

**Sachbericht für den Zeitraum 1.1.2004-30.4.2004 und Abschlußbericht  
für das Verbundprojekt " Advanced Nanotiter Technology (ANT)  
im Förderprogramm „Mikrosystemtechnik 1994-1999“**

Förderkennzeichen:16SV1257

Zeitraum: 1.11.2000 - 30.4.2004

Koordinator: Laser-Laboratorium Göttingen (LLG)

Projektteilnehmer: EVOTEC OAI AG, Dr. Karsten Gall und Dr. Stefan Jäger, 22525 Hamburg, Schnackenburgallee 114. Tel: 040 56081 262, Fax: 040 56081 222.

Unterauftragnehmer: MPI für Biophysikalische Chemie Göttingen, Dr. Petra Schwille, 37077 Göttingen, Am Faßberg 11. Derzeitige Adresse: Prof. Dr. Petra Schwille Biophysics/BioTec TU Dresden c/o Max-Planck-Institute for Molecular Cell Biology and Genetics Pfotenhauerstr. 108 D-01307 Dresden Tel: +49 351 210 1444 Fax:+49 351 210 1409 Email: pschwil@gwdg.de, Secretary Claudia Lorenz: *Tel. +49 351 210 1402.*

Projektleiter: Dr. Stefan Jäger

## **I. Ausgangslage: Zielsetzung des geförderten Projektes und Stand der Technik**

Die Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen erfordert eine erhebliche Beschleunigung des aktuellen Screening-Prozesses, wobei auch wirtschaftliche Aspekte (z. B. Kosten für anfallende Reagenzien) eine Rolle spielen. Dies kann grundsätzlich auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, die alle Ziele dieses Projektes waren:

- 1) Beschleunigung der existierenden Verfahren durch Entwicklung neuer, schnellerer Detektionstechniken. -> siehe Kreuzkorrelation in Zellen.
- 2) Optimierung bestehender Markierungsverfahren und Strategien zur Umgehung von Markierungsverfahren. -> siehe Klonieren von GFP (Green Fluorescent Protein) an relevante Proteine.
- 3) Entwicklung von neuen, robusten Ausleseparametern zur Evaluierung der Ergebnisse, ausgehend von den Detektionstechniken. -> siehe Amplitude der Kreuzkorrelation, Zweiphotonen-Koinzidenzanalyse.
- 4) Reduzierung der eingesetzten Mengen. -> siehe Screening Volumen (bis runter zu 1 µL für Zellen).

- 5) Beschleunigung des gesamten Screening-Prozesses durch den verstärkten Einsatz von lebenden Zellen in der Stufe des Ultra-Hochdurchsatz-Screenings. Die Qualität der gewonnenen Daten erhöht sich aufgrund eines hohen Informationsgehaltes und führt zu Einsparungen in der Anzahl der benötigten unterschiedlichen Screens für eine Substanzbank (Screening library). -> siehe Dispensiergerät für lebende Zellen und Kultivierungs-System für das reproduzierte Heranwachsen von Zellen im Screening Betrieb.

Schon in einem frühen Stadium der Wirkstoffsuche müssen pharmakodynamisch sowie möglichst auch pharmakokinetisch relevante Daten zu den in großer Menge anfallenden Substanzen (Screening library) gewonnen werden, um nach mehreren Kriterien erfolgversprechende Substanzen zu identifizieren und problematische Substanzen auszuschließen. Viele biologische Effekte lassen sich zwar in löslichen Assays, also in der Untersuchung von isolierten Molekülen, nachstellen. Allerdings sind die molekularen Zusammenhänge eines pharmakodynamischen Effektes für ein Wirkstoffgebiet oftmals noch nicht oder zumindest nicht vollständig erforscht, so dass es nicht möglich ist, die biologische Situation „im Reagenzglas“ nachzustellen und in einen Screening-Assay umzusetzen. Assays an Zellen und Zellverbänden aus *in-vitro* Zellkulturen bieten die Möglichkeit, solche Notwendigkeiten zu adressieren. Die Pharmakodynamik von Substanzen kann so an einer lebenden Einheit, die alle hierfür notwendigen Signalstoffe und Stoffwechselfvorgänge beinhaltet, ermittelt werden. Zudem können an Zellen mehrere Informationen gleichzeitig gewonnen werden (z. B. Untersuchung der erwünschten und einer toxischen Wirkung). Zellen aus Zellkulturen sind grundsätzlich einsetzbar für Ultra-Hochdurchsatz-Screening Verfahren, da sie in den kleinen Volumina (Mikro- bis Nanoliter-Bereich) in für eine Statistik ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden können und auch ausreichend robust sind, um reproduzierbare Screening-Anordnungen zu erlauben. In gewissem Umfang können sogar Daten zur Pharmakokinetik gewonnen werden, z. B. Transportstudien für die intestinale Absorption oder den Wirkstoffmetabolismus.

