

## **Sachbericht zum Verwendungsnachweis**

### **Teil II: Ausführliche Darstellung**

<b>Verbundprojekt:</b>	RUBIN – SniPoCC – VP2: Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Schnelltest-Komplettsystems zur quantitativen und digitalisierten Analyse von POC-Tests (qDigiPOC)
<b>Teilprojekt:</b>	Spezielle Membranen für Fluoreszenz, Struktur, Farbe
<b>Förderprogramm:</b>	RUBIN – Regionale unternehmerisches Bündnisse für Innovation
<b>Förderkennzeichen:</b>	03RU1U092E
<b>Durchgeführt von:</b>	Sartorius Stedim Biotech GmbH August-Spindler-Straße 11 37079 Göttingen
<b>Projektlaufzeit:</b>	01.09.2022 – 31.08.2025
<b>Projektleiterin:</b>	Dr. Andrea Ernst Dr. Judith Witte

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt (BMFTR) unter dem Förderkennzeichen 03RU1U092E gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung trägt die Autorin.

Autorin(nen):

Dr. Judith Witte, Sartorius Stedim Biotech GmbH

## Inhalt

Ausführliche Darstellung der Ergebnisse.....	4
Arbeitspaket 2.5.1 – Recherche und Vorversuche; Definition der Zielparameter .....	4
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.1) .....	6
Arbeitspaket 2.5.2 – Entwicklung strukturierter Membranen für den Einsatz in Fluoreszenz- basierten Lateral-Flow Schnelltests .....	7
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.2) .....	10
Arbeitspaket 2.5.3 – Validierung der ausgewählten Membran .....	10
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.3) .....	17
Arbeitspaket 2.5.4 – Dokumentensicherung .....	17
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.4) .....	17
Arbeitspaket 2.5.5 Durchführung Summer School bzw. Winter School .....	18
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.5) .....	19
Die wichtigsten Positionen zum zahlenmäßigen Nachweis .....	20
Vorraussichtlicher Nutzen/ Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	20
Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen .....	20
Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF .....	20

## Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete, sowie die Notwendigkeit und Angemessenheit der durchgeführten Projektarbeiten pro Arbeitspaket dargestellt.

### Arbeitspaket 2.5.1 – Recherche und Vorversuche; Definition der Zielparameter

Ziel des Arbeitspaketes war die Definition der Anforderungen an die Membran durch Recherche, Vorversuche und Abstimmung mit den Bündnispartnern. Das Gesamtkonzept für die Membran wurde erfolgreich festgelegt.

#### AP 2.5.1.1 A – Definition von grundlegenden Anforderungen und Zielparametern

Nachfolgend sind die festgelegten Anforderungen und Zielparameter kurz zusammengefasst. Hierbei wurde zwischen „Ausschlusskriterien“, welche unverzichtbar sind, Kriterien für eine verbesserte Nutzbarkeit/ Markteintritt und solche, die die Zuverlässigkeit des Produktes garantieren unterschieden.

Tabelle 1: Anforderungen an die Membran.

Ausschlusskriterium („Must-haves“)	Verbesserte Nutzbarkeit/ einfacher Markteintritt	Zuverlässigkeit des Produkts
Probentransport zur Test- und Kontrollposition ist gewährleistet	Mit vorhandenem Equipment kompatibel (geringer Investitionsbedarf)	Einhaltung der Spezifikationsgrenzen
Ausreichender lateraler Fluss durch die Membran, um Auslesen nach gewünschter Zeit zu gewährleisten	Kompatibilität mit automatisierten Produktionsprozessen	Konsistenz der kritischen Qualitätsattribute innerhalb und zwischen Chargen
Ausreichende Reaktionszeit an Test- und Kontrollposition, um Anforderungen an die Testsensitivität zu erfüllen		Niedrige Ausschussrate beim Testhersteller durch Mängel in der Membran
Geringe und gleichmäßige Eigenfluoreszenz der Membran, bzw. gutes Signal-Rausch-Verhältnis		
Keine Interferenz beim Multiplexing		

Im Fall von Membranen zum Einsatz in fluoreszenzbasierten LFTs lassen sich folgende Zielparameter definieren:

- Steigzeit einer Testflüssigkeit (meist RO-Wasser)
- Dicke (meist Kompositdicke, d.h. Folienverstärkung + Membran)
- Proteinbindung
- Signal-Rausch-Verhältnis

Es ist zu erwähnen, dass die benötigten Wertebereiche dieser Zielparameter je nach Aufbau und Anwendung des jeweiligen LFTs variieren können. Hierbei spielen zum Beispiel die Probenmatrix, der verwendete Laufpuffer, die verwendeten Capture-Antikörper (Art,

Konzentration, Art der Aufbringung) und das Konjugat (Art, Konzentration) eine Rolle. Auch die Art der Detektion (Sandwich vs. Kompetitiver Assay) ist dringend zu berücksichtigen. Aus diesem Grund ist eine Abstimmung der Testkomponenten aufeinander durch die Testhersteller unerlässlich. Unter Verwendung komplexer Probenmatrizes wie Milch und Blut in Zusammenspiel mit hohen Ansprüchen an die Testperformance ergaben sich daher im Verlauf des Projekts mehrere Iterationen der entwickelten Strukturen zur Testung durch die Schnelltesthersteller.

#### **AP 2.5.1.1 B – Voruntersuchungen zu den technischen Anforderungen an die Membran**

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden zunächst Steigzeituntersuchungen anhand der zu diesem Zeitpunkt gängigen Fächerstruktur basierend auf der großporigsten Diagnostikmembran Unisart® CN 95 mit Milch durchgeführt. Es wurden strukturierte Membranen mit 4, 5, 6 und 10 Kanälen getestet. Bei allen hier getesteten Strukturen wurde der laterale Fluss bei Verwendung von Milch als Probenmatrix inhibiert. Abbildung 1 zeigt beispielhaft, die Inhibition des lateralen Flusses bei einer 10-Kanal Fächerstruktur. Der laterale Fluss kommt nach 30 Sekunden zum Erliegen. Zum Vergleich ist ebenfalls der laterale Fluss von mit Phenolrot eingefärbtem RO-Wasser gezeigt zu zwei Zeitpunkten gezeigt.

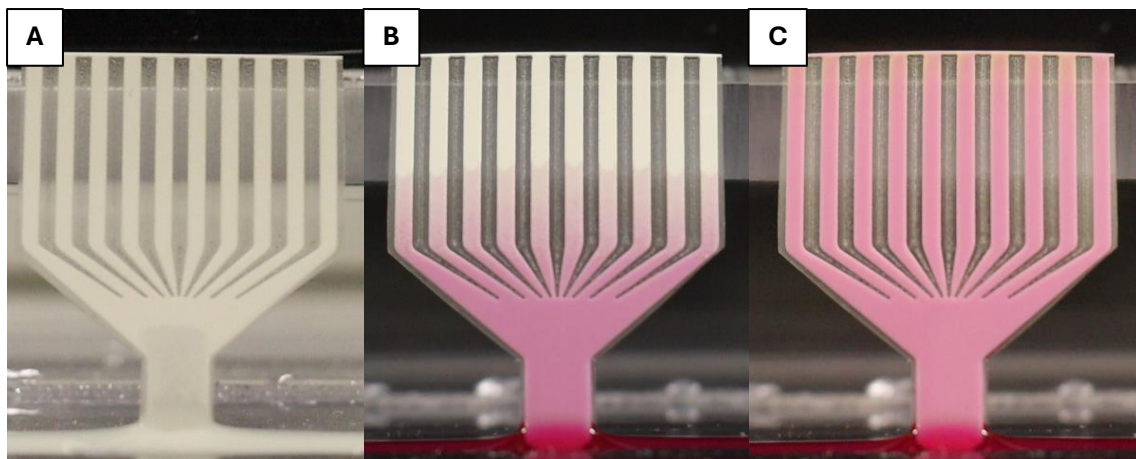


Abbildung 1: Fluss von Milch (A) und angefärbtem RO-Wasser (B, C) durch eine Unisart® CN 95 10-Kanal Fächerstruktur.

