

## Sachbericht zum Verwendungsnachweis

gemäß Nr. 4 NABF zum Vorhaben

PlasmaSepPOC – On-Chip-Probenvorbereitung für den Nachweis von Biomarkern in Vollblut mittels mikrofluidischer Lab-on-a-Chip POCT-Einwegensensoren

**Teilprojekt:** Integration einer On-Chip Probenvorbereitung in POCT-Einwegensensoren für den Nachweis von Biomarkern in Vollblut

**Zuwendungsempfänger:** SensLab Gesellschaft zur Entwicklung und Herstellung bioelektrochemischer Sensoren mbH

**Förderkennzeichen:** 03WIR7303A

**Leiter des Projektes:** Dr. Christopher Pöhlmann

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.09.2022 – 28.02.2025

### **SensLab GmbH**

Bautzner Str. 67

Dr. Christopher Pöhlmann

Tel.: 0341 23418-44

Fax: 0341 23418-40

E-Mail: [christopher.poehlmann@ekf-diagnostic.de](mailto:christopher.poehlmann@ekf-diagnostic.de)

**Autoren:** Dr. Liudmila Roussak, Martin Richter, Dr. Christopher Pöhlmann

## **Teil I: Kurzbericht**

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

Die Aufgabenstellung des Teilprojektes „Integration einer On-Chip-Probenvorbereitung in POCT-Einwegensensoren für den Nachweis von Biomarkern in Vollblut“ umfasste folgende Arbeitspakete (AP):

**AP 1:** Erarbeitung von Spezifikationen (Lasten-/Pflichtenhefte) für kapillarkraftgetriebene Blutplasmaseparation, inkl. Anforderungen an Fertigungstechnologien (Heißprägen, Laserbearbeitung, Lithographie) und Papier-basierte Filterintegration.

**AP 4:** Integration der in AP 2/3 entwickelten Filterstrukturen in Laktat- und CRP-Sensoren (AP 4.2 enzymatischer Laktatassay; AP 4.3 Immunoassay-basiert).

**AP 5:** Analytische Leistungsbewertung der Systeme.

**AP 6:** Dissemination der Projektergebnisse.

Im Stand der Technik wird Blutplasma in der Regel makroskopisch durch Zentrifugation gewonnen, was für den Einsatz in patientennahen Soforttests unpraktikabel ist. Passive Separationstechnologien, die vollständig ohne externe Geräte auskommen und allein durch Kapillarwirkung arbeiten, bieten hierfür prinzipiell geeignete Ansätze. Dennoch bestehen technische Herausforderungen wie die zuverlässige Verarbeitung sehr kleiner Probenvolumina unter fünf Mikrolitern, kurze Separationszeiten von unter einer Minute, das Risiko der Filterverstopfung und die massenproduktionsfähige Integration in komplexe Mikrofluidiksysteme. Ziel des Vorhabens war es daher, robuste und reproduzierbare Trennverfahren zu entwickeln, diese in einen enzymatischen Laktat-Nachweis sowie einen Immunoassay-basierten CRP-Nachweis zu integrieren und ihre Leistungsfähigkeit analytisch zu bewerten.

### **Ablauf des Vorhabens**

Im Projekt wurden zunächst die technischen Spezifikationen (AP 1) für verschiedene Fertigungstechnologien (Heißprägen, Laserbearbeitung, papierbasierte Filtration) erarbeitet und in detaillierte Konstruktionszeichnungen überführt. Diese bildeten die Grundlage für die Werkzeugherstellung durch die Projektpartner.

Darauf aufbauend konnte in AP 4.2 ein Sensordesign für die Integration von Filterstrukturen in einen Laktat-Sensor entwickelt werden. Hierbei wurde ein Layout mit laserstrukturierten Dünnschichtelektroden umgesetzt und die Mikrofluidik so angepasst, dass eine zuverlässige Platzierung und Leistungsfähigkeit der Filter möglich wurden.

Parallel entstand in AP 4.3 ein Doppelkammersensor zur elektrochemischen CRP-Detektion. Verschiedene Affinitätsreagenzien und Enzymsysteme wurden getestet, wobei sich ein  $\beta$ -Galactosidase-basiertes Verfahren als besonders geeignet erwies. Die Assay-Bedingungen (Puffer, Spannung, Integrationszeit) wurden optimiert und das Nachweisprinzip in ein CAD-basiertes Mikrofluidiklayout übertragen.

In enger Zusammenarbeit mit den Fraunhofer-Instituten IWU und IZI konnten die relevanten Mikrostrukturen und Filterkonzepte spezifiziert und erste funktionale Demonstratoren realisiert werden. Die passive Plasmaseparation im Laktat-Sensor wurde erfolgreich gezeigt, weist aber noch Verbesserungsbedarf hinsichtlich Reproduzierbarkeit auf. Insgesamt hat das Vorhaben wesentliche Grundlagen für die Integration kapillarkraftgetriebener Separationstechnologien in POCT-Systeme geschaffen und deren Potenzial für eine praxistaugliche patientennahe Diagnostik bestätigt.

### **Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Das Projekt ermöglichte die vollständige Spezifikation der für die Plasmaseparation relevanten Mikrostrukturen sowie papierbasierter Filterkonzepte und führte zur Entwicklung geeigneter Sensordesigns für Laktat- und CRP-Detektion. Die Immunoassay-basierte elektrochemische Nachweismethode für CRP wurde erfolgreich etabliert und zeigte sich unempfindlich gegenüber potenziellen Störeinflüssen durch Blutbestandteile. Durch Optimierung von Assay-

Bedingungen (Pufferzusammensetzung, Polarisationsspannung, Integrationszeit) konnten reproduzierbare und empfindliche Messungen erreicht werden. Die kapillarkraftgetriebene Plasmaseparation wurde im Laktat-Sensor erfolgreich demonstriert, wenngleich die erzielte Reproduzierbarkeit der Funktionalität noch Verbesserungsbedarf aufweist.

Die Arbeiten erfolgten in enger Kooperation mit dem Fraunhofer IWU, das die Herstellung der Heißprägewerkzeuge und die Mikrostrukturierung verantwortete, sowie mit dem Fraunhofer IZI, das Membran-basierte Filterlösungen entwickelte und Integrationsversuche durchführte.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die passive Blutplasmaseparation in POCT-Einwegensensoren technisch machbar ist. Die Integration in den Laktat-Sensor wurde erfolgreich umgesetzt, während die Umsetzung im CRP-Immunoassay sowie die analytische Leistungsbewertung der POCT-Systeme aufgrund von Fertigungsverzögerungen erst nach Projektende abgeschlossen werden kann. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen das hohe Anwendungspotenzial der entwickelten Technologien für die patientennahe Diagnostik. Langfristig eröffnen sie Perspektiven für Multiparameter-Analysen und tragen wesentlich zur Verbesserung von Benutzerfreundlichkeit und Zuverlässigkeit zukünftiger POCT-Systeme bei.

