Gefördert durch:

Bundesministerium für Forschung, Technologie und Raumfahrt

DIANA

wir! Wandel durch Innovation in der Region

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

gemäß Nr. 4 NABF zum Vorhaben

BioSim – Gestaltung Kapillarkraft-gesteuerter PoC-Diagnostiksysteme für die antikörperbasierte Bestimmung von Alzheimer-Biomarkern mittels multiskaliger Simulationsmethoden

Teilprojekt: Entwicklung Kapillarkraft-gesteuerter PoC-Diagnostiksysteme für die antikörperbasierte Bestimmung von Alzheimer-Biomarkern mittels multiskaliger Simulationsmethoden

Zuwendungsempfänger: SensLab Gesellschaft zur Entwicklung und Herstellung bioelektrochemischer Sensoren mbH

Förderkennzeichen: 03WIR7305C

Leiter des Projektes: Dr. Christopher Pöhlmann

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2023 – 30.04.2025

SensLab GmbH

Bautzner Str. 67

Dr. Christopher Pöhlmann

Tel.: 0341 23418-44

Fax: 0341 23418-40

E-Mail: christopher.poehlmann@ekf-diagnostic.de

Autoren: Jörg Weitzenberg, Martin Richter, Dr. Christopher Pöhlmann

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Teil I: Kurzbericht

Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Teilprojekt „Entwicklung kapillarkraft-gesteuerter PoC-Diagnostiksysteme für die antikörperbasierte Bestimmung von Alzheimer-Biomarkern mittels multiskaliger Simulationsmethoden“ (SensLab GmbH) war Teil des Verbundvorhabens BioSim.

Ziel war die Entwicklung eines mikrofluidischen Lab-on-a-Chip-(LoC)-Diagnostiksystems, das vollständig autark – also ohne externe Pumpen, Ventile oder Steuerung – arbeitet und damit den Nachweis von Alzheimer-Biomarkern in Plasmaproben direkt am Point-of-Care (PoC) ermöglicht.

Im Stand der Technik werden Alzheimer-Biomarker überwiegend im Liquor mittels komplexer, laborbasierter Immunoassays (ELISA) bestimmt. Eine patientennahe Blutdiagnostik existiert bislang nicht in reproduzierbarer, automatisierter Form. Kapillarkraft-gesteuerte mikrofluidische Systeme bieten hier einen innovativen Ansatz, da Flüssigkeiten allein durch Oberflächenkräfte bewegt werden können. Die Herausforderung bestand darin, diese Prozesse gezielt zu gestalten, zu simulieren und experimentell zu validieren, um verlässliche, miniaturisierte Nachweissysteme zu schaffen.

Der wissenschaftlich-technische Fortschritt des Projekts lag in der Verknüpfung von multiphysikalischer Simulation mit realer mikrofluidischer und elektrochemischer Charakterisierung, um Entwicklungszeiten zu verkürzen und Systemeigenschaften reproduzierbar vorherzusagen.

Ablauf des Vorhabens

Zu Beginn des Projekts wurden die Systemanforderungen definiert (AP 1), darunter Materialien, Strukturgrößen und Analysezeiten. Weiterhin wurden Einflußgrößen für die multiskalige Simulationen experimentell oder durch Literaturrecherche bestimmt, um darauf aufbauend Strömungsprozesse in Mikrokanälen zu modellieren und geeignete Geometrien für kapillargetriebene Flüsse zu bestimmen (AP 2).

Parallel entwickelte SensLab einen Heißprägeprozess zur Herstellung mikrostrukturierter Polymerfolien und fertigte erste mikrofluidische Testelemente (Einzelelemente AP 3.3 / LoC-Gsamtsystem AP 5.2). Diese wurden anschließend experimentell charakterisiert, wobei mithilfe einer eventbasierten Kamera und der eigens entwickelten TraceView-Software Fließprofile und Partikelbewegungen analysiert wurden (AP 3.5).

Im Projekt entstand ein weiterhin ein elektrochemisches Nachweissystem auf Basis von β-Galactosidase-gekoppelten Antikörpern für die Alzheimer-Biomarker Prionprotein (PrionP) und phosphoryliertes Tau (pTau). Beide Assays wurden photometrisch und elektrochemisch validiert und zeigten Nachweisgrenzen im niedrigen ng/mL-Bereich (AP 5.3). Die Integration der mikrofluidischen und elektrochemischen Komponenten in das LoC-System erfolgte im Rahmen der Systemassemblierung (AP 5.4).

Abschließend wurde das Gesamtsystem elektrochemisch charakterisiert (AP 6). Dabei konnte die prinzipielle Funktionalität des mikrofluidischen LoC-Systems nachgewiesen werden, auch wenn hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Fluidikdichtung weiterer Optimierungsbedarf besteht.

Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Im Ergebnis konnte die technische Machbarkeit eines autarken, kapillarkraftgesteuerten Alzheimer-Diagnostiksystems nachgewiesen werden. Durch die Verbindung von Simulation, Fertigung und experimenteller Analyse entstand ein ganzheitlicher Entwicklungsansatz, der Entwicklungszyklen deutlich verkürzt und die Prozessstabilität erhöht. Die im Projekt etablierten multiskaligen Simulationsmethoden ermöglichten eine realitätsnahe Abbildung der Strömungsbedingungen und bildeten die Grundlage für die gezielte Optimierung der Mikrofluidiklayouts.

Mit der Entwicklung des β-Galactosidase-basierten elektrochemischen Immunoassays auf kapillargetriebenen Dünnschicht-Goldsensoren konnte die prinzipielle Eignung des Ansatzes für den Nachweis Alzheimer-relevanter Biomarker im Plasma aufgezeigt werden. Der PrionP-

Nachweis zeigte dabei eine gute Sensitivität und Reproduzierbarkeit, während für den pTau-Nachweis aufgrund geringerer Signalintensität weiterer Optimierungsbedarf besteht. Der Heißprägeprozess für mikrostrukturierte Polycarbonatfolien wurde erfolgreich in einen vorseriennahen Zustand überführt und ermöglichte reproduzierbare Strukturen im Bereich weniger Mikrometer. Die im Projekt entwickelte TraceView-Software erwies sich als ein leistungsfähiges Werkzeug zur Analyse mikrofluidischer Prozesse in Echtzeit und wird auch über das Projekt hinaus genutzt. Die elektrochemische Assaygestaltung auf Dünnschicht-Goldelektroden konnte erfolgreich demonstriert werden; der vollständig kapillargetriebene LoC-Assay befindet sich jedoch noch in der Optimierungsphase, da die Fluidik derzeit teils störungsanfällig und noch nicht durchgängig reproduzierbar ist.

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IWU (Mikrostrukturierung und Werkzeugbau), der Technischen Universität Chemnitz (multiphysikalische Simulation) und der RoboScreen GmbH (Entwicklung antikörperbasierter Nachweisreagenzien) durchgeführt. Die gemeinsame Arbeit führte zur erfolgreichen Integration von Modellierung, Fertigung und bioanalytischer Validierung in einem einheitlichen Entwicklungsprozess.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die Kombination aus simulationsgestützter Fluidikentwicklung, mikrostrukturierter Polymerfertigung und elektrochemischer Detektion eine zukunftsweisende Grundlage für patientennahe Lab-on-a-Chip-Systeme bietet. Die erzielten Ergebnisse bilden die technologische Basis für zukünftige Alzheimer-PoC-Systeme und können perspektivisch auf weitere Biomarker übertragen werden.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Ausgangssituation und Zielstellung

Das Verbundprojekt BioSim zielte auf die Entwicklung eines mikrofluidischen Point-of-Care-Diagnostiksystems (PoC) zur Bestimmung von Alzheimer-Biomarkern. In einem hochintegrierten Lab-on-a-Chip (LoC)-Format sollten kapillarkraftgetriebene Flüssigkeitsströme, mikrostrukturierte Polymerkanäle und ein elektrochemisches Detektionssystem so kombiniert werden, dass Immunoassays ohne externe Pumpen, Ventile oder komplexe Steuerung realisiert werden können.
Im Zentrum stand der wissenschaftliche und technologische Anspruch, mikrofluidische Prozesse mithilfe multiphysikalischer Simulationen besser zu verstehen und diese Erkenntnisse gezielt in die Gestaltung, Fertigung und Validierung des Systems zu überführen. Ziel war ein miniaturisiertes, reproduzierbares Diagnostiksystem, das eine Grundlage für zukünftige medizintechnische Produkte bildet.
SensLab übernahm innerhalb des Konsortiums die Verantwortung für die Entwicklung, Assemblierung und Fertigung des mikrofluidischen Gesamtsystems. Dies umfasste die Definition der technischen und funktionalen Anforderungen, die Herstellung mikrostrukturierter Polymerkomponenten im Heißprägeverfahren, die elektrochemische Auslesung immunchemischer Reaktionen sowie die Assemblierung des Gesamtsystems zu einem funktionalen Prototyp.

2. Projektverlauf und Arbeitsergebnisse

2.1 Definition der Systemanforderungen (AP 1)

Zu Beginn des Projekts erfolgte die umfassende Definition der Systemanforderungen. Das Diagnostiksystem sollte auf einem antikörperbasierten Immunoassay aufbauen, der mithilfe eines elektrochemischen Reporters detektiert wird. Dabei wurde festgelegt, dass ausschließlich kapillarkraftgesteuerte Strömungsvorgänge genutzt werden dürfen, um einen autarken Betrieb ohne externe Pumpen zu ermöglichen.
Als Probenmaterial wurde Plasma definiert, das in einem Volumen von maximal 20 µL verarbeitet werden sollte. Die Analysezeit sollte 12 Minuten nicht überschreiten.
Neben den Anforderungen an die Funktionalität und analytische Leistungsfähigkeit wurden auch die Anforderungen an die Werkstoffe des LoC-Systems definiert. Das Gesamtsystem sollte auf dünnen Polymerfolien basieren: eine PET-Trägerschicht (Melinex® 329) mit aufgesputterter Goldschicht, in die mittels Laserstrukturierung Elektroden und Leiterstrukturen eingebracht werden, wird mit einer darauf liegenden mikrostrukturierten Polycarbonat-Prägefolie (Makrofol® DE 1-1 000000) mittels einer UV-härtbaren Klebeschicht bzw. mittels einer doppelseitigen Klebefolie verbunden. Die Definition der Messkammern und der Schutz der Leiterbahnen erfolgt durch das Aufbringen einer schützenden Isolationslackschicht per Siebdruck.
Es wurden zu Beginn drei mögliche Assaykonzepte mit unterschiedlichen Fluidiklayouts definiert. Im Laufe des Projektes wurde das dritte Konzept aus Funktionalitätsgründen nicht weiter betrachtet und sich auf die ersten beiden Konzepte konzentriert (siehe Abbildung 1).
Da durch den Simulations-basierten Ansatz im Rahmen des Projektes eine Verkürzung des Entwicklungsprozesses angestrebt wurde, wurde zu Beginn des Projektes auch der Entwicklungsprozess beim Partner SensLab definiert und allen Partnern vorgestellt. Der aktuell gelebte Entwicklungsprozess basierend auf der Verfahrensanweisung „Design Control“ lehnt sich an das V-Modell der ISO 13485 an.

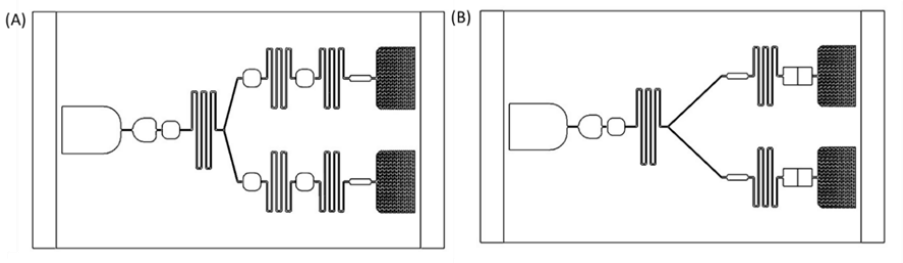

Abbildung 1: 3D-Zeichnung der im Projekt adressierten Mikrofluidiklayouts Konzept 1(A) und Konzept 2 (B).