Die Testung weiterer Strukturen zeigte ebenfalls eine Inhibition des lateralen Flusses von Milch. Im Rahmen der Vorversuche stellte sich die in Abbildung 2 gezeigte „Bubble-artige“-Struktur als vielversprechende Grundlage für einen vollständigen lateralen Fluss von Milch heraus. Hier konnte eine weitere Strecke zurückgelegt werden als mit den anderen getesteten Strukturen, wobei der laterale Fluss nach 120 Sekunden zum Erliegen kam.

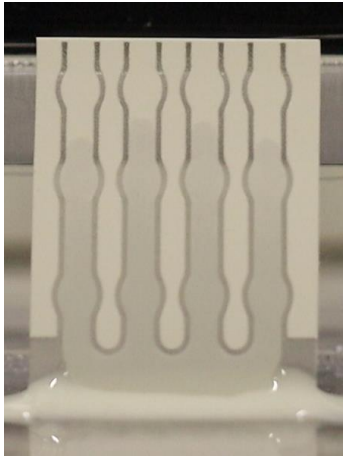


Abbildung 2: Fluss von Milch in einer „Bubble-artigen“ strukturierten Unisart® CN 95 Membran.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.1)**

Die geleisteten Projektarbeiten aus AP 2.5.1 waren notwendig und angemessen, da sie die Grundlage für Entwicklung einer Membran, die die Anforderungen der Bündnispartner, insbesondere der Schnelltesthersteller nal von Minden und Fassisi, erfüllt bilden. Das Anforderungsprofil dient, ähnlich einem Kompass, der Orientierung im weiteren Projektverlauf. Vorversuche zur Eignung bereits vorhandener strukturierter Membrane mit herausfordernden Probenmatrizes waren nötig, um gezielt die weitere Entwicklung voranzutreiben und eine Vorauswahl für die Testung bei den Bündnispartnern zu treffen. Hierdurch konnten die Ressourcen effizient eingesetzt werden. Durch Abschluss des Arbeitspakets wurde der Meilenstein 1 „Verfügbarkeit eines abgestimmten Gesamtkonzepts“ erreicht.

## Arbeitspaket 2.5.2 – Entwicklung strukturierter Membranen für den Einsatz in Fluoreszenz-basierten Lateral-Flow Schnelltests

### AP 2.5.2.1 A – Erstellung von Zeichnungen verschieden strukturierter Membranen

Auf Grundlage der in AP 2.5.1.1 getesteten „Bubble-artigen“-Struktur wurden Zeichnungen weiterer strukturierter Membranen („Kuhboot“, „OptiCow“) angefertigt. (s. *Abbildung 3*)

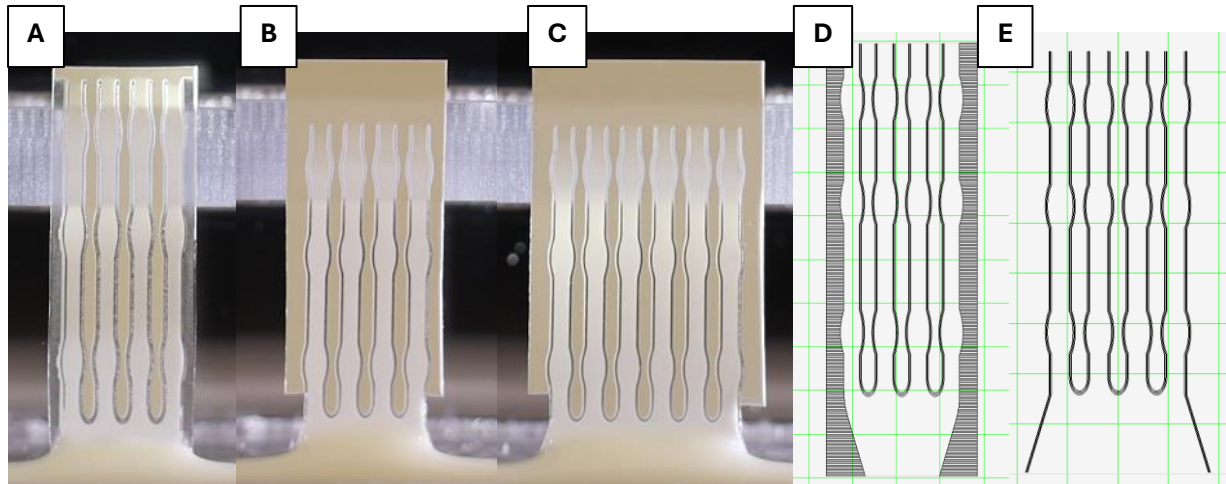


Abbildung 3: Lateraler Fluss von Milch in 4-Kanal „Kuhboot“ (A), 4-Kanal „OptiCow“ (B) und 6-Kanal „OptiCow“ (C). Technische Zeichnungen mit unterschiedlichen Zulaufgeometrien (D, E).

Diese Strukturen weisen zum einen schmalere Membrankanäle auf, zum anderen wurde die Geometrie des Probenzulaufs variiert. Hierdurch konnte ein vollständiger lateraler Fluss bei Verwendung von Milch als Probenmatrix und eine Variation der Steigzeit realisiert werden. (Tabelle 2) Die Messungen mit durch Phenolrot eingefärbten RO-Wasser verdeutlichen die starke Verlangsamung des lateralen Flusses durch Einsatz von Milch als Probenmatrix.

Tabelle 2: Steigzeiten für "Kuhboot"- und "OptiCow"-Strukturen mit Milch und Phenolrot.

Struktur	Steigzeit Milch [s]	Steigzeit Phenolrot [s]
4-Kanal „Kuhboot“	144	60
4-Kanal „OptiCow“	91	45
6-Kanal „OptiCow“	90	49

### AP 2.5.2.1 B – Herstellung von Prototypen auf unterschiedlichen Folienverstärkungen

Um Membranen für interferenzfreies Multiplexing zu entwickeln, wurden strukturierte Membranen auf Folienverstärkungen unterschiedlicher „Farben“ hergestellt. Schwarze PET-Folie kann durch hohe Lichtabsorption zu einer geringeren Emission beitragen. Daher wurden erste Prototypen im Labormaßstab auf transparenter und schwarzer Folienverstärkung hergestellt, mit einer 1:500 verdünnten Lösung eines Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 555 Antikörper gespottet und das Fluoreszenzprofil entlang der Spotposition ausgewertet.

