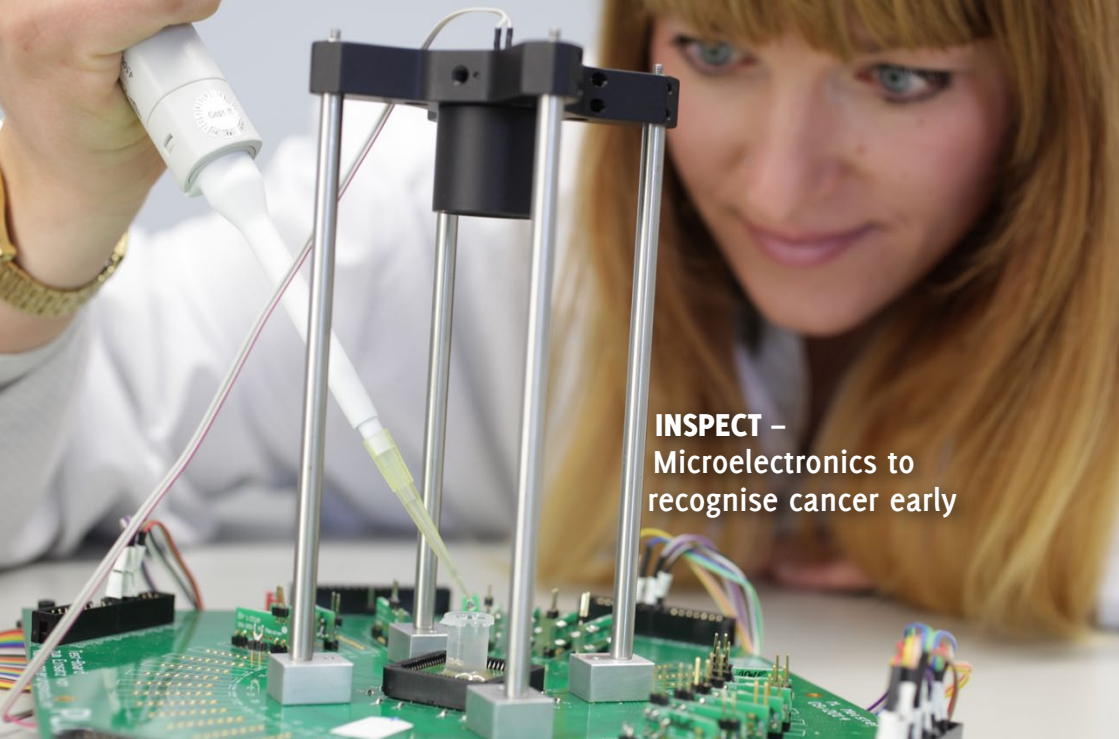




INSPECT – Microelectronics to recognise cancer early

Early experiments with a mobile testing system to contribute to integrated systems of personalised cancer diagnosis at an early stage. Photograph: IMMS.

Objectives and Overview

More than 500,000 people a year develop cancer in Germany.¹ Five years after being diagnosed with cancer, depending on the type of tumor, patients' survival rate is between 1 in 5 and 9 in 10.² The earlier the disease is discovered, the greater is the chance of cure. It is possible for cancer of the colon, which is the commonest form in Germany, to grow for a decade before giving rise to symptoms.³ There are certain types of cancer for which the patient's doctor can test rapidly on the spot, obtaining an immediate result and saving costly, time-consuming lab tests.

Present rapid tests no more than qualitative

The present state of the art includes the strip test on which antibody molecules have been deposited. These seeker molecules have a colour marker and will bind the target molecule to them, producing a result within 5 or 10 minutes: the answer is "yes"

¹ <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/was-ist-krebs/>

² im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung, http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html

³ <http://www.darmkrebs.de/ueberblick/>

or "no" according to the presence of a coloured line. However, varying strength in the colour of this line is not information that the user can interpret. It is also possible for a very pale line to be overlooked.

Future quantitative rapid tests for exact diagnosis

On the other hand, if it were possible to measure the exact concentration of certain molecules in sample fluids, reliable diagnosis could be achieved. Particularly in the case of cancer of the prostate, which is the commonest form of cancer for males in Germany,⁴ there would be a great improvement if the on-site diagnostics could include such quantitative analysis. Although the presence of PSA (prostate-specific antigen) may be an indicator of cancer, it is constantly being produced in the male body. A man less than 50 years old will have a PSA concentration of less than 2.5 ng/ml (the unit is in thousand-millionths of a gram, i.e. in nanograms, per millilitre). At over 70, a man will have a level around 6.5 ng/ml. It is possible for these values to vary independently of age; the cause may be inflammation, mechanical irritation or cancer. If there is a carcinoma developing, the patient's PSA concentration will be rising continuously. If the PSA concentration could be measured at regular intervals, reliable early diagnosis and early treatment would result.