Im Rahmen der Definition von Anforderungen an die Bewertung der Funktionalität des Gesamtsystems wurden geeignete Mess- und Prüfmethoden festgelegt, um die Übereinstimmung zwischen den Ist- und Sollwerten der verschiedenen Messkammergeometrien zu überprüfen. Dazu sollten abgeprägte Polycarbonat-Folien mittels Laser-Scanningmikroskopie vermessen werden, um präzise Geometriedaten zu erhalten. Ergänzend erfolgte eine visuelle Kontrolle der hergestellten Prägefolien nach der Trennung vom Abfallrand, wobei insbesondere die Eignung für die Weiterverarbeitung hinsichtlich Planarität, Welligkeit und möglicher Knicks bewertet wurde. Zudem wurde die korrekte Abdichtung der Messkammern durch visuelle oder mikroskopische Untersuchungen überprüft. Hierbei wurden Durchbrüche oder Leckagen einer gefärbten Modelllösung (Blood-Mimicking Fluid TL3, Joninn) nach dem Laminieren bzw. Bonding identifiziert, um die Integrität der Kammern sicherzustellen.
Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Flussgeschwindigkeit, zu den Inkubationszeiten und zum Abstoppen des Flusses durchgeführt werden. Hierfür sollen kinetische Analysen mittels Video-Lichtmikroskopie in Kombination mit gefärbten Messlösungen zum Einsatz kommen. Ergänzend sollten im Projektverlauf Videomikroskopie-Aufnahmen mit einer ereignisbasierten Kamera als neuartiges Analysewerkzeug etabliert werden, um die Flussdynamik detailliert zu erfassen. Zusätzlich sollten Fluoreszenzpartikel zur quantitativen Flussmessung eingesetzt werden, um präzise Aussagen über Strömungsprofile und Mischvorgänge zu treffen.

2.2 Simulation und Parametrisierung (AP 2)

Die multiskalige Simulation bildete das theoretische Rückgrat des Projekts. Neben experimentellen Untersuchungen wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt, um relevante physikalische und materialtechnische Parameter für die Modellierung zu bestimmen (Siebert & Fodor, 2009, Newtonian and Non-Newtonian Blood Flow over a Backward-Facing Step – A Case Study. Excerpt from the Proceedings of the COMSOL Conference 2009 Boston; Johnston *et al.*, 2004, Non-Newtonian blood flow in human right coronary arteries:steady state simulations. Journal of Biomechanics 37, 709–720; Fournier, 2017, Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering). Diese Werte bildeten die Grundlage für die anschließende multiskalige Simulation, die als theoretisches Rückgrat des Projekts diente. Gemeinsam mit den wissenschaftlichen Partnern wurden Materialparameter, Grenzflächeneigenschaften und Strömungscharakteristika erhoben und in die Modelle überführt. Besonders wichtig war dabei die Bestimmung der Viskosität und Oberflächenspannung des Plasmas im Vergleich zu Vollblut, um realistische Randbedingungen für die Simulation zu schaffen. Frühe experimentelle Untersuchungen mit dem sogenannten Doppelmesskammersystem zeigten, dass die Einlaufzeit des Plasmas im

Mittel 0,37 Sekunden betrug (siehe Abbildung 2). Dieses Ergebnis bestätigte die Eignung der gewählten Geometrien für rein kapillar getriebene Flüsse.

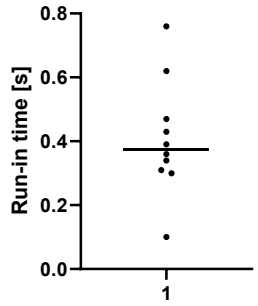

Abbildung 2: Lichtmikroskopische Bestimmung der Einlaufzeit für Blutplasma bei Verwendung des 2-Kammer-Messsystems (n = 10). Der Mittelwert wurde mit 0,37s bestimmt.

Zudem wurde der Einfluss der Probenmatrix Plasma auf die Leitfähigkeit (bei Bestimmung von Lactat mittels immobilisierter Lactatoxidase) im Vergleich zu Vollblut mit unterschiedlichen Hämatokrit-Werten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Plasma durch geringere Widerstandswerte und einhergehend mit höheren Ladungswerten im Vergleich zu Vollblut auszeichnet. Die Ergebnisse zeigen, dass Plasma als Probenmatrix zur elektrochemischen Biomarker-Detektion und dem gewählten Doppelmesskammersystem Anwendung finden kann.
Zusammenfassend liefern die gewonnenen Daten eine solide Grundlage für die Validierung und Parametrisierung der Simulationen und stellen sicher, dass die entwickelten Modelle realitätsnah die physikalischen Bedingungen abbilden. Für die Projektpartner bedeuten die Ergebnisse eine verbesserte Prognosefähigkeit der Modelle, eine gezieltere Optimierung mikrofluidischer Geometrien sowie eine fundierte Basis für die Weiterentwicklung sensorischer Systeme auf Plasmabasis.

2.3 Mikrostrukturierung und Heißprägeprozess (AP 3.3 und AP 5.2)

Im Rahmen des AP 3.3 wurde bei SensLab ein vorseriennaher Heißprägeprozess etabliert. Im Rahmen dieser Aktivität wurden erfolgreich mikrostrukturierte Polymerfolien für Module des LoC-Systems hergestellt. Da aufgrund eines technischen Defekts und der Sperrung der Laserabtragsanlage beim Partner Fraunhofer IWU bis Ende 2024 keine neuen Heißprägewerkzeuge zur Verfügung gestellt worden, wurden ausschließlich Einzelmodule (Einfachmesskammer und Zweifachmesskammer, siehe Abbildung 3), die bereits als Werkzeuge bei SensLab vorlagen, in einem vorseriennahen Heißprägeprozess realisiert. Diese Testformeinsätze wurden zunächst in Vorläufen eingefahren, um optimale Prozessparameter für das Heißprägen zu ermitteln. Anschließend wurden Polycarbonat-Folien (Makrofol® DE 1-1 000000, Dicke 250 µm, Covestro) mittels der SensLab-Heißprägeanlage (HEX02, Jenoptik) im Produktionsbereich mikrostrukturiert.

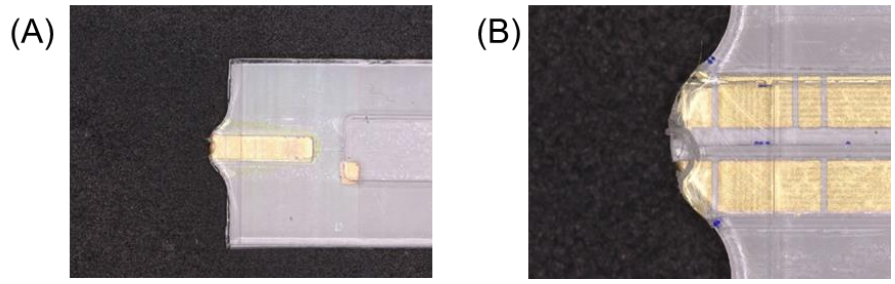

Abbildung 3: Darstellung des Einzelelements der (A) Einfachmesskammer und der (B) Doppelmesskammer auf einer Goldelektrodenstruktur.

Die Abprägungen zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit der Mikrostrukturen mit guter Übertragungspräzision. Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit der mikrostrukturierten Folien ergaben eine hohe Strukturtreue.

Nachdem die technischen Probleme beim Partner Fraunhofer IWU gelöst wurden und neue Heißprägewerkzeuge (siehe Abbildung 4) mit den komplexen Fluidikstrukturen zur Verfügung standen, wurden diese bei SensLab in einem vorserienahen Heißprägeprozess im Rahmen von AP 5.2 abgeprägt. Diese Testformeinsätze wurden zunächst in Vorläufen eingefahren, um optimale Prozessparameter für das Heißprägen zu ermitteln. Dabei wurde auf die Vorkenntnisse aus AP 3.3 zurückgegriffen und die dortige Parametrisierung weiter optimiert. Ein entscheidender Punkt bei der Anpassung war die Verwendung dickerer Polycarbonatfolien im Vergleich zu AP 3.3, auf welche die Parameter des Heißprägens angepasst werden mussten. Anschließend wurden Polycarbonat-Folien (Makrofol® DE 1-1 000000, Dicke 350 µm – 1000 µm, Covestro) mittels der SensLab-Heißprägeanlage (HEX02, Jenoptik) im Produktionsbereich mikrostrukturiert (siehe Abbildung 5).

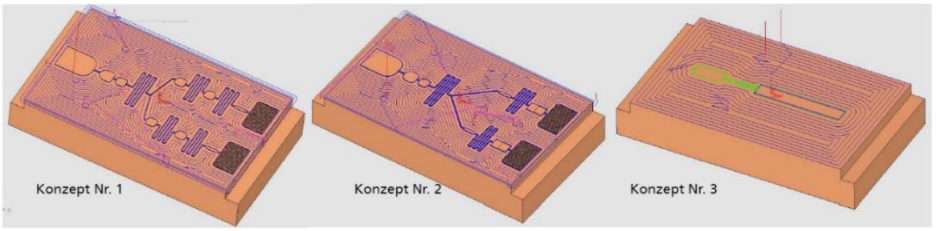

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Heißprägewerkzeuge, Konzepte 1 bis 3.

Abbildung 5: Mikrostrukturierte Polycarbonatfolien, Dicke 350 µm, Konzept 1, Konzept 2 und Konzept 3 (von links nach rechts).

Die Mikrostrukturen der Abprägungen der einzelnen Konzepte wurden mit einem 3D-Profilometer (Keyence) vermessen (beispielhafte Messaufnahme, siehe Abbildung 6). Dabei wurden akzeptable Höhendifferenzen der Messkammern bzw. Mikrostrukturen von 2-16 µm, 0-23 µm und 4-6 µm für Konzept 1, 2 bzw. 3 festgestellt. Die Oberflächenrauheit betrug im Mittel (über verschiedene Messstellen in der mikrostrukturierten Folie) ca. 2,5 bis 3,5 µm für die Konzepte 1-3.

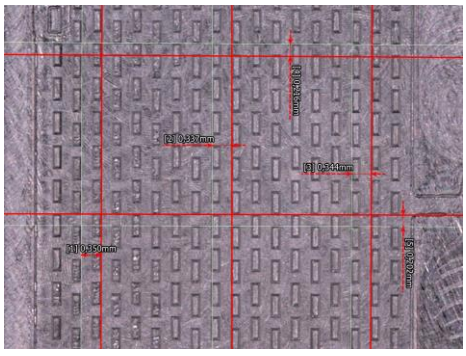

Abbildung 6: Beispielhafte Aufnahme und Vermessung der Kapillarpumpe mittels 3D-Profilometer.

Die abgeprägten Einzelmodule sowie die LoC-Konzepte wurden zu Sensorlösungen assembliert und im Rahmen von AP 3.5 für fluidische Charakterisierungen verwendet. Weiterhin wurden die Abprägungen auch vom Projektpartner TU Chemnitz zur Charakterisierung und Parametrisierung verwendet.

Für alle ausgewählten Strukturen (Einzelmodule Einfach- und Doppelmesskammer sowie LoC-Systeme Konzept 1-3) konnte erfolgreich ein vorseriennaher Heißprägeprozess zur

Erzeugung von mikrostrukturierten Polymerfolien bei SensLab etabliert werden. Die erzeugten Mikrofluidikfolien wurden in den weiteren AP (z. B. AP 3.5, AP 5 und AP 6) weiterverwendet.

2.4 Fluidische Charakterisierung und Validierung (AP 3.5)

Im Rahmen des Projekts wurde ein Messstand aufgebaut, der aus einer Event-basierten Kamera sowie einem Hellfeld- bzw. Fluoreszenzmikroskop besteht (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Dieser Messstand dient der detaillierten Charakterisierung des Partikel- und Flüssigkeitsverhaltens in den im Rahmen des Projektes untersuchten mikrofluidischen Systemen.

