

Schlussbericht

zum Vorhaben: Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur

des Verbundprojekts: Optischer 3D Multi Parameter-Reader für die Prozesskontrolle bei der Herstellung von zellbasierten Therapeutika (3D-Cell-Reader)

Zuwendungsempfänger: PreSens Precision Sensing GmbH

Förderkennzeichen: 13N15031

Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2018 – 31.07.2022

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

Zusammenfassung

Das Verbundprojekt 3D-Cell-Reader ist der Förderbekanntmachung "Miniaturisierte optische Systeme hoher Integrationsdichte" im Rahmen des Förderprogramms "Photonik Forschung Deutschland" zugeordnet.

In der ersten Phase der Durchführung haben die Partner CO.DON AG, Ibidi GmbH, Argos Messtechnik GmbH und das Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam zusammen mit der PreSens Precision Sensing GmbH das Projekt bearbeitet. Mit Wirkung zum 30. April 2020 haben die Partner Argos und CO.DON den Kooperationsvertrag aufgrund Änderungen der internen Firmenstrategie gekündigt. Dadurch wurde eine strukturelle, inhaltliche und finanzielle Umstrukturierung unter Aufnahme der Firma InSphero AG als assoziiertem Partner für das Projekt durchgeführt. Die Schweizer Firma InSphero trat dabei als Anwendungspartner ohne eigene finanzielle Förderung auf.

Ziel des Verbundprojektes war die Realisierung eines optischen 3D Multi Parameter Readers für die Prozesskontrolle bei der Herstellung von zellbasierten Therapeutika. Um dieses Gesamtziel zu erreichen, wurden die dazu benötigten Kenntnisse und die unterschiedlichen Hard- und Software-Komponenten des Readersystems in den Teilvorhaben der Partner erforscht und soweit möglich realisiert. Die Aufgabenstellung des Gesamtverbundprojektes umfasste die Konzeptionierung des optischen 3D-Cell-Readers mit der Erstellung eines Anforderungsprofils für alle erforderlichen Komponenten (u.a. Sensoren, Optoelektronik, opto-Zellchip etc.) (AP 1). Außerdem waren die Erarbeitung der Grundlagen für ein Spektrometer, welches Spektren schneller ausliest und höher auflöst (AP 2), und für ein Auslesesystem zur 3D aufgelösten Messung relevanter Parameter (AP 3) Teil der Projektaufgaben. Abgerundet wurde die Aufgabenstellung mit der Überprüfung der Funktion der Mess-Systeme in Zellbasierten Anwendungen (AP 4) und mit der Evaluierung des Zellwachstums durch simultane Bestimmung mehrerer physiologischer Parameter (AP5).

Ziel des Teilvorhabens von PreSens war die Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur. Hier beinhaltete die Aufgabenstellung die Erforschung verschiedener Analyte auf ihre Eignung für den Einsatz in chemisch-optischen Sensorsystemen mit hoher Ortsauflösung, sowie die Entwicklung einer zugehörigen Auswertesoftware zur Verarbeitung und Darstellung der Messwerte. Durch die notwendige Übertragung der Aufgaben vom Partner Argos übernahm PreSens zusätzlich die Entwicklung einer speziellen Lichtquelle. Im Rahmen des Vorhabens wurde erstmals eine simultane flächige Messung und Visualisierung der 4 Parameter Sauerstoff, pH, CO₂ und Glukose in ihrem zeitlichen Verlauf erreicht. Für das Technologiefeld der Sensorik in der Lifescience können damit erstmals diese 4 wesentlichen Parameter nicht-invasiv und online überwacht werden.

1 Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Ziel des Projektes 3D-Cell-Reader war die Erforschung von neuen optischen Sensortechnologien, die eine kostengünstigere Produktion von zellbasierten Therapeutika für eine flächendeckende Patientenversorgung ermöglichen. Ansatzpunkt war die signifikante Erniedrigung der Fehlerraten in der Produktion und die Kulturkontrolle während der Medikamentenentwicklung. Im Projekt wurden neue integrierte optoelektronische Sensorsysteme sowie neue Konzepte für miniaturisierte, mikrointegrierbare, multimodale Sensorfunktionen entwickelt, die in Form eines „3D-Cell-Reader“ eine Möglichkeit schaffen werden den Zellzustand und die Versorgung der Zellen während der Anzucht gezielt zu kontrollieren, ohne dabei das Zellwachstum zu beeinträchtigen. Mit dem 3D-Cell-Reader werden die wichtigsten biologischen Parameter, die das Wachstum von solchen Zellen bestimmen, gemessen. Dadurch wird die Produktion in Zukunft genauer kontrolliert und die Ausfallrate bei der Produktion minimiert, wodurch Kosten gesenkt und Kapazitäten in der Produktion für die Versorgung weiterer Patienten geschaffen werden.

Die Aufgabe von PreSens bestand in der Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Aktuell gibt es keine technische Möglichkeit zur sensorbasierten, simultanen Überwachung von mehreren Kultivierungsparametern mit hoher dreidimensionaler räumlicher Auflösung in 3D-Zellkulturen, obwohl der Bedarf an standardisierten und kontrollierten Zellen und Organoiden stetig wächst. Diesen Widerspruch adressiert unser Teilprojekt.

Derzeitige Verfahren zur Überwachung und Standardisierung von 3D-Zellkulturen beruhen zumeist auf einer offline Bestimmung von Metaboliten, Markermolekülen, Proteinen und Nährstoffen durch Probennahme und zeit- und kostenintensive Analysen. Diese Verfahren liefern die relevanten Informationen über den Zustand der Zellkultur erst mit einer erheblichen zeitlichen Verzögerung, was ein effektives Eingreifen in die Kultivierung bei akutem Bedarf unmöglich macht. Die ebenfalls weitverbreitete mikroskopisch, morphologische Überwachung von 3D-Zellkulturen gibt zwar einen unmittelbaren Eindruck vom Zustand der Zellen, allerdings lassen sich hier keine Stoffwechselvorgänge überprüfen, die auf sich anbahnende Mangelzustände oder Änderungen im Zellmetabolismus hinweisen. Die im Teilvorhaben zu erforschende Optosensorik setzt genau hier an. Sie ermöglicht eine Echtzeit-Überwachung der relevanten physiologischen Parameter in 3D-Zellkulturen, um eine kontrollierte Kultivierung von Sphäroiden zu gewährleisten.