### AP 2.5.2.2 Untersuchungen zur Eigenfluoreszenz der Membran

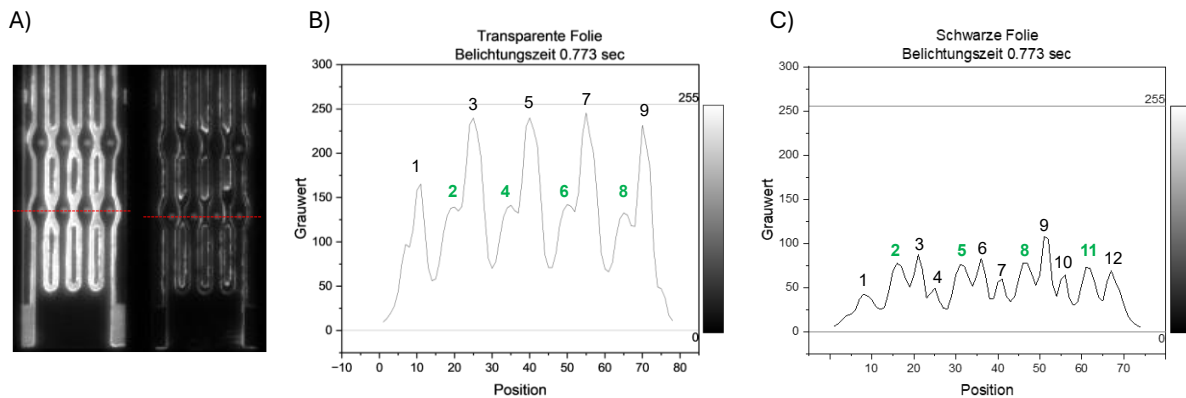


Abbildung 4: A) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme strukturierter Membranen auf transparenter (links) und schwarzer (rechts) Folienverstärkung B) Profil der Graustufenwerte mit transparenter Folie entlang der Spotpositionen. Peaks **2,4,6** und **8** resultieren aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peaks 1,3,5,7,9 resultieren aus dem Signal der Folie. C) Profil der Graustufenwerte mit schwarzer Folie entlang der Spotpositionen. Peaks **2,5,8** und **11** resultieren aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peaks 1,3,4,6,7,9,10 und 12 resultieren aus dem Signal der Folie.

In Abbildung 4 ist das aus dem Fluoreszenzsignal erzeugten Graustufenbild eines in Tropfenform auf die 4-B-Kanal Membran aufgebrachtten Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 555 Antikörper zu sehen. Die Messungen erfolgten zeitgleich mit einer Belichtungszeit von 0,773 sec (Green Epi Illumination, 605/50 Emissionsfilter, Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System). Im Anschluss wurde mittels ImageJ Software ein Graustufenprofil erzeugt. Unter Verwendung der transparenten Folienverstärkung ist ein deutlich höheres Signal durch die Folienverstärkung zu erkennen, welches im Graustufenprofil Teile des Signals von Alexa Fluor 555 überlagert. Unter Verwendung einer schwarzen Folienverstärkung konnte das Hintergrundsignal durch die Folie signifikant erniedrigt werden. Eine erhöhte Fluoreszenz ist hier nur an den Übergängen zwischen CN-Membran und hydrophober Barriere zu erkennen. Dieser Effekt kann auf die Herstellung im Labormaßstab zurückgeführt werden. Allerdings ist auch das Signal der Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 555 Antikörper im Vergleich zu der Struktur auf transparenter Folienverstärkung erniedrigt. Als Resultat wurde im Anschluss eine weitere Messung vorgenommen, bei der die Belichtungszeit für die Probe mit schwarzer Folienverstärkung auf 1,7 s erhöht wurde. Hier wurden weitere Fluoreszenzfarbstoffe (Alexa Fluor 568 und Alexa Fluor 647) in zwei der vier Kanäle gespottet, um weitere Farbstoffe und Anregungswellenlängen zu untersuchen. Aus Gründen der Übersicht sind an in Abbildung 5 nur die Ergebnisse für Alexa Fluor 555 gezeigt.

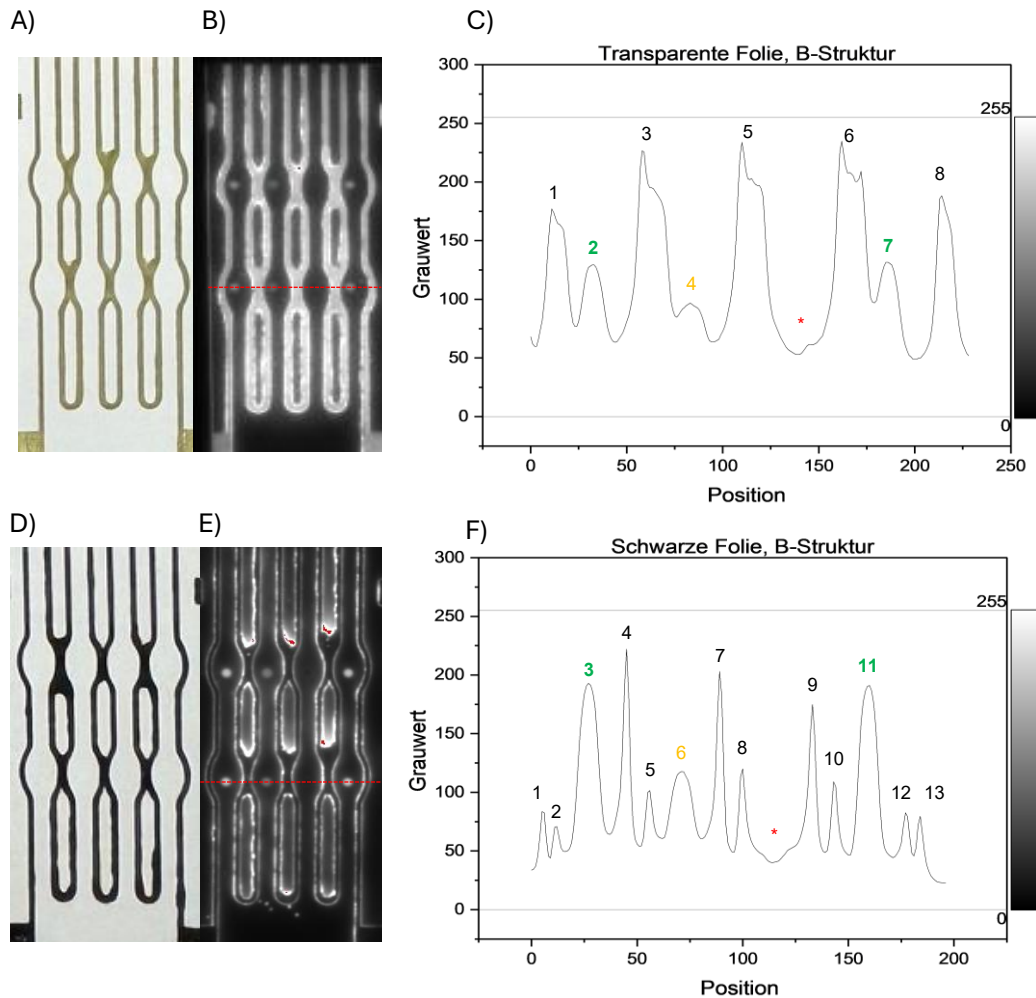


Abbildung 5: A) Foto eines Prototyps einer strukturierten Membran auf transparenter Folie. B) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 0,7 s) strukturierter Membranen auf transparenter Folienverstärkung. C) Profil der Graustufenwerte mit transparenter Folie entlang der Spotpositionen. Peaks 2 und 7 resultieren aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peak 4 resultiert aus dem Alexa Fluor 568 Signal. Peaks 1, 3, 5, 6 und 8 resultieren aus dem Signal der Folie. \* kennzeichnet die Position eines Alexa Fluor 647 Spots. D) Foto eines Prototyps einer strukturierten Membran auf schwarzer Folienverstärkung. E) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,7 s) strukturierter Membranen auf schwarzer Folienverstärkung. F) Profil der Graustufenwerte mit schwarzer Folie entlang der Spotpositionen. Peaks 3 und 11 resultieren aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peak 6 resultiert aus dem Alexa Fluor 568 Signal. Peaks 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12 und 13 resultieren aus dem Signal der Folie. \* kennzeichnet die Position eines Alexa Fluor 647 Spots.