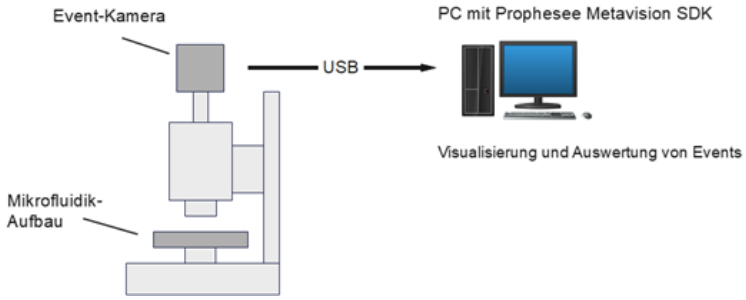

Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau für das Event-basierte Partikeltracking.

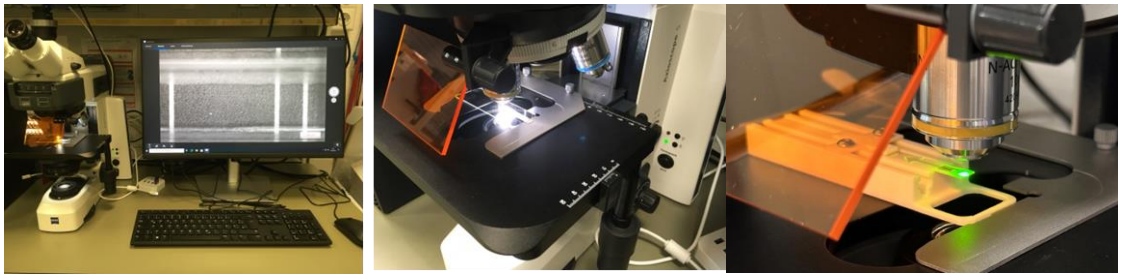

Abbildung 8: Messplatz mit Fluoreszenzmikroskop.

Der Ablauf zur Charakterisierung des fluidischen Verhaltens in Einzelkomponenten bzw. im Gesamtsystem ist in Abbildung 9 dargestellt.

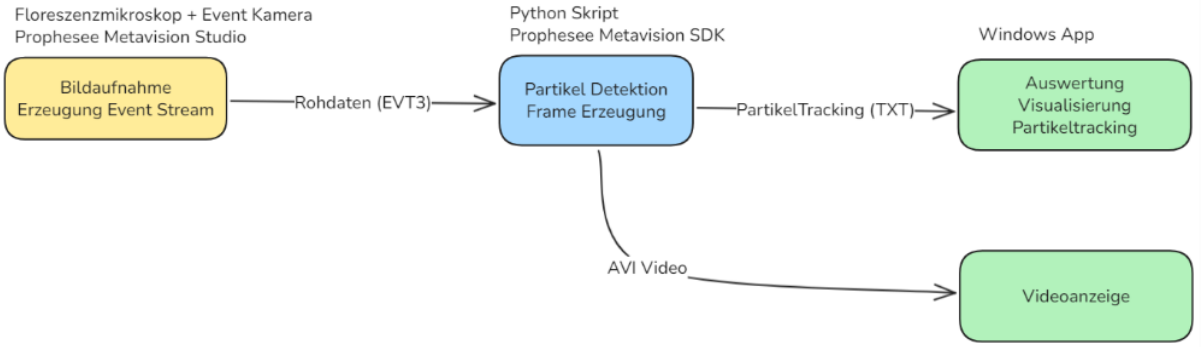

Abbildung 9: Übersicht des Ablaufs zur Charakterisierung des fluidischen Verhaltens.

Die Bildaufnahme und Erzeugung des Event-Streams erfolgt mithilfe einer Eventkamera des Typs Prophesee EVK4 HD mit Sony IMX636 Sensor, die über die Prophesee Metavision Studio Software via USB3-Schnittstelle angesteuert wird. Zur optimalen Scharfstellung wird die Fokussierung unter Einsatz eines Stroboskoplichts durchgeführt. Der Versuchsaufbau basiert auf einem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioscope 5, das mit einer Colibri-LED-Fluoreszenzlichtquelle betrieben wird. Je nach Versuch wird dabei grünes Licht (565 nm) oder blaues Licht (470 nm) zur Anregung der Fluoreszenzpartikel verwendet. Die Fixierung und Führung des Sensors wurden durch eine speziell angefertigte 3D-gedruckte Halterung sichergestellt. Für die Aufnahme wird die Sensorbefüllung mit einer präparierten Partikellösung durchgeführt, die fluoreszierende Partikel mit einem Durchmesser von 30 µm (Microparticles GmbH, Berlin) enthält. Diese Partikellösung wird in verschiedenen Verdünnungen (z. B. 1:5,

1:10) eingesetzt. Die dabei entstehenden Rohdaten werden im EVT3-Format gespeichert, einem binären Rohdatenformat für Ereignisdaten von Prophesee-Kameras. Die Detektion und das Tracking der Partikel erfolgen anschließend unter Verwendung des Metavision SDK. Dabei werden die Ereignisdaten mithilfe des Generic Tracking Algorithmus zusammen mit zusätzlichen Filtern (ActivityNoiseFilters und TrailFilterAlgorithmus) in Python verarbeitet. Die berechneten Partikelbahnen und Bewegungsdaten werden im CSV-Format abgespeichert. Zusätzlich werden aus den gewonnenen Ereignisdaten einzelne Frames generiert, die zur Erstellung einer Videodatei (AVI) dienen. Die Auswertung und Visualisierung der Partikeltracks erfolgt in einer eigens entwickelten Windows-Anwendung „TraceView“. Diese Software ermöglicht die Darstellung und Analyse der Trackingdaten sowohl für Einzelmessungen als auch für mehrere Messungen im Rahmen einer Batchauswertung. Darüber hinaus kann auf Basis der Trajektorien eine Stromlinienanalyse durchgeführt werden, um Strömungsprofile und Bewegungsmuster innerhalb des untersuchten Volumens zu visualisieren (siehe Abbildung 10).

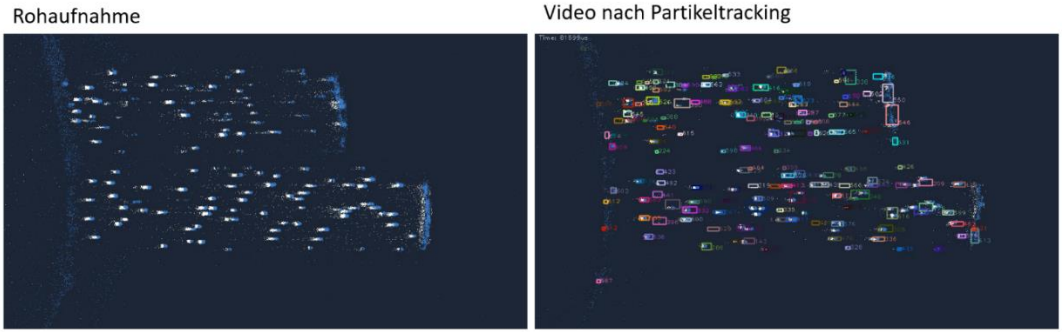

Abbildung 10: Rohaufnahme und Aufnahme nach Partikeltracking von Polystyrolpartikeln (Durchmesser 25 µm, Verdünnung 1:10) in der Doppelmesskammer der LoC-Anordnung.

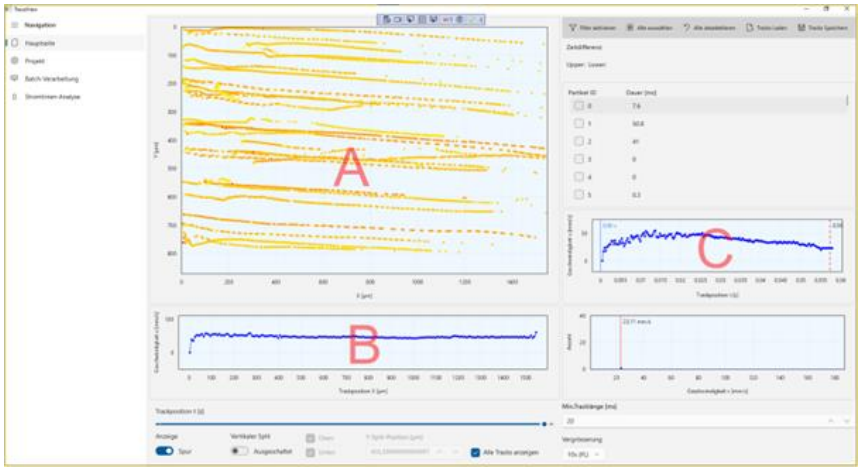

Abbildung 11: TraceView-App zum Partikeltracking mittels Event-basierter Kamera.

Die Einzelauswertung der Messdaten erfolgte mit der Software TraceView. Im Hauptfenster der Anwendung (siehe Abbildung 11) werden die detektierten Partikeltracks in einem x/y-Diagramm dargestellt, wobei die Färbung der Trajektorien die Geschwindigkeit der Partikel kennzeichnet (gelb = langsam, rot = schnell). Ergänzend dazu zeigt der Anzeigebereich (B) die mittlere Geschwindigkeit aller Partikel entlang der x-Achse, während der Bereich (C) die mittlere Geschwindigkeit über die Zeit t visualisiert.

Aus den erfassten Trajektorien wurde zusätzlich eine Stromlinienanalyse erstellt (siehe Abbildung 12), die die Fließrichtung und die Geschwindigkeitsverteilung der Partikel im Beobachtungsfeld anschaulich wiedergibt.

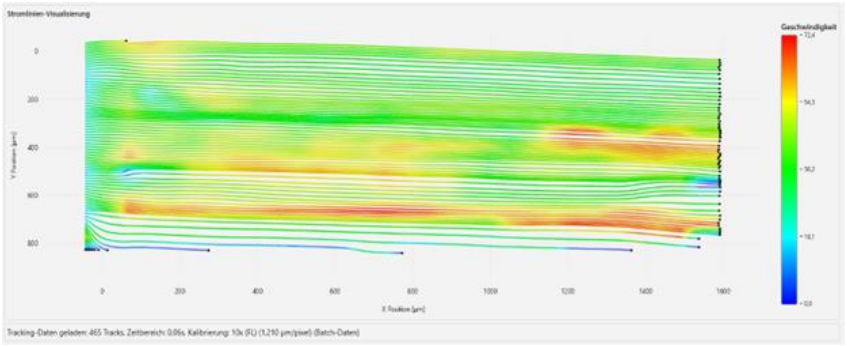

Abbildung 12: Stromlinien-Analyse für die Partikel Tracks einer Einzelmessung.

Für eine umfassendere Bewertung wurde eine Batchauswertung über insgesamt neun Einzelmessungen durchgeführt (siehe Abbildung 13). Dabei wurden sowohl die mittleren Geschwindigkeiten entlang der x-Achse (linke Darstellung) als auch die mittleren Geschwindigkeiten über die Zeit (rechte Darstellung) für alle Messungen verglichen. Die resultierenden Werte weisen eine gute Reproduzierbarkeit der Fließmuster innerhalb der Sensorstruktur auf. In der zusammengefassten Stromlinienanalyse der neun Messungen (siehe Abbildung 14) wird deutlich, dass der Flüssigkeitsstrom innerhalb des Elektrodenbereichs gleichmäßig und gerichtet verläuft. Lokale Abweichungen in der Geschwindigkeit deuten auf mikroskopische Inhomogenitäten in der Strömungsgeometrie oder auf Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Sensorelektrode hin.