1.3 Stand der Technik

Die Analyse grundlegender Zellfunktionen ist die Basis zum Verständnis der physiologischen Mechanismen in komplexen Geweben oder Organen. Zelluläre Funktionen entstehen durch das koordinierte Zusammenspiel zahlreicher biochemischer Komponenten wie Proteine, Lipide, Ionen sowie kleine anorganische und organische Moleküle.

In den meisten Fällen erfolgt die Kultivierung von 3D-Zellkulturen nach etablierten Protokollen, die auf Erfahrungswerten bzgl. Medienwahl, Inkubationsatmosphäre und -dauer beruhen. In diesen „BlackBox“-Verfahren wird häufig erst am Ende der Inkubation sichtbar, ob die Kultivierung erfolgreich war oder nicht. Dazu findet zumeist eine mikroskopische Kontrolle der Zellfitness und Zellanzahl / Zellaggregatgröße statt.

Daneben gibt es eine Vielzahl von Systemen zur Messung von Markermolekülen, Proteinen, Nährstoffen und Metaboliten außerhalb der Kultur. Diese erfordern eine Probennahme und eine aufwändige Aufarbeitung der Probe sowie ausgefeilte Analysetechniken wie z. B. Kapillarelektrophorese, Massenspektroskopie oder enzymatische Assaysysteme. Durch die Probennahme wird ein Teil des Mediums entfernt und insbesondere bei geringen Kulturvolumen kann dies die Kultivierung selbst beeinflussen oder deren Ende bedeuten.

Einige Parameter können direkt im Zellmedium beobachtet werden. So ist z. B. Phenolrot Bestandteil der meisten Nährmedien (ca. 15 mg/L) und dient als pH-Indikator sowie zum Aufzeigen von Bakterienverunreinigungen.

Eine andere Möglichkeit, Untersuchungen in der lebenden Zelle durchzuführen, liefern Fluoreszenzproteine wie GFP, die in der Zelle exprimiert werden. Dafür ist allerdings eine genetische Manipulation der Zellen erforderlich, die im Falle einer anschließenden medizinischen Anwendung der Zellverbünde nicht gestattet ist.

Ein Beispiel hierfür stellt der 3D Cell Viewer von Allen Cell Explorer da. Er nutzt eine repetitive, quantitative mikroskopische Analyse von zuvor genetisch veränderten Zellen, die fluoreszenzmarkierte Proteine bilden, die dann innerhalb von einzelnen Zellen optisch verfolgt werden können. Durch einen drehbaren Mikroskoptisch werden hochauflösende Bilder von allen Seiten der Zelle gemacht, die dann im Rechner zu einem 3D-Bild zusammengesetzt werden. Eine derartige Technik, die einen Eingriff in das Zellgenom voraussetzt, ist für den geplanten Einsatz in unserem Multisensorsystem nicht geeignet. Für die biochemische Analytik auf zellulärer Ebene in Echtzeit stehen derzeit v.a. elektrochemische und optische Messmethoden zur Verfügung. Bei den elektrochemischen Methoden kann u.a. durch die Verwendung von spezifischen Enzymelektroden die Ansäuerung in der unmittelbaren Zellumgebung quantifiziert werden und zur Bestimmung von pH und Glukose genutzt werden. Allerdings sind solche elektro-chemischen Methoden in ihren Anwendungen beschränkt, da sie nicht potentialfrei arbeiten und auf Elektrolytverbrauch basieren.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben den Projektpartnern Universität Potsdam, Ibidi GmbH, CO.DON AG und Argos Messtechnik GmbH wurden im Rahmen einer Umstrukturierung des Projektes auch Versuche bei der InSphero durchgeführt. Diese Schweizer Firma arbeitete als assoziierten Partner ohne eigene Förderung im Projekt mit.

Hauptteil

1.1 Ergebnisse und Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen**1.1.1 << Initiierung des Projektes >>**

Zu Projektstart wurden die technologischen Erfahrungen der Partner gebündelt und der Zielsetzung des APs entsprechend in ein gemeinsames Konzept zum Aufbau des 3D-Cell-Readers überführt.

PreSens hat dabei auf der Basis seine bisherigen Technologien eine Abschätzung zu den Möglichkeiten der neu zu erforschenden und aufzubauenden chemisch-optischen Multiparameter-Sensorsysteme gegeben. Gemeinsam mit den Partnern CO.DON AG, Ibidi GmbH, Argos Messtechnik GmbH und dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam wurde unter Leitung von PreSens ein detailliertes Anforderungsprofil mit den benötigten technischen Spezifikationen für den 3D-Cell-Reader erstellt.

Eine einfache, schnelle, präzise und akkurate online Messung mit geringstmöglichem Einfluss auf den Zellwachstumsprozess, sowie eine visuelle Ergebnisdarstellung (Diagramme, Konturkarte, 3D-Karten) wurden als grundsätzliche Anforderungen an den 3D-Cell-Reader herausgearbeitet. Um die visuelle Darstellbarkeit auch bei kompletter Intransparenz der zu untersuchenden Proben gewährleisten zu können, wurde eine Immobilisierung der Sensorpartikel in einer sensitiven Schicht an der Gefäßwand angestrebt.

Die Evaluierung verschiedener Detektionsmechanismen im Hinblick auf diese Anforderungen und für die Analyten Sauerstoff, pH, CO₂, Glukose, Laktat und Ammonium ergab, dass für diese Analyten eine Kombination von optischen Fasern und immobilisierten Sensorpartikeln die beste Wahl ist, um genügend „Messpunkte“ zu haben und die gewünschte Ortsauflösung zu erhalten. Die Messungen müssen mit einer Kamera durchgeführt werden, um in beiden Fällen die gleiche Art von Daten zu erhalten, d.h. RGB-Intensität der Pixel.

1.1.2 << Erarbeiten der Grundlagen für ein Spektrometer mit Hadamard-Lichtquelle, welches Spektren schneller ausliest und höher auflöst >>

Ziel dieses Arbeitspaketes war es die Grundlagen für ein Spektrometer mit Hadamard-Lichtquelle zu erarbeiten. Dieses Arbeitspaket wurde in der ersten Projekthälfte vom später ausgeschiedenen Projektpartner Argos bearbeitet. Daraufhin hat PreSens diese Aufgabe mit eigenen, neuen Ansätzen fortgeführt.