## Teil II: Eingehende Darstellung

Das Ziel des Gesamtvorhabens „PlasmaSepPOC – On-Chip-Probenvorbereitung für den Nachweis von Biomarkern in Vollblut mittels mikrofluidischer Lab-on-a-Chip POCT-Einwegensensoren“ war die Entwicklung innovativer, kapillarkraftgetriebener Blutplasmaseparationstechnologien für Point-of-Care-Testing (POCT)-Anwendungen. Hierbei sollten passive, vollständig peripheriefreie Verfahren etabliert werden, die sich in mikrofluidische Einwegensensoren integrieren lassen und ohne zusätzliche Gerätekomponenten eine analytisch hochwertige Plasmafraktion bereitstellen.

Das Teilvorhaben der SensLab GmbH verfolgte das Ziel, diese Probenvorbereitungstechnologien in zwei exemplarische Sensorsysteme zu integrieren: einen enzymatischen Laktat-Sensor und einen Immunoassay-basierten Sensor für den Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP). Im Vordergrund standen dabei die Entwicklung geeigneter Mikrofluidiklayouts, die Anpassung der Sensorelektroden und die Optimierung der Reagenzsysteme, sodass die integrierte Plasmaseparation ohne Beeinträchtigung der nachfolgenden Detektionsreaktionen funktioniert. Die entsprechenden Fertigungstechnologien für die Plasmaseparation wurden von den Projektpartnern, dem Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (Fh IZI) und dem Fraunhofer-Institut für Werkzeugmaschinen und Umformtechnik (Fh IWU) zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn (AP1) wurden gemeinsam mit den Projektpartnern die grundlegenden Anforderungen an Geometrie, Volumina, Oberflächeneigenschaften und Materialstabilität der Trennstrukturen definiert. Diese Spezifikationen umfassten unter anderem das minimale benötigte Probenvolumen, die maximal zulässige Separationszeit, die gewünschte Plasmareinheit sowie die Temperaturbeständigkeit der eingesetzten Materialien. Auf Basis dieser Vorgaben entstanden Lastenhefte für drei technologische Ansätze: mikrostrukturierte Polymerfolien (mittels Heißprägen und Laserbearbeitung), lithographisch bzw. mittels Kombinationsverfahren erzeugte Mikrostrukturen sowie die Integration geeigneter Papierfilter. Für die ersten beiden technologischen Ansätze wurden insgesamt elf Strukturvarianten entwickelt, die sich in der Anordnung geometrischer Formen (Säule, Raute, Sechseck) sowie in der Anzahl der Reihen (3, 5 oder 10) unterscheiden. Die Wandabstände betragen 10 oder 5  $\mu\text{m}$  (bei einem Säulendurchmesser von 25  $\mu\text{m}$ ) bzw. 1  $\mu\text{m}$  bei einem Säulendurchmesser von 10  $\mu\text{m}$ . Ergänzend wurde ein Konzept für eine mehrteilige, ineinandergreifende Mikrofluidik sowie eine Auffangstruktur zur Separation von Mikropartikeln entworfen. Hierzu wurden Konstruktionszeichnungen erstellt, die Aufnahmetöpfe für Papierfilter, Messkammern mit Elektroden und Entlüftungskanäle umfassten (Abb. 1).

Ergänzend wurde ein alternatives Zubehörkonzept entworfen, das Plasma über eine separate Filtermembran gewinnt und anschließend in den Sensor einspeist.

Für den Laktat-Sensor (AP 4.2) musste zu Beginn ein neues Layout für den Grundsensoren entwickelt werden, das die Einbindung der Filterstrukturen in die bestehende Mikrofluidik ermöglicht (Abb. 2). Der aktuelle Lactate Scout Test Strip (Art. Nr. 7023-3440, EKF-diagnostic GmbH) verwendet Kapillarblut als Probenmatrix, die ohne Plasmaseparation vermessen wird. Es erfolgt eine Hämatokritkompensation über die Auswertung des Ladungssignals im Rahmen einer kathodischen amperometrischen Messung (siehe DE102013227125B4). Ein anderer Ansatz ist die Hämatokritmessung über einen zweiten Messkanal und einer Vier-Elektroden-Leitfähigkeitsanordnung (siehe DE102022107214). Beide Ansätze führen aber zu einer Erhöhung der Komplexität von Einwegensensoren, in dem a) ein zusätzlicher Messschritt (Zeitdauer und Umpolung) durchgeführt werden muss oder b) ein Einwegensensor mit zwei Messkammern gestaltet werden muss (komplexeres Sensor- und Fluidiklayout, Anzahl an Sensorkontakten steigt, zusätzliche Messdauer). In diesem Vorhaben war die Etablierung einer im Sensor integrierten Separationsstrecke und die Messung direkt im Blutplasma anvisiert.

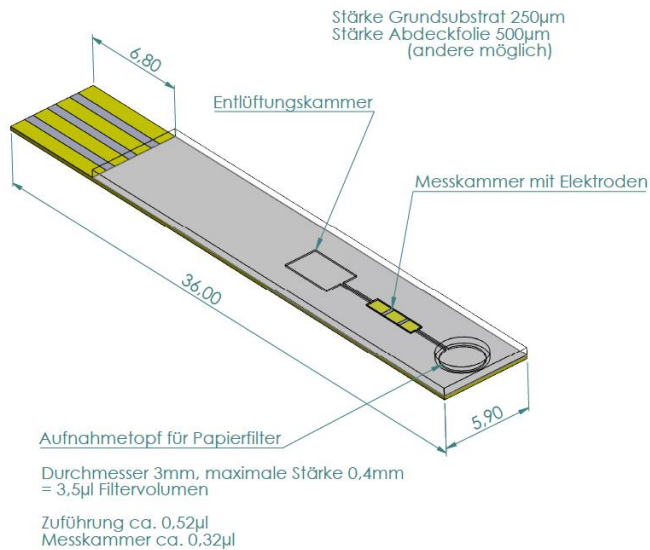


Abbildung 1: Konstruktionszeichnung für einen POCT-Einwegsensoren mit einem Aufnahmetopf für einen Papierfilter.