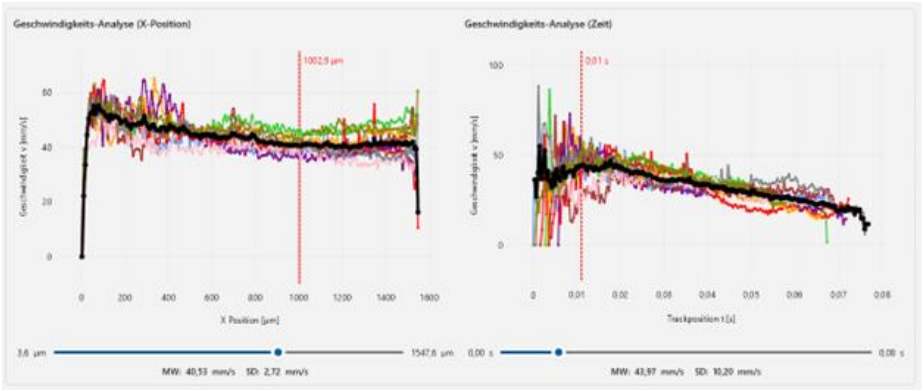

Abbildung 13: Batchauswertung mit TraceView-Software.

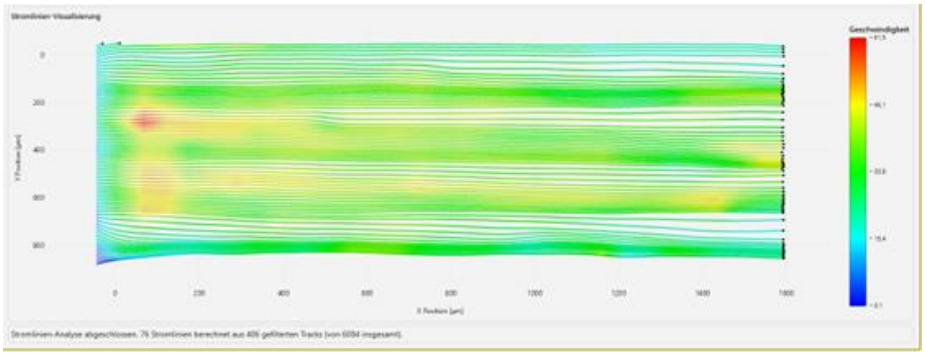

Abbildung 14: Stromlinien-Analyse für Partikel Tracks von 9 Messungen.

Mit dem aufgebauten Messstand wurden Messungen durchgeführt, um das Fließverhalten der Einzelkomponenten des LoC-Systems zu charakterisieren. Die Experimente erfolgten sowohl in Ein- als auch in Zweifachmesskammern, d. h. in relevanten in Einzelmodulen des Mikrofluidiksystems. Dabei wurde insbesondere der Einfluss unterschiedlicher Beschichtungen in den beiden Messkammern bzw. der Einfluss der Partikelgröße untersucht (siehe Tabelle 1 bis 3 und Abbildung 3 B).

Tabelle 1: Aufziehverhalten der Doppelmesskammer mit unterschiedlichen Beschichtungen auf den Goldelektroden (lsg1 = Lösung 1 bzw, RG/VL = Reagenzgemisch/ Verdünnungslösung) und bei Verwendung von Partikeln mit

einem Durchmesser von 25 µm und einer zehnfachen Verdünnung der Partikel in der Aufziehlösung.

	Befüllzeit oben [ms]	Befüllzeit unten [ms]	Befüllzeit gesamt [ms]	Fließgeschwindigkeit oben [mm/s]	Fließgeschwindigkeit unten [mm/s]
Variante 1 (lsg1/lsg1)	259,60	259,20	259,60	12,16	11,82
Variante 2 (RG/VL)	119,65	107,30	122,05	27,02	27,53

Tabelle 2: Aufziehverhalten der Doppelmesskammer mit unterschiedlichen Beschichtungen auf den Goldelektroden (lsg1 = Lösung 1 bzw, RG/VL = Reagenzgemisch/ Verdünnungslösung) und bei Verwendung von Partikeln mit einem Durchmesser von 50 µm und einer zehnfachen Verdünnung der Partikel in der Aufziehlösung.

	Befüllzeit oben [ms]	Befüllzeit unten [ms]	Befüllzeit gesamt [ms]	Fließgeschwindigkeit oben [mm/s]	Fließgeschwindigkeit unten [mm/s]
Variante 1 (lsg1/lsg1)	250,79	248,84	260,79	10,99	11,02
Variante 2 (RG/VL)	94,79	89,16	96,58	35,08	33,28

Tabelle 3: Aufziehverhalten der Doppelmesskammer mit identischen Beschichtungen auf den Goldelektroden beider Messkammern (ADL = RG = Reagenzgemisch, VL = Verdünnungslösung) und bei Verwendung von Partikeln mit einem Durchmesser von 50 µm und einer zehnfachen Verdünnung der Partikel in der Aufziehlösung.

	Befüllzeit oben [ms]	Befüllzeit unten [ms]	Fließgeschwindigkeit oben [mm/s]	Fließgeschwindigkeit unten [mm/s]
ADL / ADL	77,53	84,63	33,79	33,40
VL / VL	89,32	84,95	33,81	34,59

Die Ergebnisse zeigen, dass die Partikelgröße (25 vs. 50 µm) nur einen geringen Einfluss auf die Befüllzeit der oberen bzw. unteren Kammer und auf die Fließgeschwindigkeit hat. Dagegen ist ein deutlicher Unterschied der Befüllzeiten in Abhängigkeit der Beschichtungslösung zu sehen. Dies verdeutlich, dass die unterschiedliche Beschichtung der Oberflächen der Elektroden bzw. Reagenzreservoirs des LoC-Systems einen wichtigen Einfluss auf die Simulationsergebnisse haben wird. Die Fließgeschwindigkeiten der Partikel in mit RG bzw. VL beschichteten Messkammern sind mehr als doppelt so hoch wie in mit Lösung 1 beschichteten Messkammern.

Tabelle 4 zeigt die Befüllzeiten in einem weiteren Einzelelement, der Einzelmesskammer (siehe Abbildung 3 A).

Tabelle 4: Aufziehverhalten der Einfachmesskammer mit unterschiedlichen Beschichtungen auf den Goldelektroden (ADL02 = RG, VL81 = VL) und bei Verwendung von Partikeln mit einem Durchmesser von 50 µm und einer zehnfachen Verdünnung der Partikel in der Aufziehlösung.

	Befüllzeit [ms]	Fließgeschwindigkeit MW [mm/s]
ADL02	68,26	37,13
VL81	68,75	39,93

Die Befüllzeit der Einfachmesskammer ist etwas schneller im Vergleich zur Doppelmesskammer. Die Fließgeschwindigkeiten sind daher auch etwas höher als bei der Doppelmesskammer, aber dennoch in guter Übereinstimmung mit den Fließzeiten für die Doppelmesskammer aus Tabelle 2 für die vergleichbare Beschichtung RG/VL. Die höheren Fließgeschwindigkeiten sind mit der einfacheren Struktur der Einfachmesskammer (kein Widerstand durch Mittelsteg, kein Aufteilen in 2 Messkammern, weniger Oberfläche der Wandungen) zu erklären.

Analog zur Lichtmikroskopischen Untersuchung wurde die Methode für die Fluoreszenzmikroskopie weiterentwickelt. Zur Untersuchung des Fließverhaltens innerhalb der fluidischen Einzelmodule bzw. des Gesamtsystems wurde eine Partikellösung mit fluoreszierenden, roten Mikropartikeln (30 µm Durchmesser) in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte mit einem Zeiss Axioscope 5 Fluoreszenzmikroskop,

ausgestattet mit einer Colibri-LED-Fluoreszenzlichtquelle bei blauer Anregung (470 nm). Als Objektiv wurde ein ZEISS N-Achroplan 10x/0,25 M27 verwendet. Die Beobachtung erfolgte im Bereich der Arbeitselektrode des Sensors, wobei insbesondere das Einziehen der Partikellösung in den Sensorkanal erfasst wurde.
Die Eventkamera zeichnete während dieses Vorgangs den Event-Stream auf, woraus ein charakteristisches Bewegungsmuster der Partikel ersichtlich war. Ein einzelner Frame der Aufnahme (siehe Abbildung 15) zeigt mehrere sich bewegende Partikel, deren Bewegung der Fließrichtung der Lösung folgt.

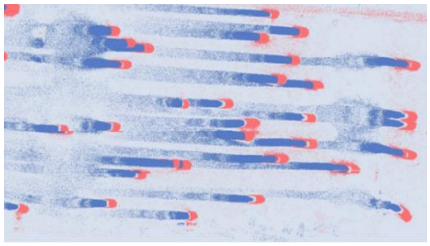

Abbildung 15: Einzelner Frame der Aufnahme der Eventkamera mit sich bewegenden Partikeln unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioscope 5.

Im Vergleich zur Licht-mikroskopischen Auswertung (siehe Abbildung 2) zeigt sich dabei der Vorteil der Verwendung des objektiven TraceView-Algorithmus gegenüber der subjektiven Einschätzung der Befüllzeit. Diese Erkenntnisse flossen direkt in die weitere geometrische Optimierung und die Validierung der Simulationsergebnisse ein.
Für die Einzelmodule der Konzepte 1 und 2 wurden die Durchflusszeiten bestimmt. Dabei wurde die mikrostrukturierte Polycarbonatfolie der Konzepte 1 und 2 mit einer hydrophilen Klebefolie (ARFlow) assembliert und anschließend in die in Abbildung 16 dargestellten Abschnitte geteilt. Die Tabelle 5 fasst die ermittelten Durchflusszeiten pro Einzelmodul zusammen. Aus den ermittelten Werten wird zum einen ersichtlich, dass die gemittelten Durchflusszeiten für analoge Einzelmodule (A, B, C, F und H) sehr ähnlich sind. Gleichzeitig wird ein Schwachpunkt der beiden Konzepte ersichtlich. Die Standardabweichung bei der Mehrfachbestimmung (n=5) ist für bestimmte Module sehr hoch (z. B. Einzelmodul B für beide Konzepte). Die hohen Standardabweichungen kommen durch eine optimierungsbedürftige Fluidikstruktur (Geometrien bestimmter Reagenzkammern) zustande, aber auch durch eine unzureichende Abdichtung der Fluidikstrukturen beim Bonding mit der Substratfolie.

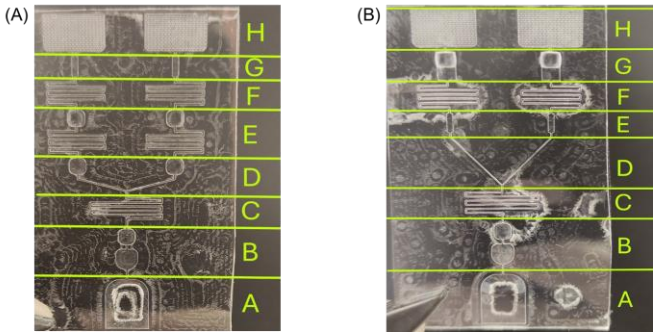

Abbildung 16: Unterteilung der Immunoassay-Konzept 1 (A) und 2 (B) in Einzelmodule.

2.5 Entwicklung des elektrochemischen Nachweissystems (AP 5.3)

Im Rahmen der fertigungstechnischen Realisierung des mikrofluidischen Gesamtsystems wurde ein elektrochemisches Indikationssystem entwickelt. Dies beinhaltete die Auswahl eines geeigneten Reporterenzyms, wobei die Wahl auf β-Galactosidase (β-Gal) fiel. Ein zentrales Arbeitspaket war die Entwicklung eines Protokolls zur kovalenten Konjugation von β-Gal an Antikörper. Dieses Protokoll wurde anschließend optimiert und final an den Projektpartner Roboscreen transferiert. Das Protokoll beinhaltet die Ausarbeitung der Schritte 1) Umpuffern der Antikörper-Lösung mit Zeba Spin-Säulchen, 2) Modifikation des Antikörpers mit dem bifunktionellen Linker sulfo-SMCC ((Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und 3) Konjugation von β-Galactosidase an SMCC-modifizierte Antikörper sowie zugehörige Konzentrationsberechnungen. Neben dem Protokoll zur kovalenten Konjugation wurde dem

Projektpartner Roboscreen auch ein Protokoll zur Überprüfung der Antikörper-β-Galactosidase-Konjugate zur Verfügung gestellt. Dieses Protokoll beinhaltet und beschreibt die Arbeitsschritte 1) Immobilisierung des Antigens an die Oberfläche der Mikrotiterplatte, 2) Blockierung mit Casein, 3) Zugabe Antikörper-β-Galactosidase-Konjugat, 4) Zugabe Substratlösung und 5) Stoppen der Reaktion und Auslesung mittels Mikrotiterplattenphotometer.