So wurde das Konzept der Lichtquelle viel kompakter und kompatibel zu einer Kamera ausgeführt. Um die im Projekt neu entwickelten analytensensitiven Fluorophore in derselben Probe zuverlässig zu unterscheiden und ihre Fluoreszenzintensität quantitativ auszuwerten, wurden die Lichtsignale dann mittels einer CCD Kamera ausgelesen.

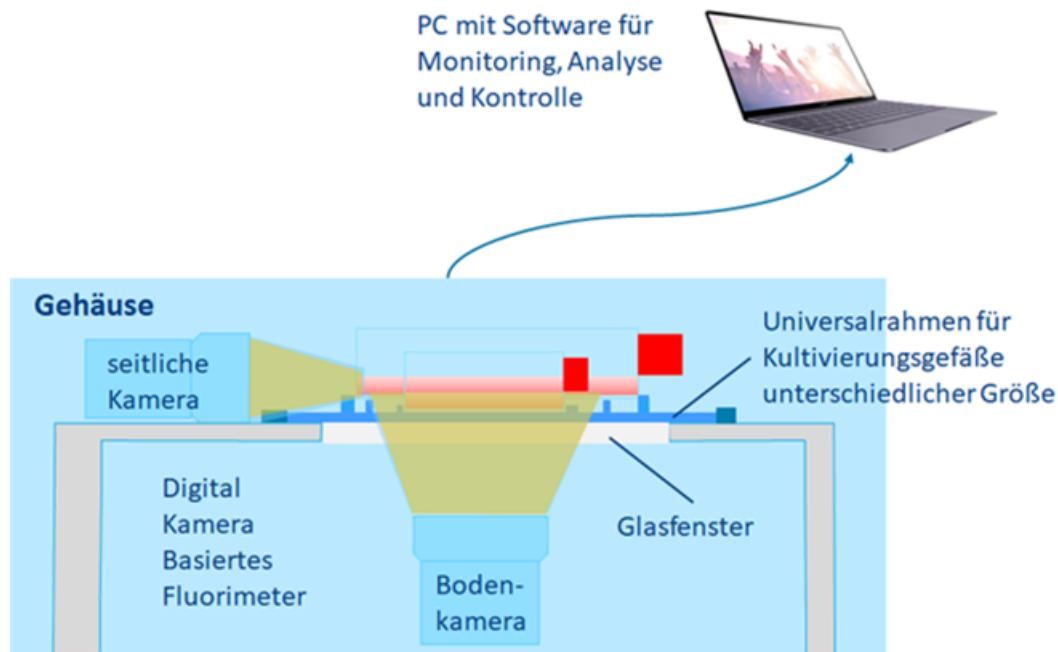
1.1.3 << Erarbeiten der Grundlagen für ein Auslesesystem zur 3D aufgelösten Messung der Parametern Sauerstoff, pH, CO₂, Chlorid, Glukose, Lactat und Ammonium >>

In diesem Arbeitspaket wurde ein Opto-elektronisches Scannersystem zur ortsgenauen Sensorsignaldetektion in dreidimensionalen Zellaggregaten erforscht. Neben Sauerstoff, pH und CO₂ wurden vier neue, relevante Parameter (Chlorid, Glukose, Laktat und Ammonium) auf Ihre Eignung für die Detektion mittels chemisch-optischer Sensorsysteme überprüft werden. Dazu war eine Auswertesoftware notwendig, die in der Lage ist, die Messwerte von bis zu 4 Analyten rechnerisch zu verarbeiten und in einer für den Benutzer intuitiven und gleichzeitig informativen Art und Weise zu visualisieren.

Entsprechend der Zielsetzung wurde ein Hardwareaufbau für ein Auslesesystem zur 3D aufgelösten Multiparametermessung in verschieden geformten Zellkulturgefäßen erforscht und errichtet (Abbildung 1). Die Forschung zur Datenaufbereitung der 3D-Signale erfolgte am Beispiel der Sauerstoffdetektion.

Die Rohdaten wurden mittels der beiden seitlich und unter dem Zellkulturgefäß platzierten Kameras gewonnen. Diese messen die Fluoreszenz der O₂-Sensorpartikel, die in einer Matrizie auf der Gefäßwand immobilisiert wurden und unter Lichtanregung und in Abhängigkeit von der O₂-Konzentration ein reversibles Signal zeigen.

A)



B)