Die Elektroden des Enzymsensors zum Nachweis von Laktat basierten auf einem PET-Substrat, das mit einer 50 nm Metallschicht (Toplayer: Gold) im PVD-Verfahren durch das Fraunhofer-Institut für Elektronenstrahl- und Plasmatechnik (Fh FEP) beschichtet und anschließend im Auftrag laserstrukturiert wurde. Dazu wurden iterativ drei Sensorlayouts entwickelt (rev. 2.4, 2.4.1 und final 2.5), welche die Integration einer Filtermembran zulassen. Das Sensorlayout der finalen Revision 2.5 zur Integration von Filtermembranen ist in Abb. 2 dargestellt. Der Lactate Scout Test Strip (Art. Nr. 7023-3440, EKF-diagnostic GmbH) verwendet aktuell Kohlenstoffelektroden zum amperometrischen Nachweis. Der Laktatsensor in diesem Teilprojekt basierte aber auf Goldelektroden, da diese eine bessere Reproduzierbarkeit und Sensitivität gewährleisten können. Zusätzlich wurden die Dispensierparameter für das Auftragen des Laktat-spezifischen Reagenzgemisches ADL02 auf das Messfenster gezielt angepasst, um eine optimale Benetzung und Reproduzierbarkeit der Messungen sicherzustellen. Daher wurde untersucht, inwieweit die Signalstärken zwischen den beiden Sensorkonzepten korrelieren (siehe Abb. 3). Dazu wurden kommerziell-erhältliche humane Plasmaproben mit L-Laktatkonzentrationen zwischen 0,5 und 25 mmol/L versetzt und mittels des handgehaltenen Messsystems Lactate Scout Sport (Art. Nr. 7023-0530, EKF-diagnostic GmbH) vermessen. Als Referenzsystem diente das Benchtop-Gerät Biosen C-Line (EKF-diagnostic GmbH). Die Untersuchungen bestätigten die Kompatibilität der Gold-Dünnschichtsensoren mit dem etablierten Standard-Kohlenstoffsensor in Dickschichttechnik. Die erzielten Messreihen zeigten eine hohe Linearität ( $R^2 > 0,95$ ) sowie einen dynamischen Messbereich von 0,5 bis 25 mmol/L. Darüber hinaus konnte eine höhere Steigung der Kalibriergerade bei Goldsensoren im Vergleich zu Kohlenstoffsensoren nachgewiesen werden, was auf eine verbesserte Empfindlichkeit hindeutet. Die Ergebnisse in Abb. 3 zeigen, dass beide Sensorvarianten nahezu eine identische analytische Leistung aufweisen, wobei zu berücksichtigen ist, dass in Abb. 3 bereits die durch das Lactate Scout Messsystem berechneten Konzentrationswerte ausgegeben werden. Unter Berücksichtigung der Rohwerte konnte festgestellt werden, dass der Goldsensor wie erwartet eine höhere Empfindlichkeit aufweist. Neben den Gold-Dünnschichtelektroden wurden auch Graphen-Dickschicht-Sensoren mittels Siebdruck hergestellt. Diese zeigten jedoch keine Überlegenheit gegenüber den Gold-Dünnschichtsensoren, weshalb dieser Ansatz hier nicht weiterverfolgt wurde.

Die Position der Filterelemente innerhalb der Fluidik wurde in Abstimmung mit den Projektpartnern Fraunhofer IWU (heißgeprägten Strukturen) und Fraunhofer IZI (Papierfilter) festgelegt (Abb. 4). Für die heißgeprägten Strukturen vom Fh IWU wurde im Gegensatz zu dem Papierfilter keine neue Fluidik entworfen, sondern die Strukturen wurden in die bisher

verwendete Prägefolie (d. h. Fluidkammer) mit integriert. Für diese Versuche wurde bevorzugt die rev. 2.4.1 verwendet.

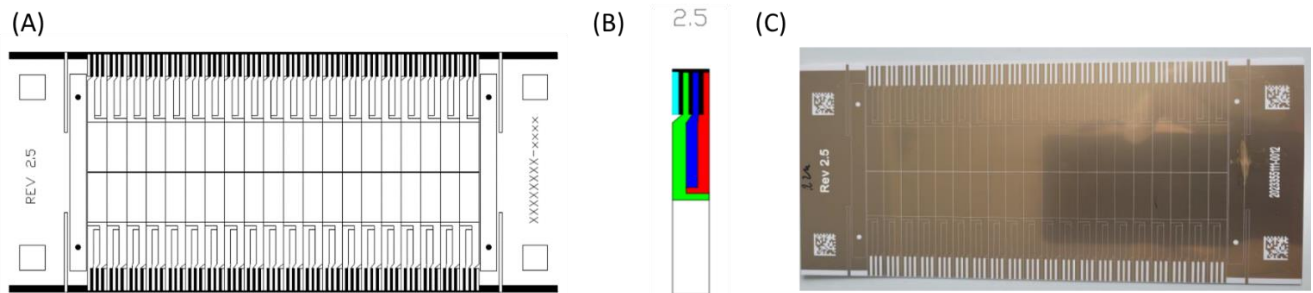


Abbildung 2: Sensorlayout Revision 2.5 für das Sensordesign mit integrierter Filterstruktur. (A) Zeichnung des Sensorlayouts Revision 2.5, 40er Nutzen. (B) Einzelsensor des Revision 2.5, die weiße Fläche bietet Platz für die Integration der Filterstrukturen in die Mikrofluidik, rot = Arbeitselektrode, grün = Gegenelektrode, blau = Referenzelektrode. (C) Foto einer Laserstrukturierten Nutzenkarte (40 Sensoren).

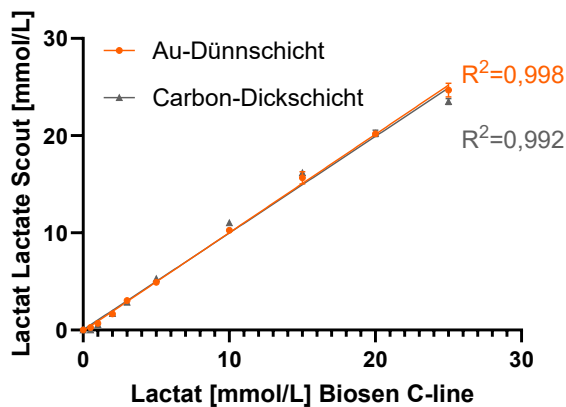


Abbildung 3: Lineare Abhängigkeit der mittels Lactate Scout Sport und dem Goldsensor (orange Linie, rev. 2.4) bzw. Kohlenstoffsensor (graue Linie) ermittelten Lactatkonzentrationen im humanen Plasma. Die Referenzwerte an Lactat in Blutplasma (x-Achse) wurden mittels Biosen C-Line bestimmt. Lineare Regression für Goldsensor:  $y = 1,012x - 0,1074$ ,  $R^2 = 0,998$ ; lineare Regression für Kohlenstoffsensor:  $y = 0,9947x + 0,03348$ ,  $R^2 = 0,992$ .

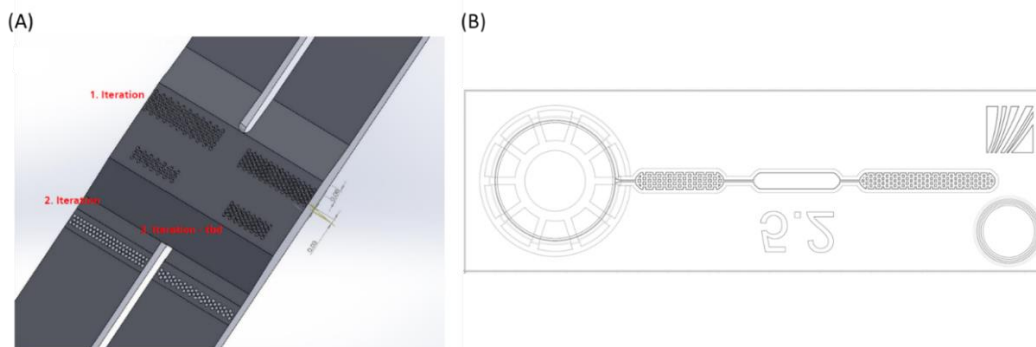

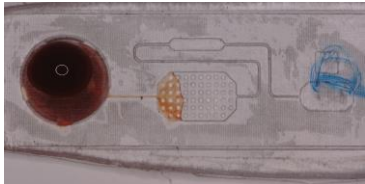


Abbildung 4: Abstimmung der im Mikrofluidikkanal zu platzierenden Filterstrukturen. (A) Platzierung der heißgeprägten laterale Filterstrukturen in Abstimmung mit dem Fh IWU (mit Darstellung der Iterationsstufen). (B) Platzierung der Papierfilters innerhalb der Fluidikfolie der Revision 5.2 in Abstimmung mit dem Fh IZI.