Für den “Biomarker proof of principle” im Rahmen des Projekts wurde ein Nachweis für humanes Prionprotein (PrionP) etabliert, das sich bei kognitiven Störungen im Blut verändert. Als Biomarker für eine Alzheimerdemenz wird das Mikrotubuli-bindende Protein Tau, das an Aminosäureposition 50 phosphoryliert ist, nachgewiesen (p50Tau, pTau). Dieser Biomarker zeigt bei Alzheimerpatienten signifikante Veränderungen im Hirn und ist sehr gut in Rückenmarksflüssigkeit nachweisbar. In der Vergangenheit wurde vom Projektpartner RoboScreen gezeigt, dass das Prionenprotein in Proben, die 1:10 verdünnt sind, sehr gut im Blutplasma in einem Bereich > 100 pg/ml im ELISA nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass bei einer Direktmessung des Plasmas, wie im Projekt vorgesehen, ca. 1 ng/ml nachweisbar sein müssen. p50Tau zeigte in Studien im Blutplasma bei Messung mittels ELISAs eine sehr gute Trennung zwischen Alzheimerpatienten und den Kontrollpatienten ohne kognitive Einschränkungen.

Zur Überprüfung der Funktionalität der von RoboScreen Anfang 2025 transferierten Antikörper-β-Galactosidase-Konjugate (AK-β-Gal-Konjugate) wurde ein direkter ELISA durchgeführt. Dabei wurden jeweils 100 ng des entsprechenden Antigens pro Well auf der Oberfläche einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer Verdünnungsreihe der AK-β-Gal-Konjugate. Die enzymatische Aktivität der β-Galactosidase wurde mithilfe des chromogenen Substrats ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (oNPG) (Sigma-Aldrich, Steinheim) kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm (Kompensationswellenlänge 620 nm) nachgewiesen.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigen beide getesteten Konjugate (PrionP- und pTau-spezifische Antikörper kovalent gekoppelt mit β-Gal) eine deutliche, konzentrationsabhängige Signalzunahme. Dies belegt, dass die β-Galactosidase-Konjugation erfolgreich war und die funktionelle Bindungsfähigkeit der Antikörper erhalten blieb. Auf Basis der erzielten Signalintensitäten wurden zur weiteren Verwendung Verdünnungen von 1:200 für das anti-PrionP-AK-β-Gal-Konjugat und 1:100 für das anti-pTau-AK-β-Gal-Konjugat als optimal festgelegt.

In einem weiteren Schritt wurden die von RoboScreen bereitgestellten Reagenzienkombinationen als vollständiges ELISA-System evaluiert. Hierzu wurden 2,5 µg/mL Fängerantikörper (anti-human PrP 3F3/1D9/D10 bzw. anti-human Tau 2B8) auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der jeweiligen Antigene (PrionP bzw. p50Tau), die an die immobilisierten Fängerantikörper binden konnten. Anschließend wurde die Platte gewaschen und mit dem entsprechenden AK-β-Galactosidase-Konjugat inkubiert (1:200 anti-human-Prion 15F5-β-Gal bzw. 1:100 anti-human-p50Tau 15E3-β-Gal). Nach einem weiteren Waschschritt zum Entfernen ungebundener Konjugate wurde die enzymatische Aktivität durch Zugabe des Substrats oNPG nachgewiesen. Die resultierende Farbreaktion wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm unter Verwendung einer Kompensationswellenlänge von 620 nm gemessen. Die in Abbildung 18 dargestellten Messkurven zeigen den Vergleich der Antigennachweise in Puffer und Plasma. Für das Antigen PrionP (Abbildung 18 A) ist ein leichter Matrixeffekt erkennbar, da die Signalintensität in Plasma geringfügig niedriger ausfällt als im Puffer. Dennoch zeigen beide Kurven einen vergleichbaren sigmoidalen Verlauf und bestätigen die Funktionsfähigkeit des Testsystems. Beim Nachweis von pTau (Abbildung 18 B) stimmen die Kurven für Puffer und Plasma nahezu vollständig überein, was auf eine robuste Assay-Performance und eine gute Matrixkompatibilität hinweist. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass beide ELISA-Systeme sowohl im Puffer- als auch im Plasmamilieu zuverlässig Antigenkonzentrationen im niedrigen ng/mL-Bereich erfassen. Die Nachweisgrenze für PrionP liegt dabei im diagnostisch

relevanten Bereich, während für pTau eine weitere Verbesserung der Sensitivität erforderlich ist, um Konzentrationen im pg/mL-Bereich sicher zu detektieren.

Tabelle 5: (A) Durchflusszeiten für die Einzelmodule aus Konzept 1 (A) und Konzept 2 (B).

(A)

Einzelmodul	Zeit t [s] (n = 5)
A	11 ± 1,3
B	136 ± 53,2
C	40 ± 11,4
D	120 ± 31,0
E	124 ± 29,4
F	53,4 ± 24,5
G	3,6 ± 1,0
H	24 ± 6,6

(B)

Einzelmodul	Zeit t [s] (n = 5)
A	9,8 ± 1,0
B	132,0 ± 37,1
C	35,0 ± 6,3
D	62,0 ± 14,4
E	3,6 ± 0,5
F	45,0 ± 6,3
G	112,0 ± 21,4
H	20,8 ± 3,4

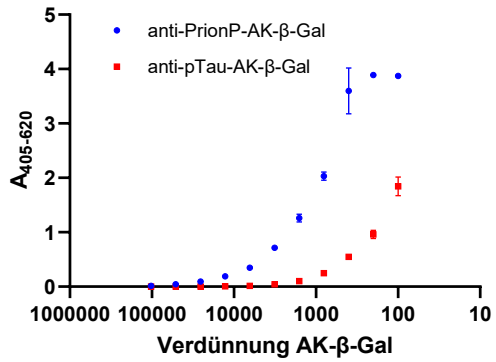

Abbildung 17: Überprüfung der Funktionalität der von RoboScreen transferierten Antikörper-β-Galactosidase-Konjugate mittels direktem ELISA. Auf der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 ng Antigen pro Well immobilisiert und eine Verdünnungsreihe der Konjugate inkubiert. Nach Zugabe des Substrats oNPG wurde die Produktbildung photometrisch ausgelesen. Dargestellt ist die Signalkurve ($A_{405-620}$) in Abhängigkeit von der Verdünnung. Sowohl das PrionP- (blau) als auch das pTau- (rot) spezifische Konjugat zeigen eine deutliche, konzentrationsabhängige Signalsteigerung, was die Funktionalität der Konjugate bestätigt.

Eine solche Optimierung der Nachweisgrenze könnte durch geeignete Probeaufbereitungstechniken, beispielsweise eine immunmagnetische Präkonzentration im Rahmen der Probenvorbereitung, erreicht werden. Die dargestellten Messkurven wurden mittels einer vierparametrischen, nichtlinearen Regressionsanalyse (4PL Fit) in GraphPad Prism ausgewertet. Auf Grundlage der durch Kurveninterpolation berechneten Werte wurden die Nachweisgrenzen (LOD) als Signal des Blanks plus dreifache Standardabweichung (Blank + 3 × SD) bestimmt. Aus den Abbildungen ergeben sich Nachweisgrenzen von 0,52 ng/mL (Puffer) bzw. 1,66 ng/mL (Plasma) für PrionP sowie 3,86 ng/mL (Puffer) und 4,17 ng/mL (Plasma) für pTau. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Assays eine gute Sensitivität aufweisen und der Einfluss der Matrix gering ist.

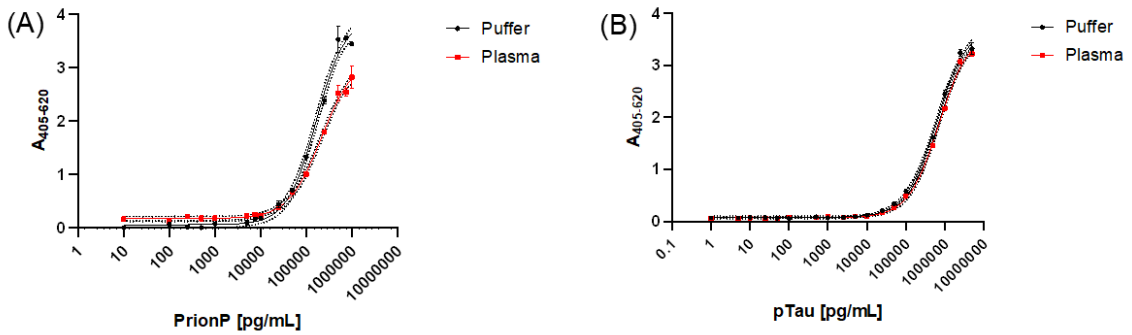

Abbildung 18: (A) Messkurven des PrionP-ELISA in Puffer (schwarz) und Plasma (rot). Beide zeigen eine konzentrationsabhängige Signalzunahme mit leichtem Matrixeffekt im Plasma. Die Kurven wurden mittels vierparametrischer, nichtlinearer Regressionsanalyse (4PL-Fit, GraphPad Prism) berechnet. Die Best-Fit-Parameter betragen für Puffer: Top = 3,961, Bottom = 0,059, IC_{50} = 1,66 × 10⁵ pg/mL, HillSlope = 1,353, R^2 =

0,9928; und für Plasma: Top = 3,206, Bottom = 0,177, IC_{50} = 2,14 × 10^5 pg/mL, HillSlope = 1,203, R^2 = 0,9949. (B) Messkurven des pTau-ELISA in Puffer (schwarz) und Plasma (rot). Beide Kurven zeigen eine konzentrationsabhängige Signalzunahme mit leichtem Matrixeffekt im Plasma. Die Kurven wurden mittels vierparametrischer, nichtlinearer Regressionsanalyse (4PL-Fit, GraphPad Prism) berechnet. Die Best-Fit-Parameter betragen für Puffer: Top = 3,745, Bottom = 0,078, IC_{50} = 5,99 × 10^5 pg/mL, HillSlope = 1,105, R^2 = 0,9974; und für Plasma: Top = 3,659, Bottom = 0,073, IC_{50} = 7,05 × 10^5 pg/mL, HillSlope = 1,116, R^2 = 0,9985.