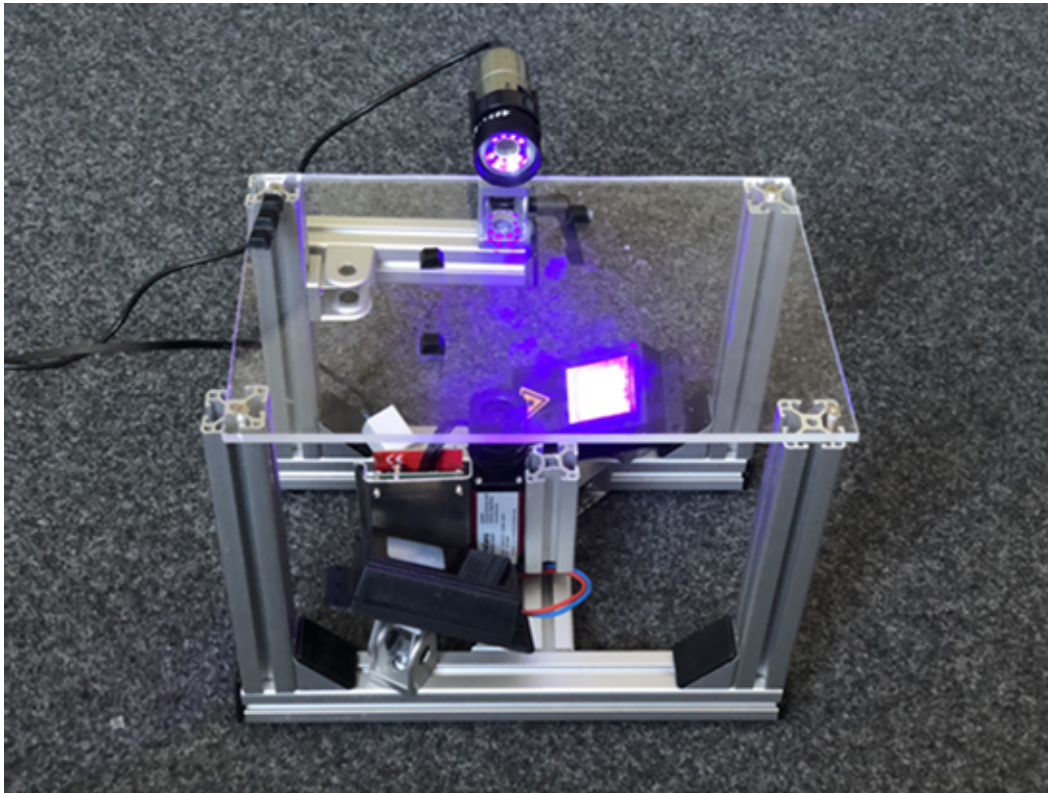


Abbildung 1: A) Skizze zum prinzipiellen Aufbau der Hardware für ein 3D Scannersystem

B) Foto des Testaufbaus der Messhardware (ohne Zellkulturplatte) im Labor

Bei der Entwicklung der Auswertesoftware zur Verarbeitung und Darstellung der Messwerte wurden neben der rein rechnerischen Verarbeitung der Rohdaten auch unterschiedliche Formen der graphischen Darstellung evaluiert. Die Abbildung 2 zeigt zwei Umsetzungen als Softwarelösung. Links eine Aufnahme der 3fach gestuften Sensoren in der T-Flasche und rechts die Umsetzung als laterale Auflösung des Sensorsignals für die flächige Messung. Die Auswertesoftware ist in der Lage die Messwerte von bis zu 4 Analyten zu verarbeiten.

Die Forschung an den Parametern Chlorid, Ammonium, Glukose und Laktat führte zu 2 neuen Sensoren. Sowohl der Glukose- als auch der Laktatsensor konnten dabei enzymatisch auf Grundlage der Detektion von Sauerstoffkonzentrationsänderungen realisiert werden.

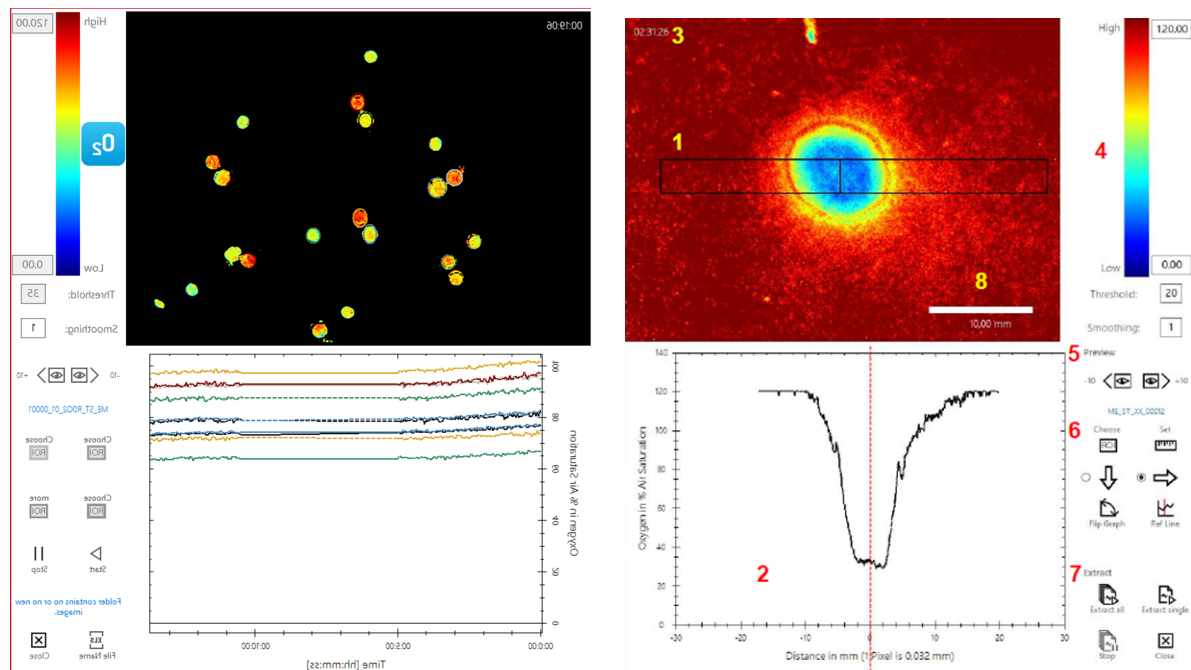


Abbildung 2: Umsetzungen der Analytmessung als Softwarelösung. Links eine Aufnahme der 3fach gestuften Sensoren in der T-Flasche (faserbasierter Ansatz) und rechts die Umsetzung als laterale Auflösung des Sensorsignals für die flächige Messung.

1.1.4 << Überprüfung der Funktion der Mess-Systeme in Zellbasierten Assay-Anwendungen >>

Da der Herstellungsprozess für Zellkulturen nicht durch die Sensortechnik beeinträchtigt werden darf, wurde in diesem Arbeitspaket evaluiert, ob und wenn ja, wie die Gegenwart der neuen Sensormaterialien die Anzucht von humanen Zellen in zellbasierten Assay-Anwendungen beeinflusst.

Dazu wurden in Kooperation mit den Projektpartnern InSphero und Ibidi Versuchsreihen in zellbasierten Anwendungen durchgeführt. Dabei wurde insbesondere getestet, ob im realen Prozess technische Problem auftreten wie z. B. Querempfindlichkeiten oder zu geringe Signalstärken.