Im ersten Abschnitt sollen die Ergebnisse der **Plasmaseparation mit Filtermembranen** vorgestellt werden. Die Untersuchungen zur Plasmaseparation mit Filtermembranen wurden in enger Zusammenarbeit zwischen dem Fh IZI und der SensLab GmbH durchgeführt. Nach der initialen Etablierung der Verfahren am Fh IZI erfolgte ein erster gemeinsamer Test an Kartuschensystemen aus Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polycarbonat (PC). Während die Etablierungsversuche mit PMMA-Kartuschen durchgeführt wurden, ist für die Produktion des Lactate-Scout-Teststrips die Verwendung von PC erforderlich.

Die Kartuschensysteme wurden mit zwei unterschiedlichen hydrophilen Beschichtungsmethoden (S100 und PH) behandelt. Anschließend wurden ca. 20 µL humanes Kapillarblut bzw. Restblut aus heparinisierendem venösem Blut aufgetragen. Die Eignung und Funktionalität der hergestellten Filterstrukturen wurde untersucht. Die Plasmagewinnung in der Auffangkammer wurde visuell bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

*Tabelle 1: Plasmaseparation mit Filtermembran bei Verwendung unterschiedlicher Kartuschenmaterialien und Hydrophilisierungsmethoden.*

	PMMA	PC
<b>S100</b>	Partielle bis vollständige Plasmaseparation 	Keine Befüllung
<b>PH</b>	Partielle Plasmaseparation	Partielle Plasmaseparation 

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die Machbarkeit der Plasmaseparation mit der Kombination PMMA/S100 nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde reines Plasma in ausreichender Menge (Messkammervolumen für Sensor <0,5 µL) generiert. Die Reproduzierbarkeit war jedoch selbst bei PMMA unzureichend, und der Materialtransfer auf PC erwies sich als schwieriger als erwartet.

Im Rahmen nachfolgender Optimierungsversuche wurden durch das Fraunhofer IZI weitere Revisionen der Kartuschensysteme erarbeitet, die nach analogem Verfahren wie oben beschrieben bei SensLab getestet wurden. Eine signifikante Verbesserung der Reproduzierbarkeit konnte dabei zunächst nicht erzielt werden. Einzelne Kartuschen zeigten eine gute Separation, während bei vielen kein vollständiger Fluidtransport stattfand. Dies äußerte sich u. a. in einer Plasmaseparation am Rand der Filtermembran ohne anschließenden Filtratfluss. Als Ursache wird eine unzureichende Abformqualität diskutiert, die die Funktionalität der Mikrostruktur beeinträchtigt.

Die optimierten Revisionen 7.1 und 7.1/7.2 (Unterseite rev. 7.1, vergrößerte Filterkammer rev. 7.2; Filterstrukturen mit Whatman Fusion 5, Ahlstrom 6615 [2 % Trehalose], Vivid PS) zeigten eine deutlich verbesserte Abformqualität. Doppelabprägungen oder Verschiebungen traten nur noch in Ausnahmefällen auf. Die Prägefolien mit integrierten Filtern wurden mit einer hydrophilen Adhäsivfolie (ARflow® 93049, Adhesives Research) kombiniert. Mit diesen Aufbauten war eine reproduzierbare Plasmaseparation möglich (Abb. 5).

Im Vergleich zu früheren Proben wurde bei ca. 83 % der Tests ein erfolgreicher Fluidtransport erzielt. Besonders die Variante rev. 7.1/7.2 zeigte eine verbesserte Benetzung der Filtermembran, wobei in Einzelfällen das Blut vollständig in die Membran absorbiert wurde. Die Vergrößerung der Filterkammer erforderte ein um 5 µL größeres Probenvolumen (25 µL). Grundsätzlich erreichten beide Varianten eine erfolgreiche Separation. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit erzielte rev. 7.1 in 2 von 3 Proben (67 %) positive Ergebnisse, während rev. 7.1/7.2 in allen drei Fällen (100 %) erfolgreich war. Die Filtrationszeit lag bei rev. 7.1/7.2 bei ca. 1,5 min, bei rev. 7.1 hingegen bei über 2 min. Die Gesamtzeit bis zur vollständigen Befüllung der Messkammer betrug in beiden Fällen 3,5–4,5 min, was für eine POCT-

Anwendung kritisch und zu lang ist. Zusätzlich wurden Durchbrüche (DB) in die Kapillarpumpe beobachtet, die zu beschleunigtem Filtratfluss, Luftblasenbildung und Erythrozytenclustern führten. Eine dritte Variante (rev. 7.2 mit Pfosten in der Messkammer, vergrößerter Filterkammer und Belüftungsloch) zeigte hingegen unzureichende Ergebnisse (Separation nur in 1 von 5 Tests, 20 %). Die Testung der weiteren Chargen rev. 7.2 ergab, dass die Bildung von Luftblasen in der Reaktionskammer durch die mit den Pfosten optimierte Oberfläche verhindert werden konnte. Bedingt durch die Komplexität des Kartuschaufbaus, der eine Vielzahl an manuellen Herstellungsschritten aufweist, konnte keine ausreichende Reproduzierbarkeit der Testmuster erzielt werden. Das wesentliche Problem stellte die Aufrechterhaltung des kapillaren Flusses in der Kartusche dar. Die variierende (d.h. nicht reproduzierbare) Fließgeschwindigkeit des Filtrates in der Reaktionskammer sowie das teilweise Ausbleiben eines kapillaren Flusses sind auf eine teilweise unzureichende Hydrophilisierung (Coating) der mikrofluidischen Strukturen zurückzuführen. Aufgrund der besseren Resultate hinsichtlich Benetzung, Reproduzierbarkeit und Filtrationszeit wurde die kombinierte Variante rev. 7.1/7.2 als Favorit identifiziert.