Abbildung 5 F) zeigt deutlich die Steigerung der Signalintensität mit schwarzer Folienverstärkung bei einer höheren Belichtungszeit (Grauwert  $\approx 200$  bei 1,7 s vs. Grauwert  $\approx 75$  bei 0,773 s). Die Höhe der Peaks 4, 7 und 9 ist wiederum auf die Herstellung im Labormaßstab zurückzuführen, da das Signal eher durch einen Randeffekt, als durch die Folienverstärkung zu erklären ist. Ohne diesen Randeffekt ergibt sich für eine strukturierte Membran mit schwarzer Folienverstärkung beim Fluoreszenztest ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis als bei einer strukturierten Membran auf transparenter Folienverstärkung.

### **AP 2.5.2.3 – Tests der Membran seitens der Kooperationspartner nal von Minden und Fassisi**

Die Prototypen wurden an die Kooperationspartner nal von Minden und Fassisi übergeben. Zusätzlich zu der gezeigten „Bubble“-Struktur wurden Proben einer S-Kanal Struktur bei den Kooperationspartnern getestet. Da vom Bündnispartner nal von minden eine Präferenz für die Struktur geäußert wurde, wurde sie in allen nachfolgenden Arbeiten mitberücksichtigt. Für weitere Ergebnisse ist daher auf die Sachberichte der Teilvorhaben 1 und 6 verwiesen.

### **AP 2.5.2.4 – Fine-tuning der ausgewählten Membran**

Im Rahmen der Materialbeschaffung für die Produktion im industriellen Maßstab stellte sich heraus, dass keine schwarze Folienverstärkung in den erforderlichen Maßen auf dem Markt verfügbar ist. Daher wurde die Strategie angepasst und nach eingängiger Recherche der Einsatz weißer Folienverstärkung in den Fokus der Untersuchungen gerückt. Trotz hoher Eigenfluoreszenz sollte weiße PET-Folie in der Theorie durch die Verstärkung des Signals an der Testposition einen positiven Effekt auf das Signal-Rausch-Verhältnis haben und sich somit positiv auf die Auslesbarkeit des Tests mittel Fluoreszenz-Readers auswirken.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.2)**

Die in AP 2.5.2 durchgeführten Arbeiten waren notwendig und angemessen, da sie das Verständnis zum Einfluss der Folienverstärkung auf das Testsignal verbessern konnten und die Unterschiede zwischen der standardmäßigen Struktur mit transparenter Folienverstärkung und dem Einsatz einer schwarzen Folienverstärkung aufzeigen konnten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Folienverstärkung auf die Intensität der Testspots auswirkt. In Zukunft kann durch Gespräche mit Folienherstellern/-konfektionierung die Verfügbarkeit der schwarzen Folienverstärkung im Produktionsmaßstab erneut geprüft werden, um diesen positiven Effekt zu nutzen.

### **Arbeitspaket 2.5.3 – Validierung der ausgewählten Membran**

#### **AP 2.5.3.1 – Interne Tests bzgl. der Prozessstabilität**

Nachdem Folienverstärkung in den für die industrielle Fertigung nötigen Abmessungen beschafft wurde, erfolgten Produktionsläufe analog zweier für das Projekt relevanter Membrantypen. Die folienverstärkte Unisart® CN 140 wird häufig als „Universalmembran“ bezeichnet, da sie mit einer mittleren Steigzeit von 120 Sekunden eine hohe Eignung für eine Vielzahl von LFTs besitzt. Des Weiteren wurde eine Membran basierend auf der Unisart® CN 95 produziert. Unisart CN 95 zeichnet sich durch eine niedrige Steigzeit aus, da sie großporiger ist als andere Diagnostikmembranen im Sartorius Portfolio. Dies kann insbesondere beim Einsatz viskoser Proben und größerer Detektionspartikel von Vorteil sein. Im Rahmen der Validierung wurden die kritischen Qualitätsattribute Dicke und Steigzeit mit RO-Wasser gemessen. Des Weiteren erfolgte eine Bewertung der Oberfläche durch das Aufbringen von Linien mit phenolrotgefärbtem RO-Wasser. Für die Unisart® CN 140 wurden außerdem funktionelle Tests durchgeführt, um die Proteinbindung und die Signalentwicklung zu beurteilen.

### Membrantyp 1 – Angelehnt an Unisart® CN 140

Um die Prozessstabilität zu überprüfen, wurden im Rahmen der Ziehung auf weißer Folienverstärkung über den Produktionslauf 12 Proben genommen und auf die kritischen Qualitätsattribute Dicke und Steigzeit mit RO-Wasser geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Die türkis-gestrichelten Linien markieren die Spezifikationsgrenzen, der Unisart® CN 140. Sowohl die Dicke als auch die Steigzeit lagen mit  $238,5 \pm 4,1 \mu\text{m}$  und  $117,8 \pm 2,6 \text{ s}/40 \text{ mm}$  gut in der Mitte der Spezifikation mit einer niedrigen prozentualen Standardabweichung von jeweils 2%.

Phenolrotlinien, welche mit einer Dispensionsrate von 1 und 2  $\mu\text{l}/\text{cm}$  gezogen wurden, zeigen eine gleichmäßige, schmale Kontur. Dies ist ein Indikator für eine homogene Oberfläche mit guten Benetzungseigenschaften.