Aus den Arbeiten unter 1.1.3 wurden umfangreiche Erkenntnisse zur Interpolation von Datensignalen gewonnen und so konnte die Evaluierung der Messtechnik in diesem Arbeitspaket fortgeführt werden, um hier einen „Mosaikansatz“ zur erforschen. Dieser ist ergebnisgleich mit dem Hadamardansatz und bediente sich einer konsequenten räumlichen Trennung der analytsensitiven Schichten. Dabei besteht der Matrixsensoraufbau aus einem regelmäßigen Raster aus Sensorfeldern für die 4 Analyte CO₂, Glukose, O₂ und pH (Abbildung 3 A). Mit Hilfe einer LED-Anordnung wird der Mosaiksensordatensatz angeregt und das emittierte Rohsignal aller 4 Parameter mittels Kamera in der Gesamtfläche der Matrix erfasst. Die Bildsensoren werden sodann getrennt ausgewertet. Dabei werden die für den jeweiligen Analyten relevanten Signalbereiche

isoliert und die der übrigen Analyten maskiert, so dass diskrete Konzentrationsfelder berechnet werden können.

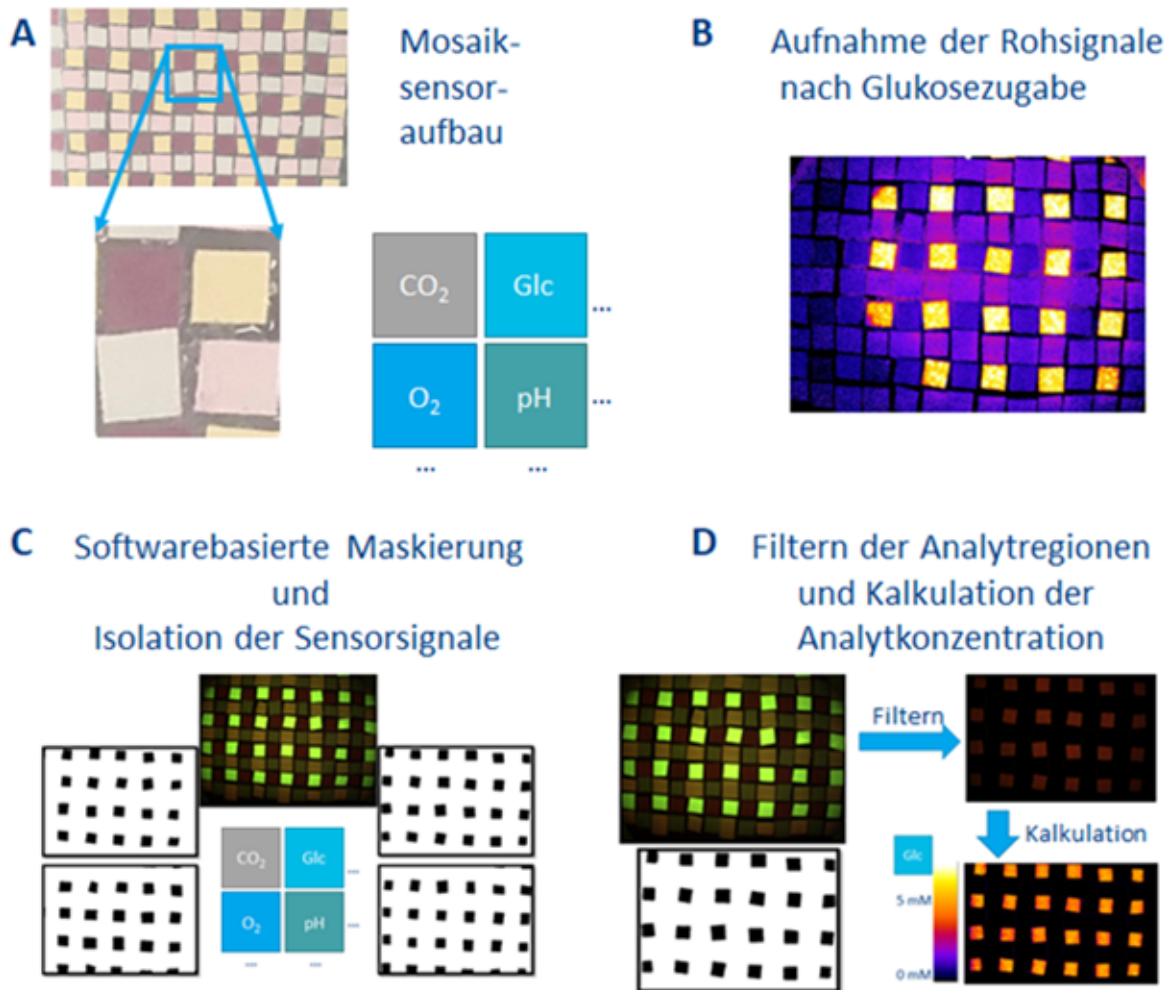


Abbildung 3: Aufbau des Mosaiksensors und Ablauf der Analytmessung am Beispiel der Glukosezugabe

1.1.5 << Evaluierung des Zellwachstums durch simultane Bestimmung physiologischer Parameter mit dem 3D-Cell-Reader >>

Im diesem Arbeitspaket standen erste konkrete Messungen an den Leberzellen unter Einsatz mehrere Messkomponenten und deren Datenauswertung im Mittelpunkt.

Die Kombination der pH- und Sauerstoffsensoren im gemeinsamen Einsatz wurde beim Projektpartner Uni Potsdam realisiert. Für die Messungen wurden humane Leberkrebszellen (Hep G2 Zellen) eingesetzt. Sowohl reine pH- und Sauerstoffmessungen als auch eine kombinierte pH-/Sauerstoffmessung wurde in Gegenwart von unterschiedlichen Zellkonzentrationen in RPMI-Medium erfolgreich durchgeführt.

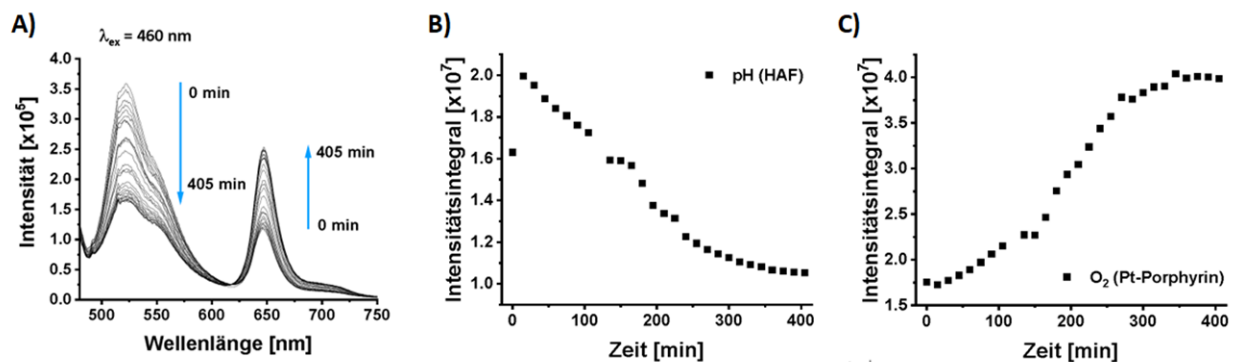


Abbildung 4: Erste pH/O₂-Dualmessungen mit Hep-G2-Zellen und PreSens Sensoren. Die Zellkonzentration betrug 1 MioZellen pro mL und die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 405 Minuten.