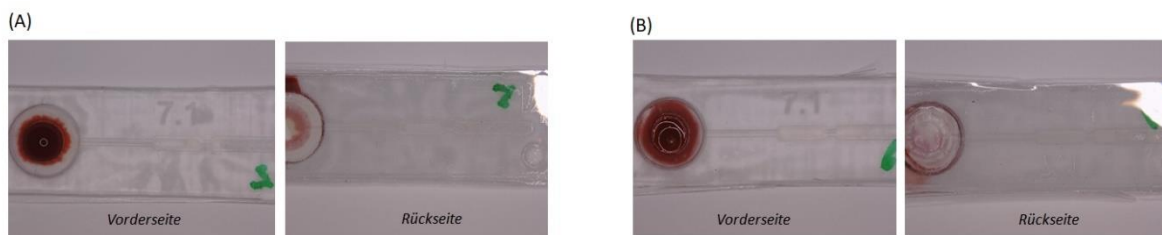


Abbildung 5: Plasmaseparation mit Kartuschen zusammengesetzt aus (A) Prägefolie rev. 7.1 und ARflow 93049 bzw. (B) Prägefolie rev. 7.1/7.2 und ARflow 93049. Es ist jeweils die Vorder- und Rückseite dargestellt.

Im Anschluss erfolgte die Integration der Filterstrukturen in elektrochemische Laktatsensoren. Hierbei wurden die Prägefolien auf Grundsensoren der Revision 2.5 laminiert (Abb. 6). Die Laminierung erfolgte manuell mit doppelseitiger Klebefolie, was zu einer geringen Reproduzierbarkeit führte. Typische Fehlerbilder umfassten eine unvollständige Filtration, Durchbrüche in die Kapillarpumpe sowie bei Sensoren mit Reagenzgemisch unkontrollierte Flüssigkeitsdurchtritte unterhalb der Mikrofluidikstruktur (Abb. 7).

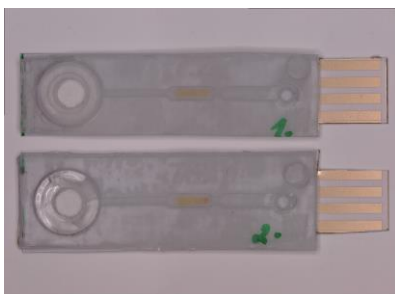


Abbildung 6: Elektrochemischer Laktatsensor bestehend aus Au-beschichtetem Grundsubstrat mit Prägefolie mit Filterstruktur, verbunden mit doppelseitiger Klebefolie.

In Integrationstests konnte nachgewiesen werden, dass die Befüllung der Messkammer durch die Trennstruktur (Filterkammer) prinzipiell gleichmäßig erfolgt und keine Erythrozyten oder Zellagglomerate in die Reaktionszone gelangen. Daraufhin wurde die Kanalgeometrie angepasst, um die Reproduzierbarkeit zu verbessern.

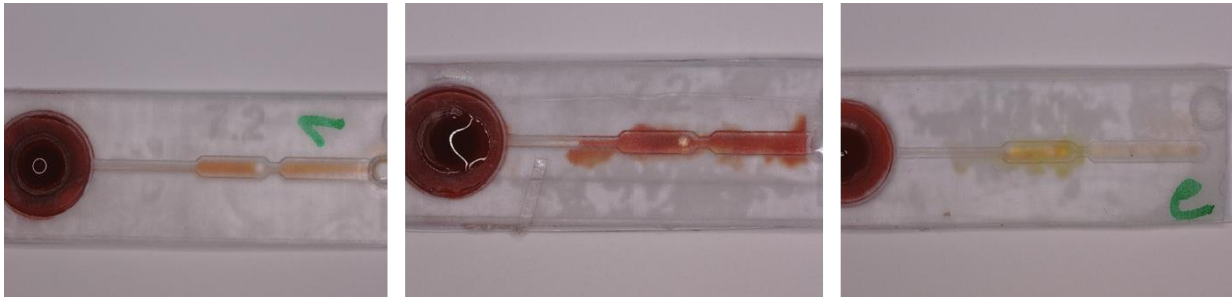


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellungen von Sensoren ohne (links) und mit Reagenzgemisch (Mitte und rechts). Die Durchbrüche in Gegenwart von Reagenzgemisch (Mitte und rechts) sind deutlich zu erkennen. Eine vollständige Plasmaseparation wurde nicht erreicht.

In einer weiteren Iterationsschleife wurde anstelle konventioneller Folien eine CO<sub>2</sub>-lasergeschnittene doppelseitige Klebefolie eingesetzt, um die Abdichtung der Strukturen zu optimieren. Die Klebefolie wurde von SensLab bereitgestellt, das Laserschneiden vom Fraunhofer IZI durchgeführt. Zusätzlich wurden die abgeprägten Filterstrukturen poliert, um den Kapillarfluss zu verbessern (Abb. 8). Mit diesem Aufbau war eine Plasmaseparation auf ARflow® 93049 und PET-Folie (Melinex) möglich, die Reproduzierbarkeit der Befüllung blieb jedoch mit 1,5–5 min variabler Befüllzeit unzureichend. Auf beschichteten elektrochemischen Sensoren konnte zudem keine zuverlässige Funktionalität erreicht werden.

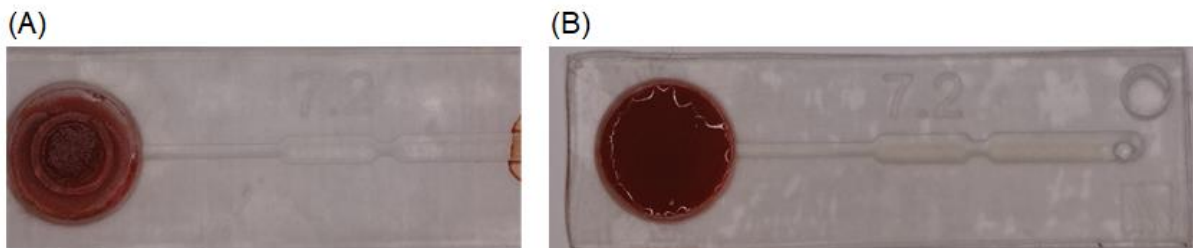


Abbildung 8: Plasmaseparation mit polierten Filterstrukturen (rev. 7.2) auf ARflow® 93049 (A) bzw. Melinex 329 (B).

Wie bereits dargelegt, sind die Ursachen für die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Plasmaseparation in der angewandten Fertigungsmethodik zu verorten. Im Rahmen der Projektdurchführung konnten insbesondere zwei maßgebliche Einflussfaktoren identifiziert werden:

- Oberflächenqualität der Prägewerkzeuge:  
Die Strukturabformung am Fraunhofer IZI erfolgte unter Verwendung von 3D-gedruckten Heißprägewerkzeugen. Diese Werkzeuge verfügen jedoch nicht über die für eine prozesssichere Reproduktion erforderliche Oberflächenqualität. Insbesondere die erzielbare Rauheit ist den Eigenschaften laserbearbeiteter Stahlwerkzeuge deutlich unterlegen. Eine unzureichende Oberflächenbeschaffenheit führt zu Abweichungen in der Fließgeschwindigkeit, welche sich unmittelbar negativ auf die Separationseffizienz und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auswirken.
- Manuelle Assemblierung der Sensorkomponenten:  
Die Vereinigung der Einzelelemente – Grundsubstrat, Klebefolie sowie Abdeckfolie mit integrierter Filtermembran – erfolgte in allen Projektphasen manuell. Dieser manuelle Prozessschritt ist durch eine hohe Variabilität geprägt, was zu inkonsistenten Materialübergängen und Geometrieabweichungen im fertigen Sensorsystem führen kann. Diese Faktoren tragen wesentlich zur beobachteten Streuung der Ergebnisse bei.
- Hydrophilisierung der Kartuschenoberfläche (Coating):  
Die Beschichtung der mikrofluidischen Strukturen erwies sich als stark variabler Prozess. Dies resultierte in schwankender Fließgeschwindigkeit und teilweise ausbleibendem kapillarem Transport des Filtrates. Die Variabilität des Coatings ist damit eine wesentliche Ursache für die beobachtete Streuung der Ergebnisse und macht eine präzisere Standardisierung der Prozessbedingungen erforderlich.