Aufgrund des zeitlichen Verzugs (Werkzeugherstellung, Transfer der Reagenzchemie Anfang 2025) sowie der mit den AK-β-Gal-Konjugaten erzielten Nachweisgrenzen wurde im weiteren Verlauf mit dem PrionP-Assay weitergearbeitet. Die Implementierung dieses Assays in ein POCT-System erschien im Hinblick auf die oben beschriebenen Nachweisgrenzenanforderungen deutlich realistischer als für den pTau-Assay.
Zur Etablierung des elektrochemischen Nachweissystems erfolgte der Transfer auf ein magnetbasiertes Assay-Format. Hierzu wurden magnetische Beads (Dynabeads™ M-280, Tosyl-aktiviert, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit Fängerantikörpern funktionalisiert. Im Rahmen der Assayetablierung wurden Optimierungsversuche hinsichtlich der Pufferbedingungen und Inkubationsprotokolle durchgeführt, um Bindungseffizienz, Signalstärke und Reproduzierbarkeit des Assays weiter zu verbessern. Analog zum ELISA wurde ein Sandwich-Aufbau ausgebildet, bestehend aus immobilisiertem Fängerantikörper, Antigen und AK-β-Gal-Konjugat. Im Unterschied zum klassischen ELISA erfolgte dieser Aufbau jedoch in einem einzigen Reaktionschritt, was die gesamte Analysezeit auf lediglich 20 Minuten verkürzte.
Die Detektion erfolgte zunächst photometrisch, wobei die Ausleseparameter analog zum zuvor beschriebenen ELISA gewählt wurden. Dabei zeigte sich erneut ein geringer Matrixeffekt: In Gegenwart von Plasma lag die maximale Absorption etwas unter der im Puffer erzielten Signalhöhe. Die erzielten Nachweisgrenzen befanden sich für beide Matrizes im niedrigen ng/mL-Bereich und bestätigten die hohe Empfindlichkeit des magnetischen Systems.
Zusätzlich wurde eine elektrochemische Auswertung durchgeführt. Dabei kamen Gold-Dünnschicht-Sensoren (rev. 2.5, SensLab) zum Einsatz. Durch Zugabe des elektrochemisch inaktiven Substrats p-Aminophenyl-β-D-galactopyranosid (pAPG) (Sigma-Aldrich, Steinheim) erfolgte eine enzymatische Umsetzung zum elektroaktiven p-Aminophenol (pAP), welches amperometrisch detektiert werden kann. Die Messung wurde mittels Chronoamperometrie durchgeführt (Äquilibrierzeit: 5 s, Arbeitspotential E = 0,15 V, Messintervall: 1 s, Gesamtlaufzeit: 20 s). Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigen die Strom-Zeit-Kurven eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des gemessenen Signals. Mit steigender PrionP-Konzentration (0–50 ng/mL) nahm der gemessene Strom signifikant zu, was die erfolgreiche enzymatische Umsetzung und den quantitativen Zusammenhang zwischen Antigenkonzentration und elektrochemischem Signal bestätigt. Auch für den elektrochemischen Assay wurden im Vorfeld erfolgreich gezielte Optimierungsarbeiten vorgenommen: Mittels Cyclovoltammetrie wurde eine optimale Arbeitsspannung ermittelt, bei der das enzymatisch erzeugte pAP eine ausgeprägte anodische Stromantwort zeigte, während das Substrat pAPG keine elektrochemische Aktivität aufwies. Dadurch konnte der elektrochemische Nachweisweg eindeutig definiert und die Grundlage für eine empfindliche und spezifische elektrochemische Detektion geschaffen werden.

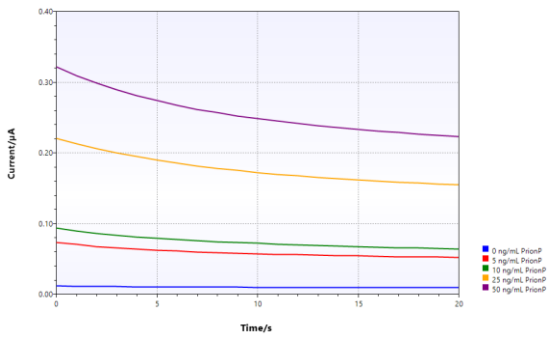

Abbildung 19: Chronoamperometrische Detektion verschiedener PrionP-Konzentrationen (0–50 ng/mL) auf Gold-Dünnschicht-Sensoren (rev. 2.5, SensLab) mit dem PalmsSens4-Potentiostat. Messparameter: Technik: Chronoamperometry; t_{eq} = 5 s; E_{dc} = 0,15 V; $t_{interval}$ = 1 s; t_{run} = 20 s. Mit steigender PrionP-Konzentration nimmt der gemessene Strom zu und zeigt eine charakteristische zeitabhängige Abnahme infolge des Verbrauchs des

elektroaktiven Produkts p-Aminophenol.

2.6 Systemintegration (AP 5.4)

Die finale Integration des Gesamtsystems konnte aufgrund der temporären Sperrung der Laserabtragsanlage erst Anfang 2025 begonnen werden. Nach Wiederinbetriebnahme wurden die neuen Heißprägeeinsätze gefertigt, sodass die Assemblierung des kompletten mikrofluidischen LoC-Systems mit allen funktionalen Ebenen fortgesetzt werden konnte.
Die Assemblierung umfasst das Laminieren der mikrostrukturierten Folien mit den funktionalisierten Elektroden mittels lasergeschnittener doppelseitiger Klebefolie, die Abdichtung der Fluidikkanäle und die Integration von Zu- und Ablaufstrukturen mittels einer einseitigen hydrophilen Klebefolie. Abbildung 20 zeigt schematisch den Aufbau des LoC-Systems. Der Transfer der finalen Nachweisreagenzien vom Partnerunternehmen Roboscreen zu SensLab wurde im ersten Quartal 2025 vollzogen. Anschließend erfolgte die vollständige Assayetablierung und die Validierung des Gesamtsystems bei SensLab.

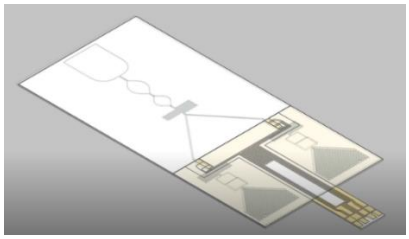

Abbildung 20: Schematischer Aufbau des im Projekt etablierten LoC-Systems.

Da der Reagenzientransfer erst spät im Projekt erfolgte, entwickelte SensLab die Prozesskette zur elektrochemischen Nachweisreaktion zu Beginn des Projekts mit Modellreagenzien, um anschließend einen effizienten Transfer auf die angestrebten Assayreagenzien bewerkstelligen zu können. So wurde die Immobilisierung von Biochemikalien auf Dünnschicht-gesputterten Goldelektroden mit Modellreagenzien etabliert. Als Modellreagenzien wurden die Proteine Streptavidin oder ein biotinylierter anti-Maus Immunoglobulin G (IgG)-Antikörper verwendet. Die Dispensierprozedur mit dem bei SensLab verfügbaren Präzisionsdispenser wurde so angepasst, dass 100 nL der Proteinlösung (2,5 µg/mL Streptavidin bzw. IgG-bio in 1x PBS (pH 7,4)) mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 3 mm/s auf die Goldnutzen dispensiert wurden. Diese optimierten Parameter ermöglichten eine ortsspezifische Beschichtung der Arbeitselektrode (siehe Abbildung 21). Anschließend wurde der komplette Goldnutzen mit Trehalose/Magermilchpulver/PBS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Bindungsreaktionen zu vermeiden.
Die erfolgreiche Immobilisierung der Biochemikalien konnte nach Assemblierung des Sensorsystems zum LoC-System (Laminierung des dispensierten Goldnutzens mit doppelseitiger Klebefolie und abgeprägten Mikrofluidikfolien der Einzelmodule) nachgewiesen werden.

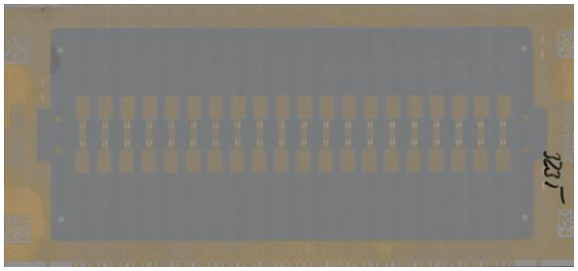

Abbildung 21: 40er-Goldnutzen (Au rev. 1.50, PVD-Sputtering der Goldschicht, Substrat Melinex® 329 mit 250 µm Dicke, Laserstrukturierung der Elektrodenstrukturen, Isolack (Weißlack) mittels Siebdruck durch SensLab aufgebracht) mit 100 nL Proteinlösung (2,5 µg/mL Streptavidin bzw. IgG-bio in 1x PBS (pH 7,4)) auf den beiden Arbeitselektroden einer Zweifachmesskammer.

Die mit Streptavidin-beschichteten und blockierten Sensoren wurden im zweiten Schritt für 10 min bei Raumtemperatur mit biotinylierter β-Gal (Roche, Mannheim; Biotinylierung mittels EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und Aufreinigung mittels

Zeba Desalt Spin Columns, 7 MWCO (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Sensors erfolgte die elektrochemische Detektion der mittels Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung immobilisierten β-Gal durch Zugabe des Substrats pAPG. Das Produkt pAP wird an der Arbeitselektrode amperometrisch detektiert. Abbildung 22 zeigt die gemessene Ladung nach Applikation unterschiedlicher Verdünnungen an biotinylierter β-Gal in Assay-Puffer. Die höchste Signalstärke erhält man mit einer wenig verdünnten Enzymlösung (2-fach), während bereits bei 10-facher Verdünnung stark abfällt. Bei 50-facher Verdünnung erhält man Signale ähnlich der Negativkontrolle.
Die Abhängigkeit der Signalstärke von der Inkubationszeit mit dem Substrat pAPG ist in Abbildung 23 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bereits nach ca. 1-2-minütiger Inkubationszeit ein maximales Ladungssignal generiert wird. Eine längere Inkubationszeit (≥ 5 min) bringt keinen signifikanten Signalanstieg mehr mit sich.
Zur weiteren Optimierung und Erhöhung der Immobilisierungseffizienz wurde neben der oben beschriebenen Immobilisierungsprozedur für Streptavidin eine weitere Variante der Immobilisierung untersucht. Dabei wurde in einem ersten Schritt 4 mg/mL DSP (Dithiobis(succinimidyl propionat), Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in DMSO auf die Elektroden des Goldnutzes aufgebracht und für 40 min inkubiert.

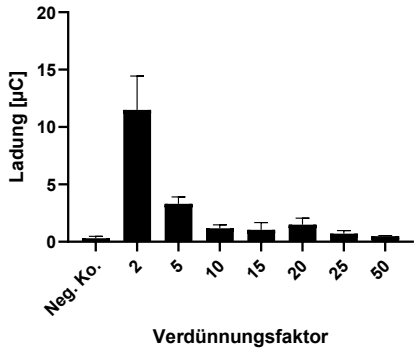

Abbildung 22: Elektrochemischer Nachweis von biotinylierter β-Galactosidase mittels Streptavidin-beschichteter Sensoren. Unterschiedliche Verdünnungen an biotinylierter β-Galactosidase in Assay-Puffer wurden auf dem assemblierten Sensor appliziert. Als Negativkontrolle (Neg. Ko.) wurde lediglich Assay-Puffer verwendet. Die Ladung [µC] wurde für 3 s in einem 10s-Detektionsprogramm zwischen der 7. und 10. s bei einer Polarisationsspannung von 175 mV gemessen (n = 2).

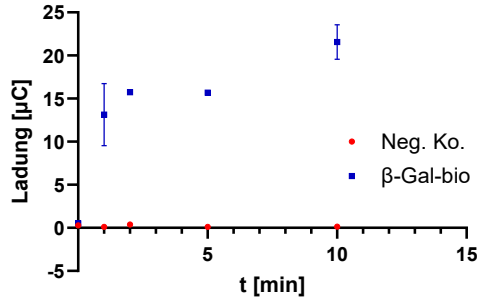

Abbildung 23: Abhängigkeit der Signalstärke (Ladung [µC]) von der Inkubationszeit des Substrats pAPG nach Bildung des Streptavidin-Biotin-β-Galactosidase-Komplexes. Die blauen Vierecke stellen dabei die Anwendung einer 2-fach in Assay-Puffer verdünnten biotinylierten β-Galactosidase dar, die roten Punkte stellen die Negativkontrolle dar (n = 2). Die Ladung [µC] wurde für 3 s in einem 10s-Detektionsprogramm zwischen der 7. und 10. s bei einer Polarisations-spannung von 175 mV gemessen.