A) Emmissionsspektren B) pH-Verlauf C) O₂-Verlauf

Die gemeinsame Messung der Parameter pH, Sauerstoff, Glukose und Lactat wurde durch eine Interpolation der 2D-Sensorantworten aller Analyten gewonnen. Daraus ergibt sich ein flächiges Konzentrationsverlaufprofil über den gesamten Mosaiksensorbereich. Abbildung 5 zeigt einen solchen Verlauf.

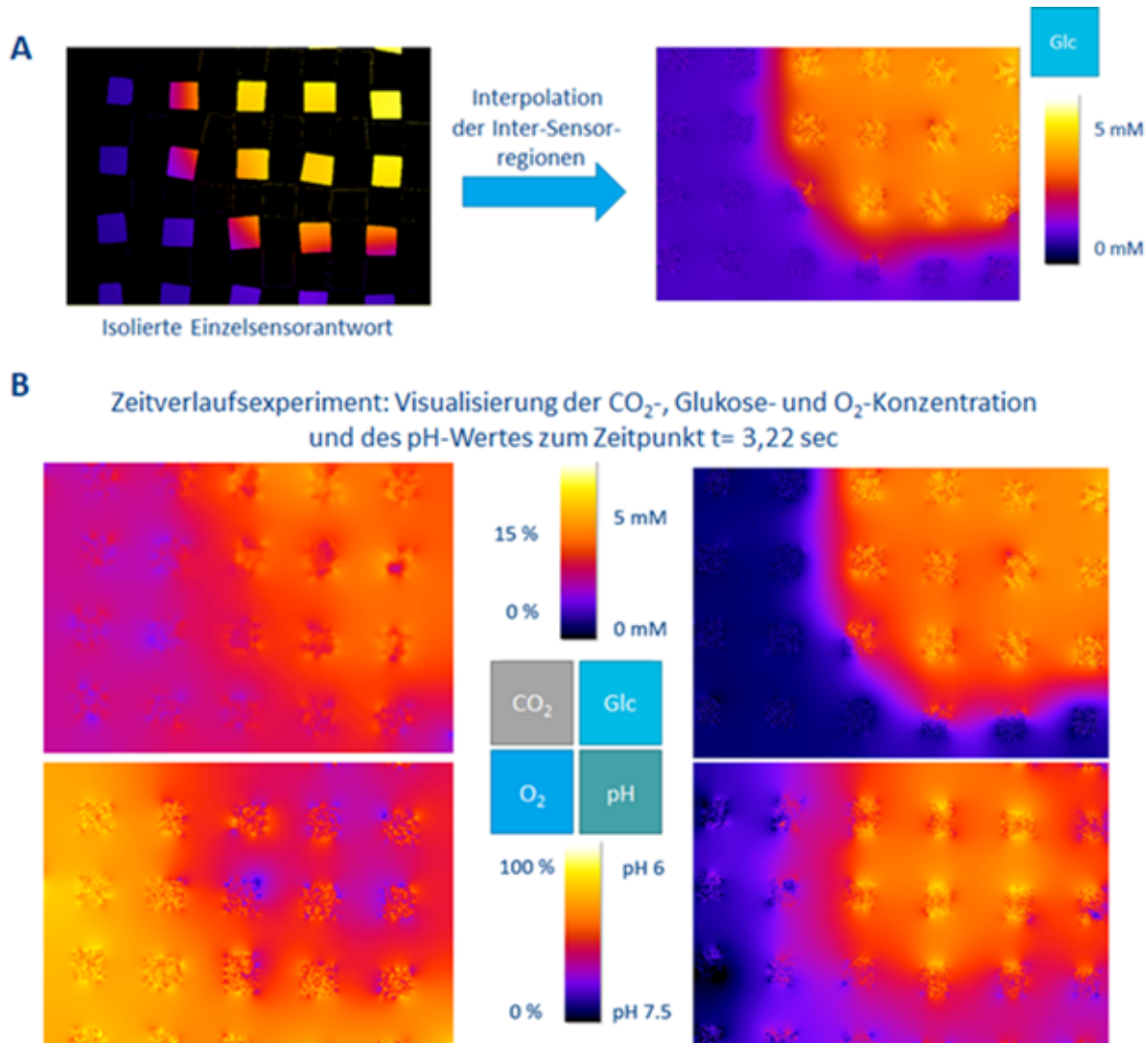


Abbildung 5: A) Flächige Interpolation der Einzelsensorsignale zur Ermittlung der Analytkonzentration in den Bereichen zwischen den Sensoren am Beispiel der Glukosekonzentration B) Zeitlicher und flächiger Verlauf der Konzentrationsänderung aller 4 Parameter (CO₂, Glukose, O₂ und pH)

Für die Nutzung des Mosaiksensors als Werkzeug für die Life Science ist die Kompatibilität mit den Bedingungen der Zellkultur notwendig. Bei der Evaluierung kam es beim Glukosesensor jedoch zu Herausforderungen bei der Sterilisierbarkeit. Daher wurde zunächst mit einer unsterilen Variante des Glukosesensors gearbeitet, was die Zugabe von Antibiotika notwendig machte. Während der Glukosesensor in Testlösungen stabil war und gute Signaländerungen zeigte, war in Medium mit Antibiotikum eine signifikante, konstante Drift im Sensorsignal zu beobachten. Nach einer erneuten Überarbeitung des Sensormaterials wurde eine Variante gefunden, die sich durch Bestrahlung ohne Aktivitätsverlust sterilisieren lässt. Messungen im Realsystem bei ibidi zeigten jedoch auch hier noch Interaktionen des Sensors mit Bestandteilen des Mediums. Die Beseitigung dieser Querempfindlichkeit konnte bis Ende der Projektlaufzeit nicht mehr abgeschlossen werden. Bis zur Marktreife wird hier noch eine Optimierung notwendig werden.