Die Beschleunigung der existierenden Screening-Verfahren sowie der umfangreiche Einsatz von Zellkulturen im Ultra-Hochdurchsatz-Screening ist nur durch neue technologische Lösungen möglich, wie sie in diesem Projekt mit „Advanced Nanotiter Technology“ umschrieben sind. Sie umfassen neue Liquid-Handling Techniken (Evotec) und neue Detektionsverfahren (MPI Göttingen). Die Liquid-Handling Techniken umfassen Systeme zur Handhabung von Proben (lösliche biologische Substanzen und Bestandteile von Zellen) im 1 µl-Bereich (Gesamtvolumen) sowie Systeme zur Verteilung, Kultivierung und Bereit-

stellung von Zellen für Ultra-Hochdurchsatz-Screening Assays. Bei den Zellen kann es sich um suspendierte Zellen handeln oder auch um Zellen, die für ihre Physiologie und für die zu untersuchende Größe adhärent sein müssen, d. h. sich auf dem Probenträger anhaften, ausbreiten und gegebenenfalls noch differenzieren. Die Detektionsverfahren müssen diesen unterschiedlichen Gegebenheiten Rechnung tragen. Insbesondere die Messung von Effekten an lebenden Zellen erfordert den Einsatz von komplexen Detektionsstrategien wie z. B. den Einsatz von Scanning-Verfahren und Mehrphotonenanregung zur Unterdrückung des zellulären Hintergrundes bei Fluoreszenzmessungen.

Im Rahmen dieses Verbundprojektes hat EVOTEC die Erprobung und Modifikation verschiedener Liquid-Handling Alternativen übernommen (Zellverteilungsgerät und Kultivierungs-System).

### **Stand der Technik vor dem Start des Projektes**

Die Handhabung von löslichen Substanzen in wässrigen Puffern für den Bereich der Assayvolumina von  $\geq 1 \mu\text{l}$  ist bei EVOTEC etabliert. Hierfür werden Dispenser und Pipetten eingesetzt, die mit der Piezo-Technik und mit einer Genauigkeit von 3% und Tröpfchengrößen von 300 pl arbeiten. Für das geplante Zielvolumen von 100 nl müssen die bestehenden Systeme angepasst und hinsichtlich ihrer Präzision überprüft werden. Die Anpassung des Liquid-Handling für die Verteilung von Zellen bedarf einer längeren Entwicklungsphase. Keiner der bisher kommerziell erhältlichen Liquid-Handling Systeme für den Nanoliter-Bereich wurde bisher erfolgreich für Zellsuspensionen eingesetzt.

Als Probenträger stehen bisher Nanotiterplatten mit 1536 Wells (4  $\mu\text{l}$  Assayvolumen) und 2080 Wells (1  $\mu\text{l}$  Assayvolumen) zur Verfügung. Diese bestehen aus Silizium/Glas Verbänden oder aus Kunststoff mit Glasboden oder Böden aus Kunststoff-Folien. Nanotiterplatten und Mikroarrays mit kleineren Well-Inhalten sind zu entwickeln. Diese Entwicklung bedarf vor allem intensiver Materialforschung für die Kompatibilität mit Zellen, Biomaterialien und chemischen Substanzen sowie für die Ankopplung an die Detektionsverfahren. Weiterhin sind innovative Schritte zur Lösung des Problems der Verdunstung notwendig, welches mit kleiner werdenden Probenvolumina immer größere Bedeutung gewinnt. Ein einfacher Verdunstungsschutz, wie er in der bestehenden EVOscreen-Anlage zu Einsatz kommt, wird nicht mehr ausreichen.