Trotz der identifizierten methodischen Einschränkungen konnte die prinzipielle Machbarkeit der Plasmaseparation nachgewiesen werden. Insbesondere auf hydrophilen Substraten

wurde eine effiziente Separation erzielt, wobei das resultierende Plasma visuell homogen und frei von erkennbaren Verunreinigungen vorlag. Damit wurde die technische Realisierbarkeit der grundlegenden Funktionsweise bestätigt (Abb. 9).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse haben die Projektpartner Fh IZI, Fh IWU und SensLab vereinbart, über die Projektlaufzeit hinaus weiterführende experimentelle Untersuchungen durchzuführen. Ziel dieser Arbeiten ist die Validierung, ob durch die Übertragung eines optimierten Mikrofluidik-Layouts auf ein laserbearbeitetes Stahlwerkzeug die Herstellung einer funktionsfähigen, reproduzierbaren und prozessstabilen Mikrofluidikstruktur gewährleistet werden kann.



Abbildung 9: Plasmaseparation mit Filterstrukturen (rev. 7.2) auf dem mit Reagenzgemisch beschichteten Gold-Substrat (Sensor). Das Plasma ist nach dem Austritt aus der Messkammer durch das Reagenzgemisch gelb gefärbt.

Die Untersuchungen zur **Plasmaseparation mit heißgeprägten lateralen Säulenstrukturen** wurden in enger Kooperation zwischen dem Fh IWU und der SensLab GmbH durchgeführt. Ziel dieser Arbeiten war es, alternative Mikrostrukturgeometrien zur Plasmaseparation zu entwickeln, die eine höhere Reproduzierbarkeit und Prozessstabilität im Vergleich zu den zuvor getesteten Filtermembranen ermöglichen.

Neben dem enzymatischen Laktatsensor wurde ein Immunoassay-basierter Sensor zum Nachweis des Entzündungsproteins CRP etabliert (AP 4.3).

Zur Entwicklung eines hochsensitiven Immunoassays für das Entzündungsprotein CRP wurde zunächst eine gezielte Auswahl spezifischer monoklonaler Antikörper getroffen. Hierbei kamen verschiedene Antikörpervarianten der Firma HyTest (C5, C6cc, C2cc, CRP135cc) zum Einsatz. Parallel dazu wurde rekombinantes CRP-Antigen (HyTest/ BBI) als Referenzmaterial beschafft.

Die Kopplung von Detektionsantikörpern mit dem Reporterenzym  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) erfolgte über einen bifunktionellen Linker (sulfo-SMCC) (Abb. 18 A). Dabei wurde gezielt die Reaktivität von Aminogruppen der Antikörper mit Thiolgruppen der  $\beta$ -Gal genutzt. Die optimalen Reaktionsbedingungen umfassten: 10-fach molarer Überschuss an sulfo-SMCC gegenüber Antikörper, Reaktionszeit 60 min bei RT, Kopplung in einem 2:1 molaren Verhältnis (Antikörper: $\beta$ -Gal) über 18 h bei 4 °C. Die Funktionalität der Konjugate (z. B. C6cc- $\beta$ -Gal, CRP135- $\beta$ -Gal) wurde in einem direkten ELISA überprüft (Abb. 18 B). Hierbei konnten sigmoidale Bindungskurven detektiert werden (Absorptionsmessung bei 405 nm mit Korrektur bei 620 nm), die eine erfolgreiche Kopplung bestätigten. Als Alternative wurde auch eine Biotinylierung der Antikörper etabliert, um eine indirekte Kopplung über Streptavidin-Enzym-Konjugate zu ermöglichen. Die Nachweisreaktion beinhaltet dann einen weiteren Schritt, nämlich die Anbindung des Reporterenzym in Form eines kommerziell-verfügbaren Streptavidin-Reporterenzym-Konjugats. Dabei wurde die Biotinylierung sowohl mit dem Streptavidin- $\beta$ -Gal-Konjugat als auch mit einem Streptavidin-Poly-Meerrettischperoxidase-Konjugat demonstriert. Aufgrund der Notwendigkeit eines zusätzlichen Schrittes wurde auf dieses Verfahren bisher aber in den weiteren Versuchen nicht zurückgegriffen, da es auch den mikrofluidischen Assayablauf erschweren würde. Neben  $\beta$ -Galactosidase wurde in frühen Stadien auch die Esterase 2 (EST2) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* evaluiert. Es zeigte sich jedoch, dass deren elektrochemisches Substrat (pAPB) in Vollblut durch endogene Esterasen unspezifisch umgesetzt wird und dadurch ein störendes Hintergrundsignal erzeugt. Deshalb wurde EST2 verworfen und ausschließlich  $\beta$ -Gal für die weiteren Entwicklungsarbeiten genutzt.

Die Auswahl der optimalen Antikörperpaare erfolgte mittels Schachbrett-Titration, bei der Fänger- und Detektionsantikörper in unterschiedlichen Konzentrationskombinationen getestet wurden. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die Kombinationen C5/C6cc- $\beta$ -Gal sowie

C5/CRP135- $\beta$ -Gal eine hohe Sensitivität und ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis aufwiesen. Zur Feinabstimmung des Referenzassays wurde der Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten sowie verschiedener Verdünnungen der Antikörper- $\beta$ -Gal-Konjugate auf den linearen Messbereich systematisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine verlängerte Inkubationszeit in Kombination mit einer optimalen Konjugatverdünnung zu einer signifikanten Erweiterung des linearen Bereichs führte. Die analytische Charakterisierung des optimierten Assays (10  $\mu$ g/mL C5, 1:400 C6cc- $\beta$ -Gal, 120 min Inkubation) ergab eine hohe Sensitivität mit einem  $IC_{50}$  von 7,6 ng/mL, einer Nachweisgrenze (LOD) von 200 pg/mL CRP, einem Hill-Slope von 1,828 sowie einer exzellenten Reproduzierbarkeit ( $R^2 = 0,9979$ ). Diese Werte belegen die hohe Leistungsfähigkeit des etablierten Referenzassays.