> *Smart Jacket*
> *ENTOMATIC*
> *KOSERNA*
> *HoTSens*
> *INSPECT*
> *AFIA*

> *Contents*
* *Funding*

Microelectronics to measure antigen concentrations in colon and prostate cancer

In the INSPECT⁵ project, IMMS and other partners in Thüringen are developing a biological and microelectronic system of rapid diagnosis for immuno-oncological recognition of colon and prostate cancers in the early stages. It is the role of IMMS to develop the electronics, focussing on signal processing, particularly in the case of very weak signals, and efficient noise suppression for these. The starting point is the knowledge obtained from the GreenSense* project, which worked on a semi-conductor optical sensor array to serve as a diagnostic platform for infectious diseases.

Details and video for the INSPECT project:
www.imms.de.

More on the GreenSense project at
www.imms.de.

Preliminary experiments have been carried out to verify the ASIC (application-specific integrated circuit) against the new requirements and the biofunctionalisation of the chip surfaces. The first optical measurements of chemical reactions have also been carried out in direct contact between electronics and chemistry. These constitute the basis of the diagnostic system to be developed by the partners in the period up to 2019.

⁴ http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html

⁵ *Mikroelektronische Diagnostik-Plattformen für die personalisierte Krebsforschung und Mikro-Bioreaktoren.*

Immobilisation of the primary

antibodies

ASIC

Amplification of **analytes** from a sample

Marking of the analytes with secondary antibodies that have been **colour-coded**

Measurement of the **signal**

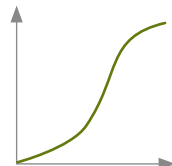
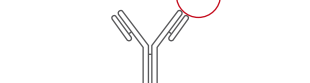
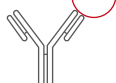


Figure 1: Basic principle, quantitative detection of PSA or haemoglobin analytes. Diagram: Senova/IMMS.

- 61
- > Smart Jacket
- > ENTOMATIC
- > KOSERNA
- > HoTSens
- > INSPECT
- > AFiA

Approach taken and preliminary studies

Fundamental principle and aims of the overall system

The biotechnical principles on which the new test system will be based are comparable with those for the strip test. The interaction between antibody and antigen is intended to enable detection of analytes in a sample: PSA in the case of prostate cancer and haemoglobin in the case of colon cancer.

As shown in Figure 1, the new aspect is that the primary antibodies are fixed vertically on the surface of a microelectronic chip (A). Sample fluid applied to the chip forms invisible antibody-antigen complexes (B) if any of the suspected PSA or haemoglobin antigens are contained in the fluid. It takes a second step to make these visible: secondary antibodies with a coloured marker are added. These dock onto the analytes of the antibody-antigen complexes (C). The coloured solution with the secondary antibodies which are not bound to the surface is then rinsed off. Those which are bound cause a change in the optical density, which is then detected and evaluated by the ASIC (D).

The luminous intensity is measured before and after the reaction, to determine the degree of attenuation. A logarithmic relation is then calculated between the two values. To achieve a diagnosis, the degree of accuracy must lie between 0.01 Bel and 1 Bel.

System setup

These reactions and the measurement process need to take place in a compact, mobile device shielded from light. It should be connected to the device to a computer or laptop using a standard interface. The software should manage the testing, display the data and process the data. The sample is inserted into the reaction chamber situated above the ASIC, so that the sample interacts with the system electrically and mechanically. Light sources produce homogenous illumination at various wavelengths and at a fixed distance from the chip. They will illuminate the sample at

- > Contents
- * Funding

constant luminous intensity for the duration of the test. This device is intended to enable doctors to make reliable tests for diagnostic purposes without recourse to the laboratory. The biofunctionalised microelectronics should enable users to test instantly, sparing them the additional effort of sample preparation.

> *Smart Jacket*

> *ENTOMATIC*

> *KOSERNA*

> *HoTSens*

> *INSPECT*

> *AFia*

> *Contents*

* *Funding*

Initial experiments as the foundation for the new chip development

For cancer to be diagnosed at a very early stage, the chip must be capable of recognising concentrations of antigens in the range of one nanogram per cubic centimetre. These low concentrations induce very weak fluctuations in the luminous intensity, between 0.01 Bel and 1 Bel.

