoffe (schwarze Linie). (**C**) RL-basiert optimierte Trajektorien sensitivierender (grüne Linie) und zytotoxischer Wirkstoffe (schwarze Linie). (**D**) Normalisierte Messungen der Zellzahlen bei Anwendung nicht-optimierter (rote Linie) und optimierter Verabreichungstrajektorien (blaue Linie). Das Intervall des optimierten Verlaufs zwischen 17 und 22 Stunden ist durch mangelnde Bildqualität aufgrund einer Luftblase im System bedingt, welche im Verlauf aus dem System beseitigt wurde.

Zusammenfassend können die Anwendungen des Verfahrens zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien chemotherapeutischer Medikamente anhand eines Modells extrinsischer Apoptose (**AP2**), eines Modells für die Anwendung des FOLFIRINOX-Schemas im zellulären Modell von PANC-1 Zellen (**AP3**) und die Anwendung eines modifizierten RIST-Schemas im zellulären Modell von U87-MG Zellen (**AP4**) als Bestätigung des entwickelten Konzepts gewertet werden.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises umfassten (1) eine Postdoc-Stelle (2) eine Doktorandenstelle, (3) eine studentische Hilfskraft, des Weiteren (4) Verwaltungsausgaben und (5) Reisekosten.

(1) Die Postdoktorandin arbeitete im Rahmen des geförderten Projekts an der mathematischen Modellierung (Entwicklung von Modellvarianten für AP3 und AP4), der

Implementierung von Software-Routinen (Planung und Abläufe von Experimenten) und der Implementierung und Anpassung von RL-Routinen unter Verwendung verschiedener Algorithmen (u. a. Actor-Critic-, PPO-Algorithmus). Sie entwickelte Hardware- und Software-Komponenten des CytoScanners weiter und programmierte Code zur Steuerung der Komponenten. Des Weiteren entwarf die Postdoktorandin 3D-gedruckte Bauteile des CytoScanners und des Perfusor-Setups. Sie half mit bei Durchführung von Experimenten und der Koordinierung der Arbeiten und der Betreuung des Doktoranden und der studentischen Hilfskräfte.

(2) Der Doktorand arbeitete an der Implementierung und Verbesserung von RL-Routinen (Soft-Actor-Critic, Multi-Objective Reinforcement Learning) für AP2 bis AP4. Zunächst entwickelte er konzeptionelle ODE-Modelle zur Beschreibung zytostatischer und zytotoxischer Effekte von Chemotherapeutika bei Tumorzellen verknüpft mit RL-basierter Trajektorienoptimierung. Unabhängig vom zuvor im Projekt existierenden Programmier-Code erstellte er eine eigene RL-Implementierung in Python. Er entwickelte des Weiteren ein Web-Interface zur einfacheren Bedienung des CytoScanners, der Planung von Experimenten und der Verarbeitung von Mikroskopiedaten über ein Graphical-User-Interface (GUI). Er arbeitete an der Planung, Ausführung und Auswertung von Lebendzellmikroskopie-Experimenten. Dabei wurden verschiedene Algorithmen zur automatisierten Bilddatenauswertung mittels CNNs etabliert. Des Weiteren arbeitete er an der Verbesserung der CytoScanner-Hardware und -Software, mit der Schrittmotoren und Kameraaufnahmen gesteuert wurden.

(3) Während der Projektlaufzeit wurde zeitweise durch studentische Hilfskräfte die Durchführung und Auswertung von Experimenten mit dem CytoScanner sowie das Model-Fitting unterstützt. Es wurden Software-Routinen zur Erkennung der Grenzen von Wells in 96-Well-Platten und zur Fokussierung von Zellen implementiert. Des Weiteren wurden Methoden zur Optimierung von Konzentrationstrajektorien basierend auf neuronalen Netzwerken implementiert und verbessert (Recurrent Neural Networks, Controlled Differential Equations).

(4) Im Rahmen der Förderung des Projekts wurden Hardware-Bauteile des CytoScanners (mehrere Bausätze mit Extrusionsprofilen aus Aluminium, Kugellager passend zu den Aluminium-Extrusionsprofilen) erworben. Außerdem wurden chemotherapeutische Wirkstoffe (5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, Temozolomid, Everolimus, Dabrafenib), DMSO als Lösungsmittel sowie eine Probe der für AP4 benötigten Zellline U87-MG finanziert. Des Weiteren wurden benötigte Materialien für Zellkultur-Experimente finanziert (serologische Pipetten, Mikrofluidik-Chips, Y-Konnektoren für Schläuche und Adapter für Mikrofluidik-Chips, Laborhandschuhe, Zellkulturplatten, Eppendorf-Röhrchen, Ethanol zur Desinfektion, Zelkulturmedium, PBS, FCS, Trypsin, Penicillin-Streptomycin).