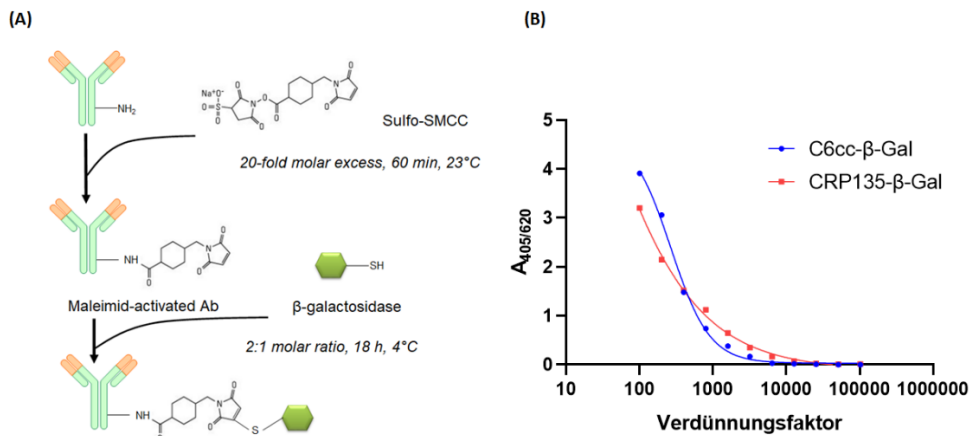


Abbildung 18: Herstellung (A) und Charakterisierung (B) von Antikörper-Reporterenzym-Konjugaten für den Einsatz im photometrischen Referenzassay. (A) Die Kopplung erfolgt mittels bifunktionellem Linker und ist im Text beschrieben. (B) Charakterisierung der hergestellten Antikörper-Reporterenzym-Konjugaten mittels Mikrotiterplattenassay. 100 ng CRP (HyTest) in 1x TBS-Puffer (pH 7,4) wurden für 18 Stunden in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte inkubiert. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte anschließend mit 3% Casein in 1x PBS (pH 7,4) für 1 h. Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit ELISA-Waschpuffer (1x PBS (pH 7,4), 0,1% Tween-20) wurden die angegebenen Verdünnungen der Konjugate C6cc- $\beta$ -Gal (blau) bzw. CRP135- $\beta$ -Gal (rot) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Vertiefungen mit ELISA-Waschpuffer wurde gebundenes Antikörper-Enzym-Konjugat mittels Substratzugabe (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid in 1x PBS (pH 7,4), 1 mM  $MgCl_2$ ) durch Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und anschließender photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm (Korrektur 620 nm) nachgewiesen.

Nach der erfolgreichen Etablierung und Optimierung des CRP-Referenzassays im 96-Well-Format erfolgte die Überprüfung seiner Robustheit und Anwendbarkeit in realen biologischen Matrices. Hierzu wurden sowohl CRP-freies humanes Serum (HyTest) als auch humanes venöses Restblut (1:3000 in Puffer verdünnt) eingesetzt (Abb. 19).

Die Auswertung zeigte die erwartete leichte Verschiebung der  $IC_{50}$ -Werte in Anwesenheit komplexer Matrices im Vergleich zu den Messungen in Puffer. Während der  $IC_{50}$  im reinen Puffer bei 7,6 ng/mL lag, ergaben sich für Serum 24,53 ng/mL und für verdünntes Vollblut 41,84 ng/mL. Diese Verschiebung lässt sich auf Matrixeffekte zurückführen, die sowohl die Bindungsaffinität der Antikörper als auch die Enzymaktivität geringfügig beeinflussen können. Trotz dieser Effekte wies der Referenzassay eine hohe Reproduzierbarkeit und Präzision auf: Die ermittelten Regressionskoeffizienten lagen bei  $R^2 = 0,9965$  für Serum und  $R^2 = 0,9915$  für verdünntes Vollblut. Damit konnte gezeigt werden, dass der Assay auch unter praxisnahen Bedingungen zuverlässig arbeitet und eine solide Basis für die spätere Übertragung in mikrofluidische Testsysteme bietet.

Nach der Etablierung der makrofluidischen Referenzmethode wurde ein kapillarkraftgetriebenes Mikrofluidiklayout entwickelt.

Die im Projektzeitraum angestrebte vollständige analytische Validierung der POCT-Systeme (AP 5.1 und AP 5.2) konnte aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit der Filtrationsstrategien nicht durchgeführt werden. Die Partner beabsichtigen nach Projektende,

weiter an der Robustheit der Plasmaseparation zu arbeiten und die beiden POCT-Systeme dann zu verifizieren und zu validieren.

Die Arbeiten führten insgesamt zu einer vollständigen Spezifikation der für die Plasmaseparation relevanten Mikrostrukturen und papierbasierten Filterkonzepte. Neue Sensordesigns für Laktat- und CRP-Nachweis wurden entwickelt und erfolgreich getestet. Die  $\beta$ -Galactosidase-basierte elektrochemische Detektion konnte als robustes, störungsunempfindliches Verfahren etabliert werden. Darüber hinaus wurde ein kapillarkraftgetriebenes Assaykonzept fertiggestellt, das nun für die Werkzeugfertigung bereitsteht. Die Plasmaseparation im Laktat-Sensor wurde demonstriert, und die erzielten Erkenntnisse sind auf den CRP-Assay übertragbar.

### **Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Im Rahmen der Durchführung des Projektes sind Kosten in Form von Personal-, Reise- und Materialkosten sowie sonstige Kosten entstanden. Diese sind detailliert im zahlenmäßigen Nachweis des Verwendungsnachweises dargestellt. Im Rahmen des Projektes wurde Melinex, im PVD-Verfahren am Fh FEP mit einer Metallschicht besputtert. Die Metall-beschichteten Substratfolien wurden bei der Firma Senstech in der Schweiz nach Vorgaben von SensLab laserstrukturiert. Bei den Materialkosten waren die größten Posten das Enzym Lactatoxidase (Sekisui Diagnostics) für den zu etablierenden Laktatsensor und die anti-CRP-Antikörper (HyTest Ltd.) für den CRP-Sensor. Die im Rahmen des Projekts vom Partner Fh IWU zu SensLab transferierten Testwerkzeuge für den mikrofluidischen Immunoassay werden auch nach Projektende bei der SensLab GmbH für Forschungszwecke verwendet werden, müssen aber für die weitere Produktentwicklung optimiert und somit neu angefertigt werden.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten**

Die enge Zusammenarbeit mit den Partnern Fh IWU und Fh IZI war für die Herstellung und Integration der Filterstrukturen entscheidend. IWU lieferte die Heißprägwerkzeuge für die mikrostrukturierten Folien mit lateralen Filterstrukturen, während das Fh IZI die papierbasierten Filterelemente entwickelte und Integrationstests durchführte.