1.2 Verwertung

Erstmals kann ein Zellverbund nicht nur mikroskopisch und damit morphologisch in drei Dimensionen erfasst werden, sondern es kann auch die Metabolitverteilung innerhalb des Zellaggregats räumlich und im zeitlichen Verlauf detektiert und dargestellt werden.

Auch die simultane Echtzeitüberwachung von bis zu 4 Analyten mit Auflösung auf Zellebene machen die technische Überlegenheit der innovativen Sensoren gegenüber den derzeit am Markt befindlichen Systemen aus.

Darüber hinaus bietet die modulare Bauweise Sensoren für einzelne Analyte, die nach Kundenwunsch kombinierbar sind, ein genau auf die Bedürfnisse des Kunden abgestimmte Konfektionierung des Sensorsystems, was wiederum ein optimales Verkaufsargument darstellt.

Nach Projektende soll der Demonstrator innerhalb von 2-3 Jahren zu einem marktreifen modularen optischen 3D-Cell-Reader zur (bio)chemischen Multiparameterüberwachung in Isolatoren weiterentwickelt werden.

Darüber hinaus wird die neu entwickelte Multiparameter-Messtechnik auch in andere Messgeräte für die Bereiche biotechnologische Prozessüberwachung, biologische und medizinische Grundlagenforschung oder Umweltanalytik integriert werden und direkt durch PreSens vermarktet werden.

PreSens forscht und produziert ausschließlich am Standort Regensburg, damit ist eine Verwertung der Ergebnisse in Deutschland garantiert.

1.3 Fortschritte und Ergebnisse Dritter

Es sind keine Ergebnisse Dritter mit entscheidendem Einfluss auf das Vorhaben bekannt geworden.

2 Anhang

2.1 Veröffentlichungen

Als Firma plant PreSens ausschließlich werbliche Publikationen, welche die Markteinführung begleiten werden.

2.2 Schutzrechte

Im Berichtszeitraum sind folgende Erfindungen/Schutzrechte angemeldet worden:

Unsere Ideen zur innovativen Sensoranordnung haben wir bereits zu Beginn des Projekts zur Patentanmeldung eingereicht (Titel: SENSORANORDNUNG UND MESSVERFAHREN, Anmelder: PreSens Precision Sensing GmbH, Anmeldenummer: DE 10 2018 130 299.1, Anmeldetag: 29.11.2018). Da das Projekt seither vielversprechend weitergelaufen ist, haben wir dann noch innerhalb der Priorität aus der DE-Anmeldung eine US-Anmeldung hinzugefügt (Anmeldedaten: US 16/689,393; 20.11.2019).

Projektinformation

zum Vorhaben: Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur

des Verbundprojekts: Optischer 3D Multi Parameter-Reader für die Prozesskontrolle bei der Herstellung von zellbasierten Therapeutika (3D-Cell-Reader)

Zuwendungsempfänger: PreSens Precision Sensing GmbH

Förderkennzeichen: 13N15031

Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2018 – 31.07.2022

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt.

1 Projektziele

Eine Deregulierung des Zuckerhaushaltes führt zur Fehlfunktion von Leber und Bauchspeicheldrüse und ist u.a. die Ursache für Typ-2 Diabetes und Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD, Fettleber, Leberfibrose, etc.). Steigende Erkrankungszahlen erfordern neue, effektivere und kostengünstige Medikamente, die einer großen Anzahl von Patienten zugänglich sind. Dies wiederum erfordert zum einen ein besseres Verständnis der Erkrankungen und zum anderen möglichst realitätsnahe Testmöglichkeiten für neue Wirkstoffe. Beides kann durch die Entwicklung und Bereitstellung von zellbasierten Assays und Leber- und Pankreasgewebemodellen gewährleistet werden.

Derzeitige Verfahren zur Überwachung und Standardisierung von dafür benötigten 3D-Zellkulturen beruhen auf zeit- und kostenintensiven Einzelanalysen. Diese liefern die relevanten Informationen über den Zustand der Zellkultur erst mit einer erheblichen Verzögerung und nur zu bestimmten Zeitpunkten, so dass der Krankheitsprozess nicht verstanden wird.

Aktuell gibt es keine technische Möglichkeit zur direkten, sensorbasierten, simultanen Überwachung von mehreren Kultivierungsparametern mit hoher räumlicher Auflösung, obwohl der Bedarf an standardisierten und kontrollierten 3D-Zellkulturen und Organoiden stetig wächst. Die im Teilvorhaben zu erforschende Optosensorik setzt genau hier an. Sie ermöglicht eine Echtzeit-Überwachung der relevanten physiologischen Parameter in 3D-Zellkulturen, um eine optimale Kultivierung zu gewährleisten.

2 Projektinhalte

Um das Ziel einer neuartigen, optischen 3D Multi Parameter-Sensorik für den Nachweis chemischer und biochemischer Parameter in Zellkultursystemen zu erreichen, wurde zunächst das Analytspektrum für die Chemisch-optische Sensorik erweitert. Dazu wurden vier neue, relevante Parameter (Chlorid, Glukose, Laktat und Ammonium) auf ihre Eignung für die Detektion mittels chemisch optischer Sensorsysteme überprüft.

Im nächsten Schritt wurde ein Verfahren erforscht, mit dem das Auslesen von zwei oder mehr unterschiedlichen Parametern gleichzeitig möglich ist. Anschließend wurde ein maßgeschneidertes Auslesesystem bestehend aus Opto-Elektronik, Messgerät und Messsoftware konzipiert, erforscht und gebaut. Die Funktionalität der daraus resultierenden ersten Arbeitsversion des Multiparameter-Sensorsystems wurde dann am 3D-Zellmodellsystem in Zusammenarbeit mit dem Projektpartnern UPPC sowie ibidi charakterisiert. Zusätzlich wurden Tests in Laboren des assoziierten Partners InSphero in der Schweiz durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Projekt ist es PreSens gelungen eine chemisch-optische Multiparameter Sensorik für die gleichzeitige Messung von CO₂, Sauerstoff, Glukose und pH-Wert zu erforschen und deren Funktionsfähigkeit zu testen. Dafür wurden neue Fluorophore, also chemische Verbindungen, die bei Lichtanregung mit einer bestimmten Wellenlänge und in Gegenwart des zu messenden Analyten, Licht einer anderen Wellenlänge wieder emittieren können, entwickelt.