Einer umfangreichen Entwicklungsleistung im Bereich der Probenträger bedarf es für die Anpassung an Zellkultursysteme. Im kommerziellen Bereich existieren als zelltaugliche

Probenträger lediglich 24 bis 96-Well Platten, mit und ohne Siebeinsätzen für die Zellbereitstellung mit Probenvolumina von 100 – 200  $\mu$ l. Sollen die Zellen in kleineren Volumina kultiviert werden, können Probleme bei der Versorgung mit wichtigen Gasen und Nährstoffen auftreten. Auch die Differenzierung von Zellen in sehr kleinen Welldimensionen muss überprüft werden, da sich ein Verbund aus sehr wenigen Zellen (100 – 1000) anders verhalten kann, als ein Verbund aus sehr vielen Zellen. Zellen sezernieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die das Verhalten der benachbarten Zellen beeinflussen. Auch das veränderte Volumen / Oberflächen Verhältnis kann die Zellversorgung und Zellverteilung erheblich beeinträchtigen.

## II. Abschlussbericht - Wissenschaftlich-technischen Ergebnissen (Evotec OAI)

### AP 1. Proben Handling

Beim automatisierten Handling von Zellen muss gewährleistet sein, dass die Zellen keinen Schaden nehmen. Um dies zu testen, konnte ein kommerziell erhältlicher Assay von Molecular Probes an die speziellen Erfordernisse der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie angepasst werden. Hiermit kann sowohl die Überlebensrate von Suspensionszellen nach Pipettier- bzw. Dispensierschritten, als aber auch der Einfluss cytotoxischer Wirkstoffe zuverlässig quantifiziert werden (Viability Test). Mit diesem Test konnte nun der Erfolg der nachfolgenden Arbeitspakete gut verfolgt werden.

#### AP 1.1. Evaluierung der „100.000 Proben Frage“

Damit Zellen und Beads genauso schnell dispensiert werden können, wie es schon bei den löslichen Assays (> 100.000 Proben pro 24 Stunden) der Fall ist, musste die elektromechanische Technologie durch eine rein mechanischen Methode ersetzt werden. Hierbei konnte auf eine kommerzielle Lösung der Firma Cartesian (SynQuad) zurückgegriffen werden, die an die Erfordernisse der bestehenden EVOscreen Anlage angepasst wurde. Ebenso konnte der Fluoreszenz Reader soweit optimiert werden, dass auch im Zusammenspiel sämtlicher Einzelkomponenten, inklusive Datenverarbeitung, ein Durchsatz von mehr als 100.000 Proben pro 24 Stunden unter Beibehaltung einer hohen Datenqualität erreicht werden konnte (Tab. 1, grau unterlegte Werte).

Channels	Binning	Exposure time / ms	Time per well / ms	Wells per day	Data amount per well / kB	Data amount per Day / GB
2	1	1000	1945	43144	5120	211
2	1	50	995	82082	5120	401
2	2	300	799	100797	1280	123
2	4	300	688	115847	320	35
1	4	50	396	190622	160	29

**Tabelle 1:** Probendurchsatz bei verschiedenen Readerkonfigurationen.

#### AP 1.2. Entwicklung eines HTS tauglichen Zellverteilungsmoduls

Mit Hilfe des Viability Tests konnte gezeigt werden, dass das von Evotec modifizierte Verteilungsmodul SynQuad der Firma Cartesian die hohen zellulären Anforderungen bzgl. Homogenität der Verteilung, Biokompatibilität und Ausfallsicherheit erfüllt (Abb. 1). Bei der