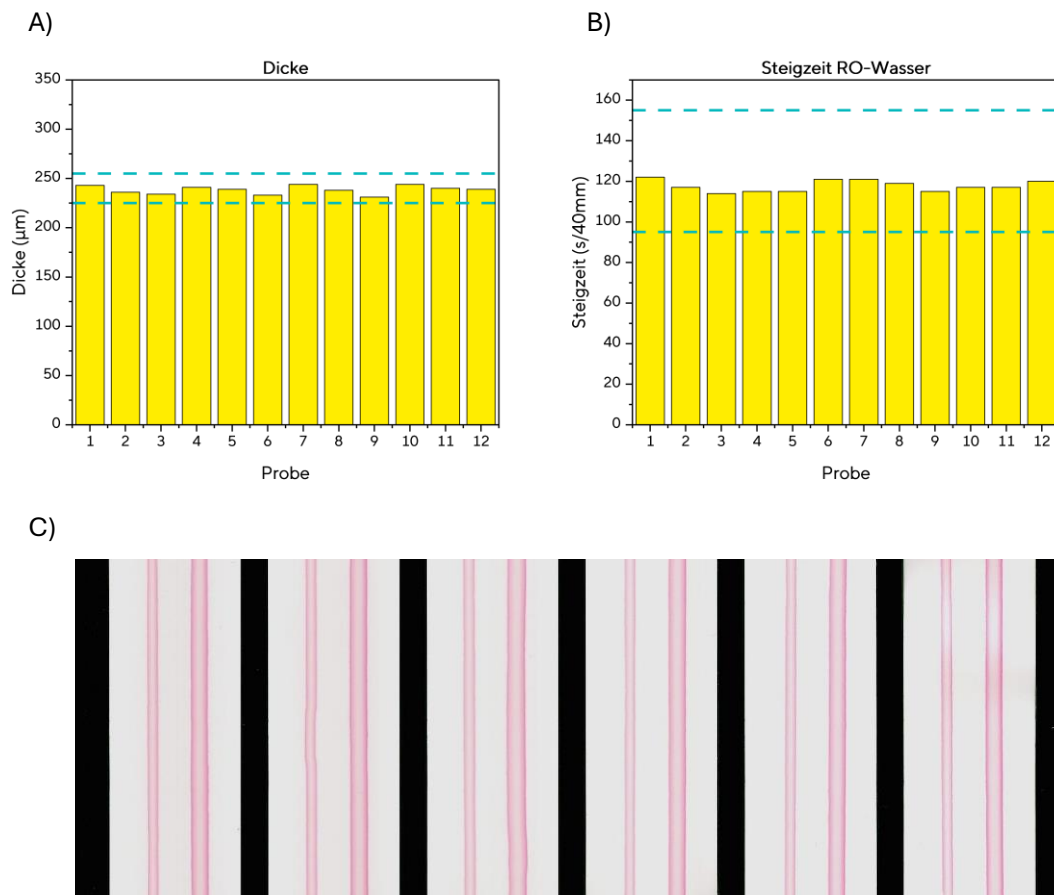


Abbildung 6: Ergebnisse einer Ziehung analog zur verstärkten Unisart® CN140 auf weißer Folienverstärkung im industriellen Maßstab. Kritische Qualitätsattribute Dicke (A) und Steigzeit mit RO-Wasser (B). C) Beispielhafte Phenolrotlinien mit Dispensionsraten von 1  $\mu\text{l}/\text{cm}$  und 2  $\mu\text{l}/\text{cm}$  gezogen.

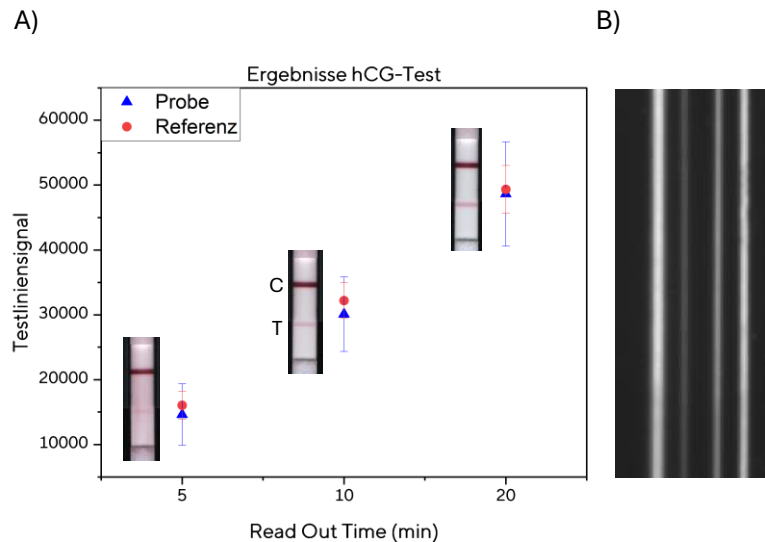


Abbildung 7: A) Auftragung des Testliniensignals der Probe und einer Referenz im hCG-Assay nach 5, 10 und 20 Minuten Auslesezeit. B) Mit SYPRO-Ruby eingefärbte IgG-Proteinlinien unterschiedlicher Konzentrationen.

Zur Bewertung der funktionellen Eigenschaften der Membran wurden des Weiteren IgG-Proteinlinien unterschiedlicher Konzentrationen auf die Membran aufgebracht und mittels SYPRO Ruby Stain für die Auswertung mittel ChemiDoc eingefärbt. Die hieraus resultierenden Linien zeigen eine gute Intensität und Kontur. Für eine praxisnahe Untersuchung wurde ein hCG-Test (Schwangerschaftstest) auf der Membran aufgebaut und laufen gelassen. Die Entwicklung des Signals an der Testlinie nach 5, 10 und 20 Minuten wurde für jweiles drei Teststreifen aufgenommen und ist mit der einer Referenzmembran vergleichbar (Abbildung 7). Lediglich die Standardabweichung fällt für das Probenmaterial etwas höher aus.

## Membrantyp 2 – Angelehnt an Unisart® CN 95

Im Rahmen der Validierung der auf weißer Folienverstärkung gezogenen Unisart® CN 95 wurden zwei unterschiedliche Arten weißer Folienverstärkung getestet. Probe 1-12 wurden mit Folienverstärkung A und Proben 13-24 mit Folienverstärkung B hergestellt. Wiederum zeigt das kritische Qualitätsattribut Dicke gute Übereinstimmung mit der Spezifikation mit  $255,6 \pm 5,5 \mu\text{m}$  für Folienverstärkung A und  $255,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$  für Folienverstärkung B. Die prozentuale Standardabweichung liegt auch hier bei 2%. Auch die Steigzeit mit RO-Wasser hält die Spezifikation gut ein mit  $85,1 \pm 7,7 \text{ s}/40\text{mm}$  und  $84,7 \pm 5,6 \text{ s}/40\text{mm}$ . Die prozentuale Standardabweichung liegt bei 9% und 7% und ist somit für einen industriellen Prozess sehr gut.

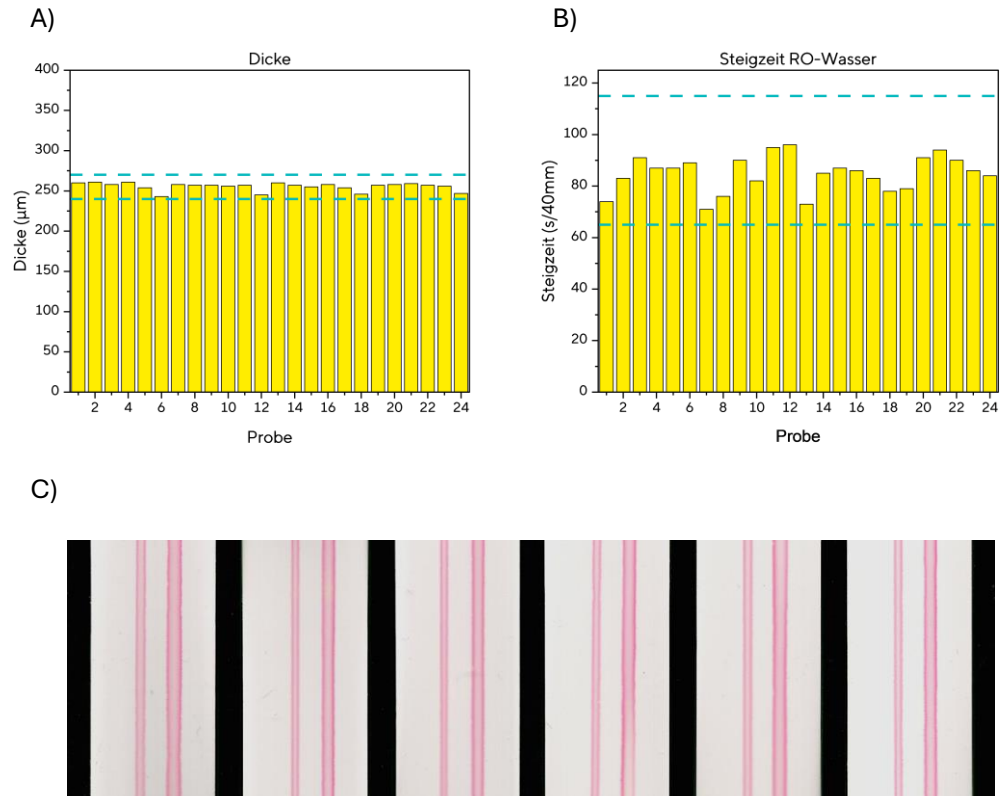


Abbildung 8: Ergebnisse einer Ziehung analog zur Unisart® CN 95 auf weißer Folienverstärkung im industriellen Maßstab. Kritische Qualitätsattribute Dicke (A) und Steigzeit mit RO-Wasser (B). C) Beispielhafte Phenolrotlinien mit Dispersionsraten von 1 µl/cm und 2 µl/cm gezogen.