Um die im Projekt neu entwickelten Fluorophore in derselben Probe zuverlässig zu unterscheiden und ihre Fluoreszenzintensität quantitativ auszuwerten zu können, wurde ein Spektrometer mit einer komplexen steuerbaren LED-Lichtquelle und einem kamerabasierten Detektor konstruiert. Mit Hilfe der LED-Anordnung werden die in einem regelmäßigen Raster angeordneten Sensorfelder für die 4 zu messenden Analyte CO₂, Sauerstoff, Glukose und pH-Wert angeregt und das emittierte Rohsignal aller 4 Parameter mittels Kamera erfasst. Durch Auswertung der Bildsensordaten erhält man in Echtzeit ein flächiges Konzentrationsverlaufsprofil über den gesamten Sensorbereich. Zusätzlich wurde ein softwarebasiertes Verfahren entwickelt, welches aus einzelnen Informationen ein dreidimensionales Bild der zu bestimmenden Analyten erstellen kann.

Die simultane Echtzeitüberwachung bei gleichzeitigem Erhalt der Lebensfähigkeit der Zellkultur machen die technische Überlegenheit der innovativen Sensoren gegenüber den derzeit am Markt befindlichen Systemen aus.

4 Nutzen bzw. Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Im Projekt 3D-Cell-Reader wurden die Grundlagen für ein System erschaffen mit dem neue Medikamente unter möglichst realen Bedingungen – aber ohne den Einsatz von Versuchstieren - getestet werden können.

Die Anwendung des 3D-Cell-Readers bei der Erforschung von Leber- und Bauchspeicheldrüsenerkrankungen und bei der Herstellung von Assays und Gewebemodellen für die Wirkstofftestung, ermöglicht es neue Erkenntnisse zu grundlegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung, des Verlaufs und der Therapie auf Zellebene zu generieren. Damit wird langfristig eine bessere Patientenversorgung durch Präventionsmassnahmen und Medikamente ermöglicht.

Die Bausteine des 3D-Cell-Reader sollen auch bei anderen bio(techno)logischen Produktionsprozessen und in der medizinischen Forschung mit anderen Zellkulturarten eingesetzt werden.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Optischer 3D Multi Parameter-Reader für die Prozesskontrolle bei der Herstellung von zellbasierten Therapeutika (Akronym: 3D-Cell-Reader) Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] John, Dr. Gernot Thomas	5. Abschlussdatum des Vorhabens Juli 2022
	6. Veröffentlichungsdatum 08.03.2023
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) PreSens Precision Sensing GmbH Am BioPark 11 93053 Regensburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 13N15031
	11. Seitenzahl 16
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben keine
	14. Tabellen keine
	15. Abbildungen 5
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Aktuell gibt es in 3D-Zellkulturen keine technische Möglichkeit zur direkten, sensorbasierten, simultanen Überwachung von mehreren Kultivierungsparametern mit hoher räumlicher Auflösung, obwohl der Bedarf an standardisierten und kontrollierten 3D-Zellkulturen und Organoiden stetig wächst. Daher war das Ziel des Teilvorhabens „Erarbeitung der Grundlagen für ein Auslesesystem für die Messung von bis zu 4 physiologischen Parametern in Zellkultur“ mittels Optosensorik eine Echtzeit-Überwachung relevanter physiologischer Parameter in 3D-Zellkulturen zu ermöglichen, um eine optimale Kultivierung zu gewährleisten. Im Projekt ist es gelungen eine chemisch-optische Multiparameter Sensorik für die gleichzeitige Messung von CO ₂ , Sauerstoff, Glukose und pH-Wert zu erforschen und deren Funktionsfähigkeit zu testen. Die Anwendung des 3D-Cell-Readers bei der Erforschung verschiedener Erkrankungen und bei der Herstellung von Assays und Gewebemodellen für die Wirkstofftestung, ermöglicht es neue Erkenntnisse zu grundlegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung, des Verlaufs und der Therapie auf Zellebene zu generieren. Damit wird langfristig eine bessere Patientenversorgung durch Präventionsmassnahmen und Medikamente ermöglicht.	
19. Schlagwörter Sensorik, 2D und 3D Zellkultur, Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMPs), Prozesskontrolle	
20. Verlag	21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. type of document (e.g. report, publication) Final report
3. title Optical 3D multi-parameter reader for process control in manufacturing of cell-based therapeutics (acronym: 3D cell reader) Development of the basics for a readout system for the measurement of up to 4 physiological parameters in cell culture	
4. author(s) (family name, first name(s)) John, Dr. Gernot Thomas	5. end of project July 2022 6. publication date March 08, 2023 7. form of publication Final report
8. performing organization(s) (name, address) PreSens Precision Sensing GmbH Am BioPark 11 93053 Regensburg	9. originator's report no. 10. reference no. 13N15031 11. no. of pages 16
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references none 14. no. of tables none 15. no. of figures 5
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	
18. abstract Currently, there is no technical possibility in 3D cell cultures for direct, sensor-based, simultaneous monitoring of multiple cultivation parameters with high spatial resolution, although the need for standardised and controlled 3D cell cultures and organoids is constantly growing. Therefore, the aim of the sub-project "Development of the basics for a readout system for the measurement of up to 4 physiological parameters in cell culture" was to enable real-time monitoring of relevant physiological parameters in 3D cell cultures by means of optosensor technology in order to ensure optimal cultivation. The project has succeeded in researching a chemical-optical multi-parameter sensor system for the simultaneous measurement of CO ₂ , oxygen, glucose and pH value and in testing its functionality. The application of the 3D cell reader in the research of various diseases and in the production of assays and tissue models for drug testing, makes it possible to generate new insights into fundamental mechanisms of disease development, progression and therapy at the cellular level. This will enable better patient care in the long term through preventive measures and medication.	
19. keywords Sensor technology, 2D and 3D cell culture, advanced therapy medicinal products (ATMPs), process control	
20. publisher	21. price