Nach Spülen mit DMSO und Reinstwasser wurde dann wie oben beschrieben 100 nL 2,5 µg/mL Streptavidin in 1x PBS (pH 7,4) auf die Arbeitselektroden dispensiert. DSP ist ein homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimid-Ester-Crosslinker, der nach Thiol-Spaltung freie Thiolgruppen aufweist und somit auf Goldelektroden bindet. Die NHS-Gruppen reagieren dann mit Aminogruppen des zu immobilisierenden Proteins. Durch diese kovalente Immobilisierungsmethode sollte eine höhere Immobilisierungseffizienz erreicht werden. Insgesamt zeigten sich mit dieser Immobilisierungsmethode aber geringere Signalstärken im Vergleich zur oben beschriebenen Adsorptionsmethode. Für die 2-fach Verdünnung ergab

sich beispielsweise für die Methode mit DSP ein Signal von 6,56 ± 1,82 µC, während die oben beschrieben Adsorptionsmethode in einem Signal von 11,50 ± 2,95 µC (siehe Abbildung 22) resultierte. Ein ähnliches Bild ergab sich für die 5-fach Verdünnung: Das Signal für die DSP-Methode betrug 2,27 ± 0,35 µC, das Signal für die Adsorptionsmethode 3,32 ± 0,59 µC. Aufgrund der höheren Signalstärke und somit der besseren Immobilisierungseffizienz als auch des einfacher durchzuführenden Beschichtungsprotokolls wurde daher im weiteren Projektverlauf die einfachere Adsorptionsmethode angewandt.
Neben dem Modellreagenz Streptavidin wurde mit der oben optimierten Prozedur auch biotinyliertes IgG (IgG-bio) zur Immobilisierung auf der Goldelektrode verwendet. In einem zweiten Schritt wurde dann ein β-Gal-Streptavidin-Konjugat angebunden und die Anwesenheit des Enzyms β-Gal wurde elektrochemisch wie oben beschrieben nachgewiesen. Zur Stabilisierung des Antikörpers auf der Elektrodenoberfläche wurde BSA zugesetzt. Zudem wurden unterschiedliche Konzentrationen (2,5; 25; 250 µg/mL) an IgG-bio für die Immobilisierung getestet. Letztlich konnte die erfolgreiche Immobilisierung von IgG-bio durch den elektrochemischen Nachweis von β-Gal gezeigt werden (siehe Abbildung 24). Im Vergleich zu den erzielten Signalgrößen mit immobilisiertem Streptavidin sind die Signalstärken für immobilisiertes IgG-bio aber um etwa den Faktor 10 geringer. Auch ein Zusatz von BSA oder die Erhöhung der IgG-Konzentration hat keinen positiven Einfluss auf die Signalstärke.

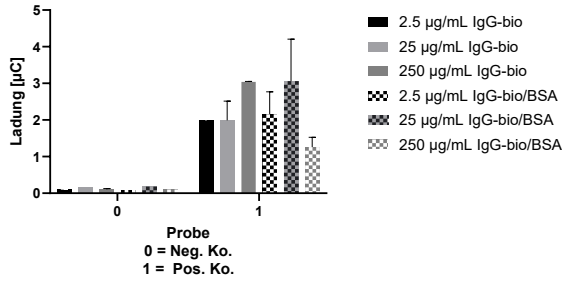

Abbildung 24: Elektrochemischer Nachweis von β-Gal mittels IgG-bio-beschichteter Sensoren. Zweifach verdünntes Streptavidin-β-Gal-Konjugat (Roche, Mannheim) in Assay-Puffer (Pos. Ko.) bzw. ausschließlich Assay-Puffer (Neg. Ko.) wurde auf dem assemblierten Sensor appliziert. Die Sensoren waren mit 2,5 µg/mL (schwarze Balken), 25 µg/mL (hellgrau Balken) bzw. 250 µg/mL IgG-bio (dunkelgraue Balken) beschichtet. Zusätzlich wurde BSA zur Immobilisierung beigesetzt (Balken mit Karomuster). Die Ladung [µC] wurde für 3 s in einem 10 s-Detektionsprogramm zwischen der 7. und 10. s bei einer Polarisationsspannung von 175 mV gemessen (n = 2).

Zur Untersuchung der Fluidikeigenschaften des mikrofluidischen Systems wurden die Durchflusszeiten für Plasma und eine Blutäquivalentflüssigkeit (Blood-Mimicking Fluid, TL3; Joninn, Gørløse, Dänemark) bestimmt. Für Konzept 1 konnte bei Verwendung von Plasma kein reproduzierbarer Durchfluss detektiert werden, während mit der Blutäquivalentflüssigkeit eine mittlere Durchflusszeit von 574 ± 145 s erzielt wurde. Das Konzept 2 zeigte deutlich verbesserte Strömungseigenschaften mit mittleren Durchflusszeiten von 314 ± 58 s für Plasma und 328 ± 82 s für die Blutäquivalentflüssigkeit.
Die beobachteten Streuungen der Messwerte deuten auf Fluidikinhomogenitäten innerhalb der Mikrostruktur hin. Hauptursache hierfür ist die Luftblasenbildung in den Mikrofluidikkammern, die zu ungleichmäßigen Strömungsverläufen und temporären Flussunterbrechungen führt. Insbesondere die vermehrte Luftblasenbildung in Reagenzkammer 1 konnte durch die Modellierungsergebnisse des Partners TUC bestätigt werden. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Dichtung des Systems nicht in allen Bereichen vollständig gewährleistet ist. In einzelnen Fällen konnte das Eindringen von Flüssigkeit in Randzonen beobachtet werden, was auf eine nicht optimale Abdichtung der Mikrokanäle hinweist. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die derzeitige Fluidikgestaltung noch nicht hinreichend reproduzierbar ist. Die großen Schwankungen der Durchflusszeiten verhindern aktuell eine stabile und reproduzierbare Durchführung des Assays. Eine Optimierung der Mikrofluidik und

Dichtungskonfiguration ist daher notwendig, um konstante Strömungsbedingungen und eine zuverlässige Assaydurchführung zu gewährleisten.

2.7 Charakterisierung des Demonstrators (AP 6)

Im abschließenden Arbeitspaket zur analytischen Charakterisierung des LoC-Systems wurde die Funktionalität des entwickelten mikrofluidischen Systems zur Detektion von Prion-Proteinen (PrionP) untersucht. Das System besteht aus einem kompakten Labor-Messgerät mit integrierter Auswerteelektronik (Eigenbau SensLab) sowie einem mikrostrukturierten LoC-System, auf der die Reaktionen stattfinden (siehe Abbildung 20). Für die Analytik wurden magnetische Beads (MNB) mit biotinylierten anti-PrionP-Antikörpern eingesetzt, die wie oben bereits beschrieben zusammen mit einem enzymgekoppelten Antikörperkonjugat (Anti-PrionP-β-Gal) und einem Substrat (pAPG) verwendet wurden. Die Messung erfolgte elektrochemisch bei einer Polarisationsspannung von 150 mV, mit einer Integrationszeit von 5 s innerhalb einer Gesamtmesszeit von 20 s.
Die Kalibrierkurve zeigt eine deutliche Signalzunahme in Abhängigkeit von der PrionP-Konzentration sowohl in Puffer als auch in Plasma, wobei im Plasma eine geringere Signalintensität beobachtet wurde. Es konnte eine Empfindlichkeit im niedrigen ng/mL-Bereich erreicht werden, was die prinzipielle Eignung des Systems für den Nachweis geringer Analytkonzentrationen bestätigt (siehe Abbildung 25).
Insgesamt wurde die grundsätzliche Funktionalität des LoC-Systems erfolgreich demonstriert. Allerdings zeigte sich, dass die Messzeiten mit ca. 3 bis über 7 Minuten noch zu sehr schwanken. Die Anforderung an eine Assayzeit <12 min aus AP 1 wird aber eindeutig erfüllt. Auch hinsichtlich Probenvolumen erfüllt das LoC-System (Konzept 2) die Anforderung <20 µL. Zudem war die Reproduzierbarkeit der Messungen derzeit unzureichend, was auf Optimierungsbedarf bei der Prozessstabilität und beim Mikrofluidiklayout hinweist.

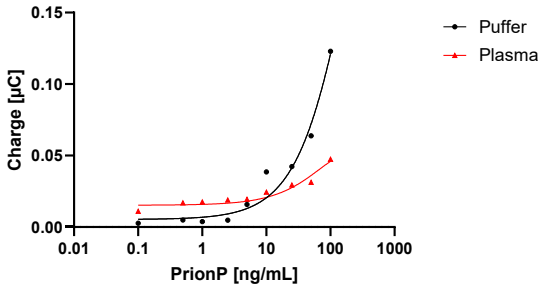

Abbildung 25: Elektrochemische Detektion von Prion-Protein (PrionP) auf dem LoC im Vergleich zwischen Puffer- (●) und Plasmaproben (▲). Dargestellt ist die Ladung (Charge [µC]) in Abhängigkeit von der PrionP-Konzentration bei einer Polarisationsspannung von 150 mV, einer Messzeit von 20 s und einer Integrationszeit von 5 s. Während im Puffer ein deutlich stärkerer Signalanstieg beobachtet wurde, zeigte Plasma aufgrund matrixbedingter Effekte eine geringere Sensitivität und einen höheren Hintergrund.

Basierend auf den vorangegangen experimentellen Ergebnissen und den Resultaten aus der Modellierung beim Projektpartner TUC wurden optimierte Mikrofluidiklayouts abgeleitet. Diese wurden in ein Werkzeugkonzept umgesetzt (siehe Abbildung 26), konnten aber im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr evaluiert werden.
Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Integration von mikrofluidischen Prozessen und elektrochemischen Nachweisverfahren in ein kompaktes, kapillargetriebenes LoC-System technisch realisierbar ist. Die erfolgreiche Etablierung reproduzierbarer Heißprägeprozesse, die Validierung der Fluidik durch Echtzeit-Messungen sowie die Funktionsfähigkeit der elektrochemischen Detektion bilden eine solide Grundlage für eine spätere Produktentwicklung. Besonders hervorzuheben ist der signifikante Einfluss der Oberflächenbeschichtung auf das Strömungsverhalten (sowohl für das LoC-System selbst als auch für die Validität der Modellierungsergebnisse). Diese Erkenntnis trägt wesentlich dazu bei, die Parameter für die Herstellung von Mikrofluidiksystemen gezielt zu kontrollieren und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Es hat sich gezeigt, dass die Kombination aus

Simulation und experimenteller Charakterisierung eine deutliche Reduktion von Entwicklungszyklen ermöglicht.
Mit der TraceView-Software wurde ein leistungsfähiges Werkzeug geschaffen, das auch über das Projekt hinaus für die Analyse mikrofluidischer Systeme genutzt werden kann. Die enge Verzahnung zwischen Simulation, Fertigung und experimenteller Validierung stellt ein zukunftsweisendes Entwicklungsmodell dar.

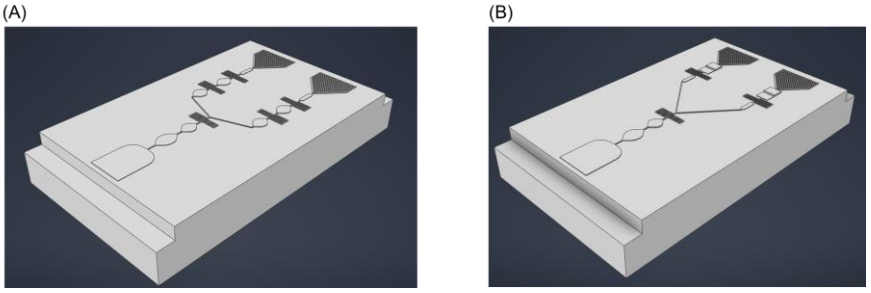

Abbildung 26: Schematische Darstellung der Heißprägewerkzeuge für das optimierte Konzept 1.1 (A) und 2.1 (B).

Der abschließende Meilenstein, die finale Charakterisierung des Funktionsdemonstrators und die funktionsfähige Umsetzung des LoC-Systems konnte aufgrund der beschriebenen Verzögerungen nicht erreicht werden.
Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und Prozesse bieten eine breite Grundlage für zukünftige Entwicklungen im Bereich Point-of-Care-Diagnostik. Durch die Skalierbarkeit des Fertigungskonzepts kann die Technologie auf weitere Biomarker und Krankheitsbilder übertragen werden. Für die Nachprojektphase ist vorgesehen, das optimierte Fluidiklayout bei SensLab zu testen, weiter zu optimieren und die Umsetzung in ein robustes und funktionsfähiges LoC-System zu erreichen. Langfristig soll das entwickelte LoC-System als flexible Plattform dienen, die unterschiedliche immunchemische Nachweise ermöglicht und eine Brücke zwischen Labor- und patientennaher Diagnostik schlägt.

3. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Rahmen der Projektdurchführung entstanden Kosten in den Kategorien Personal-, Reise-, Material- sowie sonstige Kosten. Diese sind im zahlenmäßigen Nachweis des Verwendungsnachweises detailliert aufgeführt. Zur Realisierung der Analysen mittels der neu eingeführten Event-basierten Kamera war ein erhöhter Personaleinsatz erforderlich, insbesondere für die Entwicklung und Implementierung der TraceView-Anwendung zur Datenverarbeitung und Visualisierung. Dieser zusätzliche Aufwand kompensierte den reduzierten Personaleinsatz in den noch ausstehenden Arbeiten zur vollständigen Charakterisierung des finalen LoC-Systems. Der Mehraufwand war notwendig, um die geplante Methodenetablierung im Projektzeitraum sicherzustellen und die Validierungsdaten für die Fluidikanalyse zu generieren. Während der Projektlaufzeit wurden Investitionen in ein Fluoreszenzmikroskop Axioscope 5 (Zeiss, Oberkochen) sowie in eine Event-basierte Kamera (Prophesee, Paris, Frankreich) getätigt. Beide Geräte wurden ausschließlich für die im Projekt durchgeführten Arbeiten eingesetzt. Die vom Projektpartner Fraunhofer IWU an die SensLab GmbH transferierten Testwerkzeuge für den mikrofluidischen Immunoassay werden auch nach Abschluss des Projekts zu Forschungszwecken weiterverwendet. Für die zukünftige Produktentwicklung müssen diese jedoch optimiert und daher neu angefertigt werden.

4. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die enge Zusammenarbeit mit den Partnern Fh IWU, TUC und Roboscreen war für die Herstellung, Integration und Validierung der mikrofluidischen, simulativen und bioanalytischen Komponenten des Systems entscheidend.
Das Fh IWU stellte die Heißprägewerkzeuge für die mikrostrukturierten Folien mit komplexen Fluidikstrukturen bereit und unterstützte bei der Prozessetablierung für das Prägen und die Fertigung der Polymerfolien. Die TUC war für die numerische Simulation und Modellierung der

kapillarkraftgesteuerten Strömungsvorgänge verantwortlich. Durch multiphysikalische Modellierung und Parametrisierung der Fluidikgeometrien konnten wesentliche Erkenntnisse zur Optimierung der mikrofluidischen Layouts gewonnen und experimentell validiert werden. Roboscreen entwickelte und charakterisierte die antikörperbasierten Nachweisreagenzien und stellte AK-β-Gal-Konjugate gemäß einem bei SensLab etabliertem Protokoll für das elektrochemische Nachweissystem bereit.

Das durchgeführte Förderprojekt leistete einen wesentlichen Beitrag zur Untersuchung der Machbarkeit kapillarkraftgesteuerter Point-of-Care-Diagnostiksysteme für die Detektion von Alzheimer-Biomarkern. Im Rahmen der Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus mikrostrukturierten Polymerfolien, elektrochemischer Detektion und enzymgekoppelten Immunoassays grundsätzlich geeignet ist, um komplexe biochemische Reaktionsabläufe in einem vollständig autarken LoC-System abzubilden. Damit wurde die technische Machbarkeit eines integrierten mikrofluidischen Gesamtsystems erfolgreich nachgewiesen.

Allerdings zeigte sich im Projektverlauf, dass zur Erreichung einer reproduzierbaren und unter PoC-Bedingungen verlässlichen Anwendung noch Optimierungen erforderlich sind. Dies betrifft insbesondere die Fluidikgeometrien im Bereich der Messkammern sowie das reproduzierbare Bonding mit den entsprechenden Substratfolien. Diese Parameter sind entscheidend für eine robuste Serienfertigung und eine spätere Produktzulassung.

Die wissenschaftlich-technischen Risiken lagen dabei in mehreren Teilprojekten, sodass einzelne Verzögerungen und apparative Engpässe den Gesamtfortschritt beeinflussten. Im Arbeitspaket 3 kam es durch einen technischen Defekt an der Laserabtraganlage des Projektpartners Fh IWU zu erheblichen Verzögerungen. Die Fehlersuche und Wiederinbetriebnahme der Anlage in Zusammenarbeit mit dem Hersteller führten zu einer zeitlichen Verschiebung der Werkzeugherstellung. Dadurch verzögerten sich nachfolgend auch die fertigungstechnische Umsetzung und Bewertung der Einzelstufen (AP 3) sowie die Realisierung und Charakterisierung des mikrofluidischen Gesamtsystems (AP 5 und AP 6).

Da die neuen Testformeinsätze nicht rechtzeitig zur Verfügung standen, nutzten SensLab und die Projektpartner zur Risikominderung bereits vorhandene Formeinsätze für die Weiterentwicklung des Simulationsmodells. Die eigentlichen Heißprägeexperimente (AP 3.3) konnten jedoch erst Anfang 2025 beginnen. Infolgedessen verzögerte sich auch die Etablierung des mikrofluidischen Gesamtsystems und des Nachweissystems für Alzheimer-Biomarker (AP 5.3), da notwendige Mikrofluidikfolien fehlten. Ebenso konnte die Assemblierung des Lab-on-a-Chip-Systems (AP 5.4) nicht abgeschlossen werden. Die Nachweisreagenzien wurden durch RoboScreen erst im Februar 2025 an SensLab übergeben, da die Assayetablierung ohne funktionsfähige Mikrofluidik nicht möglich war. Trotz dieser Verzögerungen wurden grundlegende Aspekte der Assayetablierung im Projektverlauf mit Modellreagenzien erfolgreich erprobt und die Ergebnisse in der verbleibenden Projektlaufzeit erfolgreich auf den Nachweis von PrionP transferiert. Aufgrund der Verzögerungen konnten jedoch die vollständige experimentelle Validierung und Optimierung des LoC-Gesamtsystems sowie die abschließende Charakterisierung des Demonstrators nicht vollständig erreicht werden. Da das Vorhaben inhaltlich und technologisch von allen Partnern als zukunftsweisend und nachhaltig bewertet wird, ist vorgesehen, die ausstehenden Arbeitspakete zur vollständigen Systemintegration und analytischen Leistungsbewertung nach Projektende bei SensLab fortzuführen.

Im Ergebnis der Projektarbeiten wurde eine vollständige Spezifikation der mikrostrukturierten Fluidikelemente, der biochemischen Nachweisarchitektur sowie der modellbasierten Designparameter erstellt. Neue Sensordesigns wurden entwickelt, mikrofluidisch validiert und erfolgreich elektrochemisch getestet. Die β-Gal-basierte Detektion konnte als robustes, störungsunempfindliches und reproduzierbares Verfahren etabliert werden. Darüber hinaus wurde ein kapillarkraftgetriebenes Assaykonzept fertiggestellt, das als Grundlage für die weitere Optimierung der Werkzeugfertigung dient. Zusammenfassend, bilden die erzielten Ergebnisse die technologische Basis für zukünftige PoC-Systeme und belegen die prinzipielle Übertragbarkeit der entwickelten Nachweiskonzepte auf weitere Biomarkeranwendungen. Zudem belegen sie das Potenzial, durch simulationsbasierte Ansätze Entwicklungszyklen zu verkürzen und Investitionen in Replikationswerkzeuge gezielter sowie auf Basis von Modellierungsergebnissen tätigen zu können.

5. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planung für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschrittenen Verwertungsplans

Die im Rahmen des Vorhabens BioSim entwickelten mikrofluidischen und elektrochemischen Technologien bilden eine wesentliche Grundlage für die zukünftige Entwicklung kapillarkraftgesteuerter PoC-Systeme zur Bestimmung neurodegenerativer Biomarker. Durch die Kombination aus simulationsbasierter Fluidikgestaltung, autarker Probenführung und elektrochemischer Detektion wurde ein innovativer Entwicklungsansatz geschaffen, der eine deutliche Verkürzung von Entwicklungszyklen sowie eine Erhöhung der Prozessstabilität und Reproduzierbarkeit mikrofluidischer Systeme ermöglicht. Das erarbeitete LoC-System zum Nachweis von Alzheimer-relevanten Biomarkern (PrionP, pTau) stellt die technologische Basis für ein zukünftiges Produktkonzept innerhalb des diagnostischen Portfolios der SensLab GmbH bzw. EKF-diagnostic GmbH dar. Darüber hinaus werden die entwickelten Simulations- und Analysewerkzeuge als Enabling-Technologien auch kurzfristig in nachfolgenden Entwicklungsprojekten eingesetzt, um Designprozesse zu beschleunigen und die Wirtschaftlichkeit der Produktentwicklung im Bereich der patientennahen Diagnostik nachhaltig zu verbessern.

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

Im Verlauf des Projekts BioSim wurden regelmäßig Literatur- und Patentrecherchen durchgeführt, um den aktuellen Stand der Forschung zu kapillarkraftgesteuerten PoC-Systemen zu erfassen. Trotz vorhandener Arbeiten zur Nutzung von Blut als diagnostischer Matrix für die Alzheimer-Diagnostik konnten bislang keine spezifischen Veröffentlichungen zur blutbasierten Alzheimer-Diagnostik auf ausschließlich kapillarkraftgetriebener POCT-Basis identifiziert werden. Ebenso fanden sich keine aktuellen Publikationen zur Analyse kapillargetriebener Mikrofluidiksysteme mithilfe eventbasierter Kameratechnologien, sodass das im Projekt verfolgte methodische Vorgehen einen neuartigen Ansatz darstellt.

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

Loebel, S.; Schaarschmidt, I.; Steinert, P.; Pöhlmann, C.; Weitzenberg, J.; Hein, M.; Lachmann, I.; Gärtner, E.; Eckert, U.; Schubert, A.: Design of capillary force controlled POCT devices using multiscale simulation methods. Poster: POCT-Meeting – Point-of-Care Diagnostics: Innovation from assays, microfluidics to production, Leipzig, 17.–18.04.2024

Loebel, S.; Schaarschmidt, I.; Steinert, P.; Pöhlmann, C.; Weitzenberg, J.; Hein, M.; Lachmann, I.; Gärtner, E.; Eckert, U.; Schubert, A.: DIANA-Projektvorstellung: BioSim. WIR!-sind DIANA: Bündnis Newsletter, Ausgabe 03, Juli 2024

Loebel, S.; Schaarschmidt, I.; Steinert, P.; Gärtner, E.; Pöhlmann, C.; Hein, M.; Richter, M.; Weitzenberg, J.; Lachmann, I.; Eckert, U.; Schubert, A.: Gestaltung Kapillarkraft-gesteuerter PoC-Diagnostiksysteme für die antikörperbasierte Bestimmung von Alzheimer-Biomarkern. Poster: 4. DIANA-Forum: POCT in der Leistungsdiagnostik, Chemnitz, 27.08.2025

Loebel, S.; Schaarschmidt, I.; Steinert, P.; Gärtner, E.; Pöhlmann, C.; Hein, M.; Richter, M.; Weitzenberg, J.; Eckert, U.; Schubert, A.: Modelling of capillary-force-controlled microfluidic systems using multiscale simulation methods. 5th European Biosensor Symposium EBS 2025, Tarragona, 26.–29.10.2025 –Veröffentlichung des Tagungsbandes ausstehend

Weiterhin ist im Laufe des ersten Quartals 2026 ein Open-Source-Journalbeitrag, welcher die erarbeitete, innovative Simulationsmethodik der internationalen Wissenschaftswelt zur Verfügung stellt, geplant. Mögliche Fachzeitschriften hierfür sind Chemical Engineering Journal, Lab on a Chip, Microsystems & Nanoengineering, Frontiers in Lab on a Chip Technologies, Micromachines sowie Biomicrofluidics.