### **Strukturierung von Membranen auf weißer Folienverstärkung**

Im nächsten Schritt wurden die gezogenen Rollen für die Strukturierung konfektioniert. Die Membrane auf weißer Folienverstärkung wurde sowohl in unstrukturierter als auch strukturierter Form an die Bündnispartner nal von minden und Fassisi weitergegeben.

### **Anpassung der optischen Kontrolle (weiß auf weiß)**

Die strukturierten Membranen werden während der Produktion einer 100%igen optischen Kontrolle unterzogen. Dies ist insbesondere aufgrund der hohen Bedeutung der Maßhaltigkeit entscheidend dafür, dass das Produkt später vom Kunden in automatisierten Prozessen eingesetzt werden kann. Des Weiteren ist es im Rahmen des Strukturierungsprozesses unerlässlich präzise zu arbeiten. Beim Einsatz einer weißen Folienverstärkung ergibt sich ein niedrigerer Kontrast zwischen Membran und hydrophober Barriere. Im Rahmen des Projekts konnte die optische Kontrolle erfolgreich angepasst werden, um eine hohe Maßhaltigkeit bei Verwendung weißer Folienverstärkung zu erzielen.

### **Eigenfluoreszenz der Membran mit weißer Folienverstärkung**

Die strukturierten Membranen (S-Struktur, B-Struktur) wurden wiederum mit Goat anti-mouse-Alexa 555, Goat-anti-mouse-Alexa 568 und Goat-anti-mouse-Alexa 647 gespottet und mittels ChemiDoc bildlich dargestellt. Die erzeugten Graustufenbilder sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigt. Die strukturierten Membranen mit weißer Folienverstärkung zeigen bei einer mittleren Expositionszeit (1,17 s) deutlich erhöhte Eigenfluoreszenz gegenüber Membran auf transparenter oder schwarzer Folienverstärkung. Es ist zu erkennen, dass die Grauwerte der Folie und der Membran erhöht sind. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, dass auch das Signal an der Testposition durch die Verwendung der weißen Folie erhöht wird. Durch Änderung des Gamma-Wertes der Graustufenbilder auf  $\gamma = 4$  lässt sich die erhöhte Eigenfluoreszenz von Folie und Membran deutlich ausgleichen. Der Gamma-Wert passt dabei die Darstellung nach folgender Formel an:

$$Ausgabe = 255 \times \left( \frac{Eingabe}{255} \right)^\gamma$$

Die Erhöhung von Gamma führt somit zur Korrektur der Helligkeit der Mitteltöne (alle Werte außer 0 (reines Schwarz) und 255 (reines Weiß)).

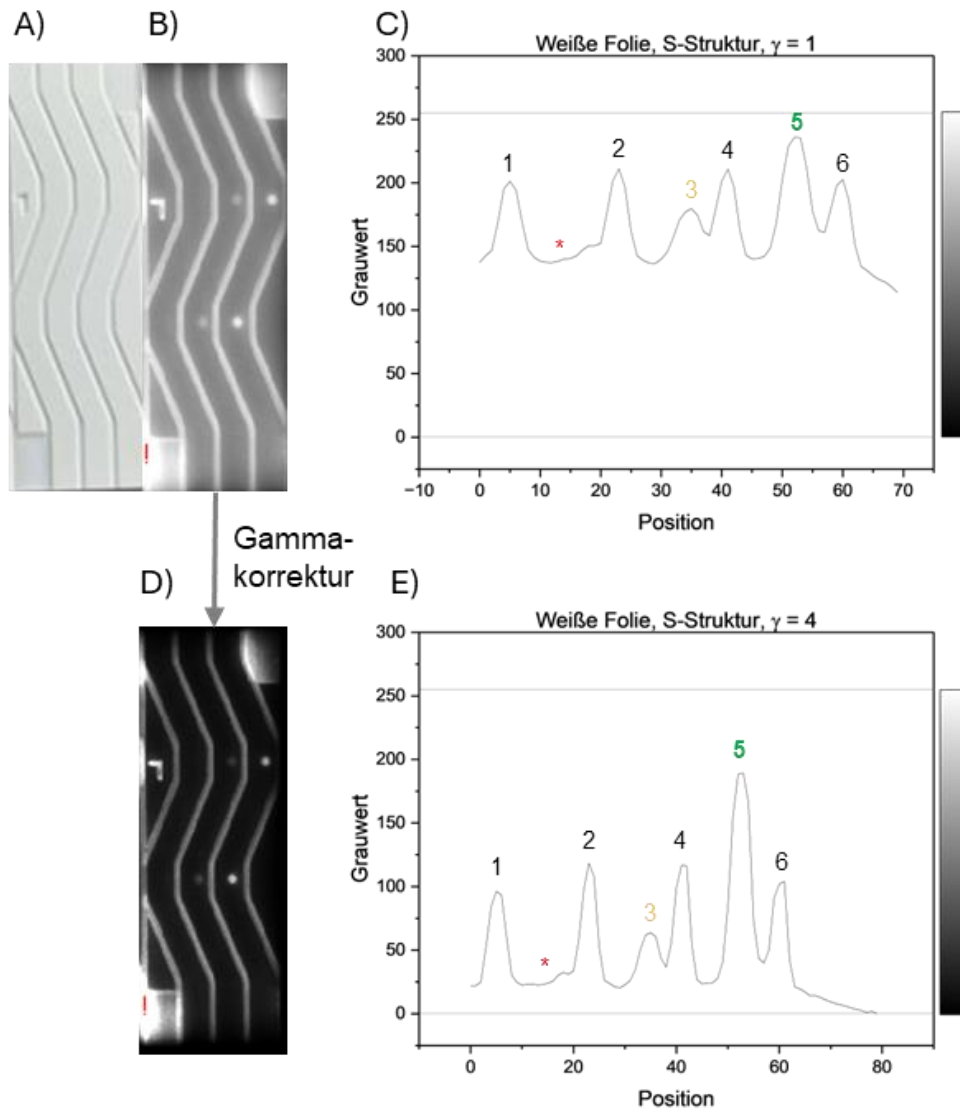


Abbildung 9: A) Foto einer 3-S-Kanal strukturierten Membran auf weißer Folie. B) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,17 s) einer 3-S-Kanal strukturierten Membran auf weißer Folienverstärkung. C) Profil der Graustufenwerte mit weißer Folie entlang der Spotpositionen. Peak 5 resultiert aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peak 3 resultiert aus dem Alexa Fluor 568 Signal. Peaks 1,2,4 und 6 resultieren aus dem Signal der Folie. \* kennzeichnet die Position eines Alexa Fluor 647 Spots. D) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,17 s) strukturierter Membranen auf weißer Folienverstärkung nach Gammakorrektur. E) Profil der Graustufenwerte mit weißer Folie entlang der Spotpositionen analog zu C) nach Gammakorrektur.