Das durchgeführte Förderprojekt lieferte einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Machbarkeit der Plasmaseparation im POC-Umfeld. Im Rahmen der Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl der Einsatz von Filtermembranen als auch die Anwendung heißgeprägter lateraler Filterstrukturen prinzipiell für die Trennung von Plasma und Blutzellen in Kapillarkraft-getriebenen Sensoren geeignet sind. Damit wurde die grundsätzliche technische Machbarkeit nachgewiesen. Allerdings zeigte sich im Projektverlauf, dass die erzielten Ergebnisse noch nicht die Anforderungen an eine verlässliche und reproduzierbare Anwendung im klinischen Alltag erfüllen. Insbesondere besteht erheblicher Optimierungsbedarf hinsichtlich der Prozessstabilität, der Robustheit und der Produktsicherheit. Diese Aspekte sind entscheidend, um eine Überführung in ein marktfähiges Gesamtsystem zu ermöglichen. Wie beim ursprünglichen Vorhaben lagen die wissenschaftlich-technischen Risiken auch hier in allen Teilprojekten, sodass die Gesamtlösung durch verschiedene kritische Faktoren beeinträchtigt werden konnte.

Im Rahmen des Projektzeitraums kam es zu Verzögerungen in den Arbeitspaketen AP 4.2 und AP 4.3. Diese resultieren im Wesentlichen aus technologischen Herausforderungen bei den Projektpartnern: Der Partner Fh IZI hatte Schwierigkeiten mit der Materialüberführung der Filtermembran-basierten Plasmaseparation auf Polycarbonat sowie mit der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, während beim Partner Fh IWU die Herstellung der komplexen lateralen Filterstrukturen durch Mikrobohren und Laserbearbeitung deutlich mehr Zeit beanspruchte als geplant. Hinzu kamen organisatorische Probleme bei der Bereitstellung alternativer Testwerkzeuge und apparative Einschränkungen, die eine zeitnahe Umsetzung des finalen Mikrofluidiklayouts verhinderten. Da das Vorhaben im Kontext seiner Komplettierung als vielversprechend sowie hinsichtlich der vorgesehenen Anwendung im medizinischen Bereich von allen Verbundpartnern als überaus förderlich und nachhaltig definiert wird, ist vorgesehen, die ausstehenden Arbeiten von AP 4.3 und AP 5 bei SensLab nach Projektende durchzuführen. Diese Arbeiten können beginnen, sobald die Optimierung der Filtrationsstrukturen gemeinsam mit den Partnern Fh IZI und Fh IWU abgeschlossen sind.

Die Arbeiten führten insgesamt zu einer vollständigen Spezifikation der für die Plasmaseparation relevanten Mikrostrukturen und papierbasierten Filterkonzepte. Neue Sensordesigns für Laktat- und CRP-Nachweis wurden entwickelt und erfolgreich getestet. Die  $\beta$ -Galactosidase-basierte elektrochemische Detektion konnte als robustes, störungsunempfindliches Verfahren etabliert werden. Darüber hinaus wurde ein kapillarkraftgetriebenes Assaykonzept fertiggestellt, das nun für die Werkzeugfertigung bereitsteht. Die Plasmaseparation im Laktat-Sensor wurde erfolgreich demonstriert, und die erzielten Erkenntnisse sind auf den CRP-Assay übertragbar

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

Die im Projekt erarbeiteten Technologien adressieren eine zentrale Herausforderung der patientennahen Diagnostik: die schnelle, zuverlässige und peripheriefreie Gewinnung von Plasma aus sehr kleinen Blutvolumina. Die gewählten passiven Separationstechniken ermöglichen eine einfache, kostengünstige und massenproduktionstaugliche Umsetzung. Während die Integration in den Laktat-Sensor vollständig umgesetzt werden konnte, führten werkzeugbedingte Verzögerungen dazu, dass der CRP-Assay erst nach Projektende final integriert werden kann.

Das entwickelte Trennprinzip ist unmittelbar in marktfähige Laktat-POCT-Systeme überführbar. Dadurch wird eine klinisch valide Laktatmessung direkt aus Kapillarblut ohne komplexe Probenvorbereitung möglich, was insbesondere für Notfallmedizin, Rettungsdienste und ressourcenarme Regionen von Bedeutung ist. Langfristig eröffnet die Technologie neue Möglichkeiten für Multiparameter-Lab-on-a-Chip-Systeme, wie den geplanten CRP-Assay, der als Entscheidungshilfe bei der Differenzierung bakterieller und viraler Infektionen dienen kann. Das wirtschaftliche Potenzial ist hoch, da die Technologie auf eine Vielzahl diagnostischer Zielanalyte übertragbar ist.

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

Im Verlauf des Projekts wurden regelmäßig Literatur- und Patentrecherchen durchgeführt, um relevante Entwicklungen im Bereich POCT-Plasmaseparation und Immunoassay-Integration zu berücksichtigen. Mehrere Studien bestätigen den wachsenden Bedarf an portablen, passiv betriebenen Diagnostiksystemen und untermauern die Relevanz der entwickelten Ansätze.

Biswas SK, Chatterjee S, Laha S, Pakira V, Som NK, Saha S, Chakraborty S. Instrument-free single-step direct estimation of the plasma glucose level from one drop of blood using smartphone-interfaced analytics on a paper strip. *Lab Chip*. 2022 Nov 22;22(23):4666-4679.  
Farrokhnia, M, Babamiri, B, Mohammadi, M, Nezhad, AS, MIP-Chip: Integrated Microfluidic Plasma Separation and Redox-Enhanced Molecularly Imprinted Polymer Succinate Sensor for Whole Blood Metabolite Analysis. *ACS Sens*. 2025, 10, 4, 3112–3122.  
Khachornsakkul K, Trakoolwilaiwan T, Del-Rio-Ruiz R, Sonkusale S, Leelasattarakul T. Capillary-driven distance-based paper analytical devices for albumin protein and glucose quantification in human whole blood. *Mikrochim Acta*. 2025 Mar 15;192(4):233.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden kontinuierlich in die Entwicklung einbezogen.

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

Folgende Veröffentlichungen sind im Projektzeitraum erfolgt:

Poster:

C. Pöhlmann, L. Roussak, M. Hein, A. Menge, K. Mattern, D. Kuhlmeier, E. Gärtner, U. Eckert & D. Glitzel, Integration of Capillary-Driven Microfluidic Blood Plasma Separation Techniques into Point-of-Care testing Sensor Disposables. POCT Meeting, 17. – 18.4.2024, Leipzig, Germany.

Vortrag:

C. Pöhlmann & U. Eckert, Projektvortstellung DIANA-PlasmaSepPOC: On Chip-Probenvorbereitung für den Nachweis von Biomarkern in Vollblut mittels mikrofluidischer Lab on a Chip POCT Einwegsensoren. 3. DIANA-Forum: Fertigungstechnologien für die Point-of-Care-Diagnostik, 29.06.2023, Mittweida.

Veröffentlichungen/ Beiträge:

Projektvorstellung im DIANA-Newsletter 11/2023

Weiterhin ist nach Projektende eine Veröffentlichung zum Projektbereich Plasmaseparation mittels Filtermembranen durch die Projektpartner Fh IZI und SensLab geplant. Zudem streben das Fh IWU und SensLab nach positiver Validierung der optimierten Filterstrukturen eine Patentanmeldung der durch Heißprägen erzeugten lateralen Filterstrukturen und deren Anwendung in Kapillarkraft-getriebenen Einwegsensoren bzw. in Kapillarkraft-getriebenen Immunoassays an.