(5) Es fielen Reisekosten an, mit welchen die Teilnahmen an jährlichen Statusseminaren des Förderprogramms Computational Life Sciences finanziert wurden.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Bei konventionellen Chemotherapieprotokollen zur Einzel- oder Kombinationstherapie von PatientInnen mit Krebserkrankungen werden onkologische Medikamente üblicherweise mit konstanter Infusionsrate verabreicht. In vielen Fällen bleiben Chemotherapien ineffektiv oder gehen mit nicht tolerierbaren Nebenwirkungen einher. Im Fall metastasierter Tumorerkrankungen können Chemotherapien zumeist lediglich lebensverlängernd wirken.

Frühere grundlagenwissenschaftliche Arbeiten hatten nahegelegt, dass einzelne chemotherapeutische Wirkstoffe die Effektivität einer späteren Anwendung anderer Chemotherapeutika steigern können. Unter kontrolltheoretischen Gesichtspunkten ist es daher naheliegend, dass durch eine Verbesserung von Verabreichungstrajektorien die Effektivität chemotherapeutischer Wirkstoffe gesteigert werden kann.

Das geförderte Projekt zielte darauf ab, mit Hilfe einer Kombination mathematischer Modelle der zellulären Prozesse, mit denen Chemotherapeutika interferieren, Algorithmen zur Trajektorienoptimierung und Methoden aus dem Bereich der künstlichen Intelligenz die Konzentrationszeitverläufe chemotherapeutischer Medikamente zu optimieren, um deren Effektivität zu maximieren.

Die Notwendigkeit des geförderten Projekts bestand somit darin, Möglichkeiten zur Verbesserung der Effektivität von Chemotherapeutika durch Optimierung von Verabreichungstrajektorien anhand verschiedener Anwendungsbeispiele zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde eine Apparatur zur Mikroskopie und Perfusion mit variablen Konzentrationen verschiedener chemotherapeutischer Wirkstoffe (CytoScanner) entwickelt. Anhand der im Rahmen des Projekts realisierten Anwendungsbeispiele wurde das entwickelte Konzept bestätigt. Des Weiteren bestand eine Notwendigkeit des Projekts darin, bereits in anderen Bereichen genutzte Konzepte maschinellen Lernens für die Verbesserung chemotherapeutischer Protokolle nutzbar zu machen. Durch die Anknüpfung an molekularbiologisches und biochemisches Wissen kann, durch Übersetzung in mathematische Modelle, mit dem entwickelten Konzept ein Zusatznutzen existierender grundlagenwissenschaftlicher Erkenntnisse bei der Optimierung von Verabreichungstrajektorien chemotherapeutischer Wirkstoffe generiert werden.

Aufgrund der zur technischen Realisierung erforderlichen aufwendigen Schritte (Etablierung der Hard- und Software, Entwicklung theoretischer Konzepte, experimentelle Umsetzung) war der Rahmen des Projekts angemessen. Zur Lösung des Konzepts konnte nicht auf bereits verfügbare Hard- und Software zurückgegriffen werden. Zum Erreichen der Projektziele waren umfangreiche Arbeiten der Software-Entwicklung (Betrieb von Experimenten, Auswertung von Mikroskopiedaten, Implementierung von Optimierungsalgorithmen) und mathematischen Modellierung (Entwicklung geeigneter mathematischer Modelle, basierend auf der verfügbaren molekularbiologischen Literatur und der erhobenen experimentellen Daten, Model-Fitting, Modellanalyse) erforderlich. Die Realisierung der experimentellen Anwendungen erforderte die Entwicklung mehrerer „Generationen“ des Versuchsaufbaus mit Modifikationen des selbstentwickelten Inkubatormikroskops und des selbstentwickelten Systems zur Perfusion mit variablen Wirkstoffkonzentrationen. Die Realisierung von Anwendungen des entwickelten Konzepts in drei verschiedenen Systemen (CD95L-abhängige extrinsischen Apoptose, Optimierung des FOLFIRINOX-Schemas bei einer Pankreaskarzinomzelllinie, Optimierung eines modifizierten RIST-Schemas bei einer Glioblastomzelllinie) erforderte ein Vorgehen in mehreren Stufen: Eine Erhebung experimenteller Daten, Modellentwicklung, Model-Fitting zur Parameterschätzung, Implementierung einer RL-Umgebung und schließlich eine experimentelle Testung der optimierten Verabreichungstrajektorien. Aufgrund des hohen methodischen Aufwands bei der Entwicklung und Anwendung des Konzepts wird daher der zeitliche Rahmen des Projekts als angemessen betrachtet.

Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen des Konzepts wurden neuartige Methoden entwickelt, um in verschiedenen zellulären Systemen, unter Verwendung quantitativer mathematischer Modelle und Methoden des Maschinenlernens, die Effektivität von chemotherapeutischen und anderen pharmakologischen Wirkstoffen zu optimieren. Das Verfahren kann in Zukunft vielseitig angewandt werden, um therapeutische Protokolle zu verbessern. Die entwickelte Methodik kann somit zur Generierung von Hypothesen für zukünftige klinische Studien beitragen.

Im Anschluss des Projekts wird geplant, das entwickelte Konzept der RL-basierten Optimierung von Konzentrationstrajektorien chemotherapeutischer Medikamente, verknüpft mit einem mathematischen Modell therapeutischer Effekte, anhand von klinischen Daten anzuwenden. Chemotherapien verursachen als Nebenwirkungen eine Verringerung der Konzentrationen von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, welche unter Chemotherapie in regelmäßigen Abständen quantifiziert werden. Entsprechende hämatotoxische Effekte sind therapielimitierend. Im Anschluss an das Projekt erfolgt die Entwicklung eines ODE-Modells zur Beschreibung der zytostatischen und zytotoxischen Effekte gegenüber der Tumorerkrankung parallel zur Beschreibung hämatotoxischer Effekte. Das Modell kann mit klinischen Daten kalibriert werden (Konzentrationen von Blutzellen, Tumormarker, Tumorreferenzmessungen aus Bildgebungsdaten), um Parameter zur Beschreibung von Proliferation, Differenzierung und Zelltod zu schätzen. Zunächst wird eine retrospektive Anwendung an klinischen Daten geplant. Ähnlich zur Vorgehensweise bei der RL-basierten Optimierung anhand von Modellen zellulärer Prozesse kann hier eine Vorhersage verbesserter Dosierungen und Verabreichungsintervalle von Chemotherapeutika erfolgen. Dies geschieht mit dem Ziel, einen optimalen Kompromiss zwischen einer Maximierung des therapeutischen Effekts gegen die Tumorerkrankung und einer Vermeidung des Auftretens von Anämie, Leuko- oder Thrombopenie zu finden. Ein Ethikantrag zur Durchführung des Projekts wurde bereits durch das klinische Ethikkomitee des Universitätsklinikums Heidelberg genehmigt.

Des Weiteren wird geplant, die entwickelte Hard- und Software des CytoScanners zu publizieren und der wissenschaftlichen Community verfügbar zu machen. Da mit Hilfe der Dateien für 3D-gedruckte Bauteile eine einfache Reproduktion gegeben ist, kann ein Nutzen für zukünftige Forschung unter Einsatz von Lebendzellmikroskopie und Perfusion von Zellen mit variablen Wirkstoffkonzentrationen generiert werden.

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während vor Beginn des Projekts das RIST-Schema lediglich bei wenigen Patienten versuchsweise angewandt worden war, wurde während der Laufzeit des Projekts eine klinische Studie zum RIST-Schema hochrangig publiziert (Corbacioglu et al., Lancet Oncol 2024). Im Rahmen der Studie bei an einem Neuroblastom erkrankten Kindern wurde ein verbessertes Überleben für das RIST-Schema gezeigt. In der Studie wurde das beim RIST-Schema typische metronomische Konzept mit abwechselnden einwöchigen Verabreichungen von Kinaseinhibitoren und Chemotherapeutika angewandt. Interessanterweise wurde im geförderten Projekt, bei Anwendung im Modell von U87-MG-Zellen, beobachtet, dass ein deutlich geringerer zeitlicher Versatz zwischen einer Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren und Chemotherapeutika Zelltod maximierte.

Des Weiteren erschienen kurz vor bzw. während des Förderzeitraums Publikationen über ein präkalibriertes CNN, mit dem im geförderten Projekt eine Segmentierung von Zellen aus Mikroskopiebildern erleichtert wurde (Stringer et al., Nat Methods 2021; Pachitariu & Stringer, Nat Methods 2022).

Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

Im Rahmen des Projekts fanden Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen statt. Es befinden sich Publikationen über die entwickelte Methodik zur RL-basierten Optimierung von Konzentrationstrajektorien, die Baupläne für den CytoScanner (Mikroskop, Perfusoren) inklusive der entwickelten Betriebs-Software und die realisierten Anwendungsbeispiele anhand von Modellen extrinsischer Apoptose, des FOLFIRINOX-Schemas bei PANC-1-Zellen und des RIST-Schemas bei U87-MG-Zellen in Arbeit.