Der Vergleich von S-Kanal und B-Kanal zeigt einen Nachteil der verwendeten B-Struktur im Bereich der Ausbuchtungen für die Spotpositionen des mittleren Kanals beim Auslesen des Fluoreszenzsignals. Durch den Herstellungsprozess wird an dieser Stelle besonders viel der Folienverstärkung frei, wodurch das Fluoreszenzsignal hier besonders stark ausfällt (markiert durch ein rote Kreise). Im gezeigten Beispiel führt dies sogar zur Übersättigung des Detektors. Somit ist hier zunächst die S-Kanal Struktur für die gewünschte Anwendung zu bevorzugen, bzw. die B-Struktur hierhingehend zu optimieren.

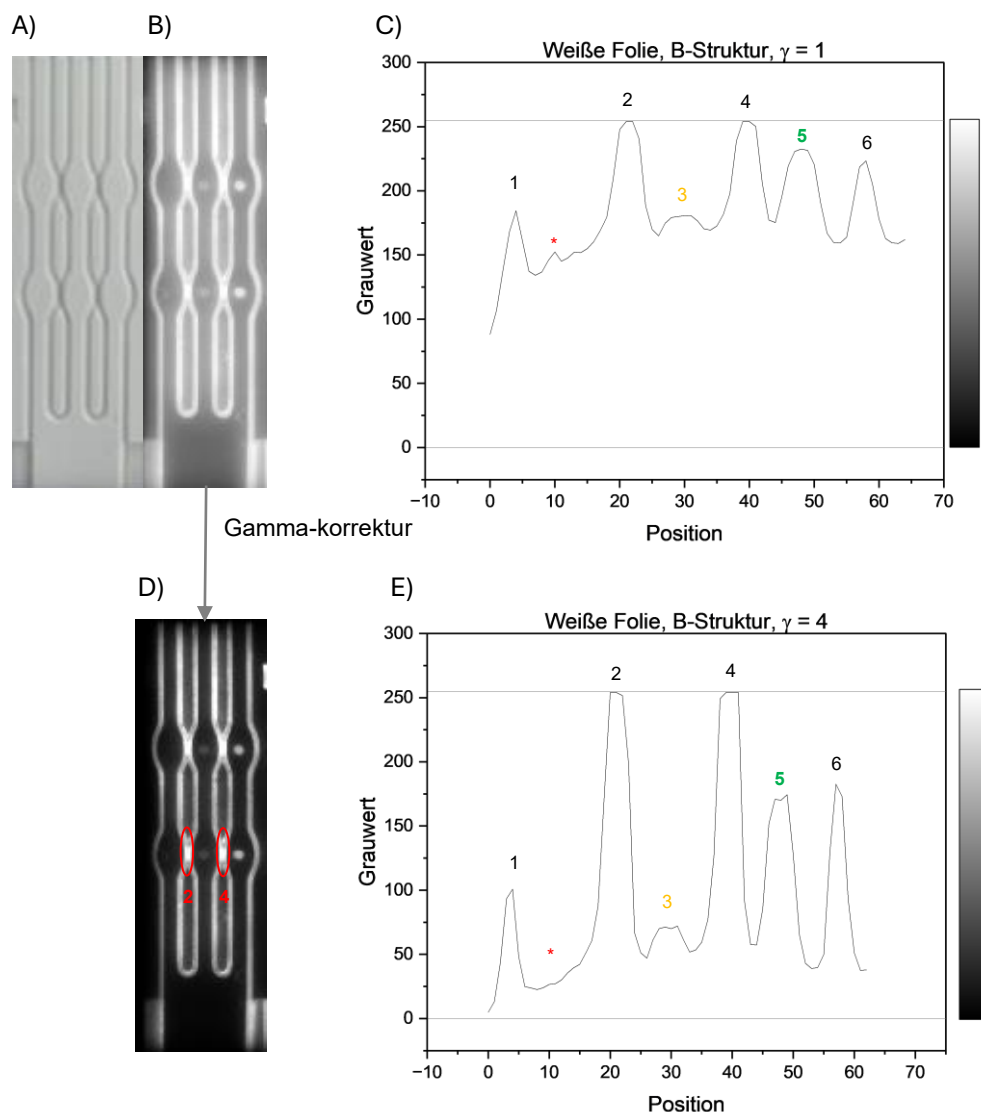


Abbildung 10: A) Foto einer 3-B-Kanal strukturierten Membran auf weißer Folie. B) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,17 s) einer 3-B-Kanal strukturierten Membran auf weißer Folienverstärkung. C) Profil der Graustufenwerte mit weißer Folie entlang der Spotpositionen. Peak 5 resultiert aus dem Alexa Fluor 555 Signal. Peak 3 resultiert aus dem Alexa Fluor 568 Signal. Peaks 1,2,4 und 6 resultieren aus dem Signal der Folie. \* kennzeichnet die Position eines Alexa Fluor 647 Spots. D) Graustufenbild der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,17 s) einer 3-B-Kanal strukturierten Membran auf weißer Folienverstärkung nach Gammakorrektur. E) Profil der Graustufenwerte mit weißer Folie entlang der Spotpositionen analog zu C) nach Gammakorrektur.

Insgesamt ist der Effekt durch die weiße Folienverstärkung positiv zu beurteilen, da im Vergleich zu einer transparenten Folienverstärkung eine Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses beobachtet wird. Hierzu ist eine Anpassung des Hintergrundsignals der Membran durch den Reader denkbar.

Im Oktober 2024 konnte weiteres Feedback der Bündnispartner eingeholt werden, wodurch bei Nutzung der unstrukturierten Membran auf weißer Folienverstärkung eine deutliche Signalverstärkung erzielt werden konnte. Die Präferenz von nal von minden für die Verwendung der S-Struktur wurde durch die positive Bewertung von Handhabung, Kanalbreite bei hohem Probenvolumen und sichere Trennung der Kanäle begründet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei dem anderen Kooperationspartner keine klare Präferenz, da die Anforderungen im Hinblick auf

Probenvolumen andere waren. Des Weiteren wurde angemerkt, dass ein „ready-to-use“ Konjugatpad, angepasst an die Kanalgeometrie, beim Einsatz von strukturierten Membranen wünschenswert ist. Daher wurden erste Versuche in diese Richtung bei Sartorius durchgeführt und in diesem Zusammenhang das Freisetzungsverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen aus dem Konjugatpad untersucht. Für detaillierte Informationen sei auf die Sachberichte der Bündnispartner verwiesen.

#### **AP 2.5.3.2 – Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den LFT-Herstellern**

Für die Bewertung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den LFT-Herstellern sei an dieser Stelle auf die Berichte der Kooperationspartner nal von Minden und Fassisi verwiesen.

#### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.3)**

Die im Rahmen von AP 2.5.3 durchgeführten Arbeiten waren notwendig und angemessen, da hierdurch die Machbarkeit, Prozessstabilität und Konsistenz der Herstellung der für fluoreszenzbasierte LFTs geeignete Membran im industriellen Maßstab bestätigt und optimiert werden konnten. Dieses Scale-up vom Labormaßstab ist für eine spätere Verwertung der Ergebnisse unerlässlich. Insbesondere die Anpassung des Strukturierungsprozesses im Hinblick auf den niedrigen Kontrast einer weißen Membran auf einer weißen Folienverstärkung stellte sich als eine besondere Herausforderung heraus, der das Projektteam erfolgreich begegnen konnte.

#### **Arbeitspaket 2.5.4 – Dokumentensicherung**

##### **AP 2.5.4.1 Auswertung aller Testergebnisse in Zusammenarbeit mit allen Kooperationspartnern & AP 2.5.4.2 Finale Dokumentation der Ergebnisse**

Im Rahmen von AP 2.5.4.1 wurden die Testergebnisse final ausgewertet und dokumentiert.

#### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.4)**

Eine sorgfältige Auswertung und Dokumentation sind unerlässlich, damit die Ergebnisse im Folgenden für die Verwertung nutzbar sind.

## Arbeitspaket 2.5.5 Durchführung Summer School bzw. Winter School

Ziel des Arbeitspakets 2.5.5 war es Studierende an die LFT-Unternehmen und deren Partner in Südniedersachsen heranzuführen. Hierfür wurde eine dreitägige Summer- und Winterschool vorgesehen, die Studierenden Einblicke in die Technologie, Anwendungen und das praktische Arbeiten geben sollten. Des Weiteren sollten die Veranstaltungen eine Gelegenheit zum Austausch mit Vertretern der Unternehmen und Institutionen darstellen.

### AP 2.5.5.2 Dreitägige Winter School

Durch Verzögerungen im Planungsablauf wurde die Winterschool zuerst geplant. Im Rahmen der Planung wurde festgelegt, dass für ein erstes Outreach ein eintägiges Event anstelle einer dreitägigen Winterschool sinnvoller ist. Die Winterschool wurde für den 08. Oktober 2024 in der Zeit von 10 bis 17 Uhr geplant und sollte in den Räumlichkeiten des IFNANO in Göttingen stattfinden. Das Planungskomitee bestand aus Vertretern von Sartorius, nal von minden, Fassisi und IFNANO. Es wurde ein Flyer entworfen, welcher in den Netzwerken der Hochschulen im Raum Südniedersachsen mit fachnahen Studiengängen (Uni Hannover, HAWK, TU Braunschweig, Uni Göttingen, Uni Kassel) verteilt werden sollte (s. Abbildung 11) Hierzu wurden VertreterInnen der Referate für Kommunikation, Öffentlichkeitsarbeit und Marketing der Hochschulen per E-Mail kontaktiert. Auch bewarben die Bündnispartner die Veranstaltung auf der Plattform LinkedIn. Des Weiteren wurde durch die Bündnispartner, die an Bildungseinrichtungen tätig sind, Werbung in ihren Veranstaltungen gemacht. Leider blieben die Anmeldungen bis zum Ablauf der Anmeldefrist aus. Daher wurde die Veranstaltung abgesagt und zur Planung der Summerschool für das Jahr 2025 übergegangen.



Abbildung 11: Vorder- und Rückseite des Flyers für die Winterschool 2024.

### AP 2.5.5.1 Dreitägige Summer School

Im Rahmen der Summer School, welche nachfolgend Spring School genannt wird, wurde im Planungskomitee, bestehend aus den gleichen Vertretern wie in AP 2.5.5.2, analysiert, welche Schwachstellen in der Planung der Winterschool zum Ausbleiben der Anmeldungen geführt haben könnten. Folgende wesentliche Komponenten wurden identifiziert:

- Unzureichende Werbung/ Falsche Kommunikationswege/ Plattformen
- Zeitliches Format der Veranstaltung

- Später Anmeldeschluss

Die Planung für die Spring School wurde entsprechend angepasst. Bei den Werbemaßnahmen wurde statt auf Social Media Plattformen der Hochschulen auf Aushängen auf den Campus und Werbung in Lehrveranstaltungen gesetzt.

Die Veranstaltung wurde auf zwei Nachmittage aufgeteilt, so dass sie am 13. Und 14. Mai 2025 jeweils von 13 – 17 Uhr wiederum am IFNANO stattfinden sollte. Thematisch sollten die beiden Tage so aufgeteilt werden, dass je nach Interessenlage auch die Möglichkeit bestünde, nur an einem der Tage teilzunehmen.

Der Anmeldeschluss wurde zwei Wochen vor den geplanten Termin gelegt, um früher ein Gefühl für den Zulauf zu erhalten. Geplant wurde die Auswertung der Anmeldungen am 30.04.2025, mit regelmäßigen Updates über den Zwischenstand durch das IFNANO.



Abbildung 12: Vorder- und Rückseite des Flyers für die Springschool 2024.

Zum Zeitpunkt des Anmeldeschlusses waren 5 Anmeldungen eingegangen. Trotz deutlicher Steigerung im Vergleich zur vorhergehenden Planung, wurde die Veranstaltung abgesagt, da die Anzahl der Teilnehmenden zu gering war, um die Aufwendungen für die Vortragenden und die Organisation des Caterings zu rechtfertigen.

### Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten (AP 2.5.5)

Die geleisteten Projektarbeiten waren notwendig und angemessen, da hierdurch der Zulauf junger Fachkräfte aus der Region zu den ansässigen Unternehmen und Institutionen im Bereich LFTs gefördert werden sollte. Die Planung und deren Koordination, insbesondere im Bereich Bewerbung der Veranstaltung, Abstimmung mit Vortragenden, Konzeptionierung des Programms, Optimierung anhand der ersten Planungsphase waren wichtige Bestandteile bei der erhofften Zielerreichung. Bedauerlicherweise konnten die Veranstaltungen mangels Anmeldungen zum Anmeldeschluss nicht stattfinden.

## **Die wichtigsten Positionen zum zahlenmäßigen Nachweis**

Die im Rahmen des Teilprojekts entstandenden Kosten beliefen sich auf insgesamt 83.055,98 €, wobei der Anteil des Bundes 33.222,39 € betrug. Die Kosten blieben demnach unter den ursprünglich 141.413,55 € gemäß der Vorkalkulation.

Personalkosten (Position 837) in Höhe von insgesamt 75.385,50 € zu Projektende wichen insgesamt schwächer von der Vorkalkulation ab, in welcher diese mit 81.314,45 € geschätzt wurden.

Materialkosten (Position 813) in Höhe von insgesamt 7.670,48 € beliefen sich deutlich unterhalb den ursprünglich vorkalkulierten 60.099,10 €. Eine Stellungnahme zu der Abweichung der Materialkosten erfolgte im April 2024. Weiterhin konnten finanzielle Einsparungen durch Nutzung bereits vorhandener Arbeitsmaterialien erzielt werden. Eine weitere Einsparung im Hinblick auf Materialkosten ergab sich aus der mangelnden Verfügbarkeit einer geeigneten schwarzen Folienverstärkung im benötigten Produktionsformat. Hierdurch war lediglich ein Produktionslauf mit einer weißen Folienverstärkung möglich.

## **Vorraussichtlicher Nutzen/ Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Da sowohl bei nal von minden als auch bei Fassisi die Machbarkeit der multiplexbasierten Tests unter Verwendung strukturierter Membrane gezeigt werden konnte, ist von einer planmäßigen Verwertbarkeit der Ergebnisse auszugehen.

Die gewonnen Erkenntnisse im Hinblick auf Anforderungen der Testhersteller, Optimierungspotenzial in der Anwendung, Lauf von komplexen Probenmatrizes und Einflussfaktoren der (strukturierten) Membran auf das Fluoreszenzsignal sind wertvoll im Hinblick auf die Entwicklung zukunftsfähiger Membranprodukte und die Festigung des Alleinstellungsmerkmals, welches Sartorius mit Unisart® StructSure auf dem Markt für die Entwicklung von Multiplexing LFTs hat.

## **Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen**

Patente US 11446654B2 der Firma Quidel „Substrate with Channels for Controlled Fluid Flow“ und DE102021214853B3 der Universitäten Tübingen und Braunschweig.

## **Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF**

Eine Veröffentlichung des Ergebnisses ist nicht geplant.