IMMS has thoroughly investigated the technical feasibility of achieving this level of accuracy for the purpose of cancer diagnosis. As a first step an already available ASIC was evaluated to see how it would visualise varying levels of brightness in sample fluids where the concentration of particles is known.

This chip is quite large as it was developed for research purposes to meet different requirements: It was intended for detecting infectious diseases and contains a 6x7 matrix of photodiodes (Figure 2). It was designed for parallel detection of various pathogens by varied fluctuations in luminous intensity.

Article on this
research chip:
www.imms.de.

The optical principle in the signal conversion for this research chip is now to be transferred for use in cancer diagnosis and adapted to the new requirements in a new ASIC design.

TMB (tetramethylbenzidine) substrate solutions were deposited on this chip and the TMBs, were enriched with HRP (the horseradish peroxidase enzyme). The chemical reactions which took place turned the fluids blue. The ASICs were used to measure the gradual attenuation of light due to staining over time. The functionality of the rapid test was simulated using several analyte concentrations to test the electronic system.

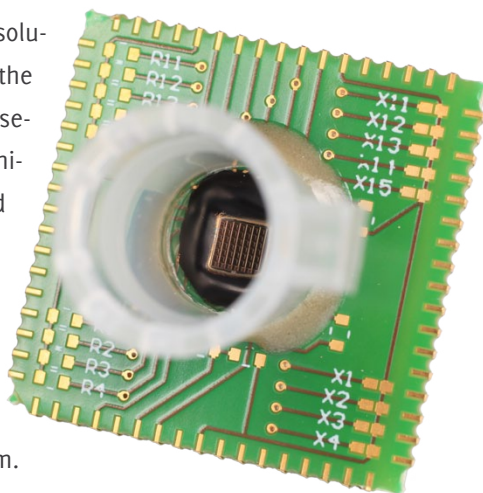
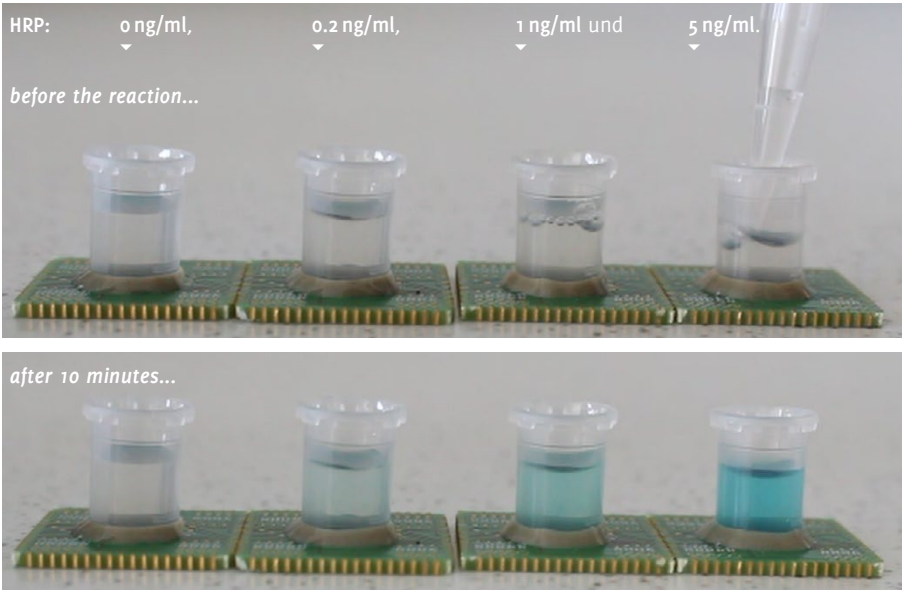


Figure 2: The ASIC (centre) used for the initial work on early cancer diagnosis. Photograph: IMMS.

Figure 3: Staining on conclusion of reaction in the case of four samples containing 0 / 0.2 / 1 and 5 ng/ml of HRP. Photographs: Senova.



Senova, a partner in the project, provided 4 sample solutions which contained 0 ng/ml, 0.2 ng/ml, 1 ng/ml and 5 ng/ml of HRP respectively, as shown in Figure 3.

Various levels of colouration were found. For each sample, on addition of the specified HRP concentration, a brightness value was recorded for each second over a period of 600 seconds. These recordings proved that the alterations in brightness were, indeed in the range 0.01 Bel to 1 Bel and the visualised differences in the reaction processes were consonant with expectations for at least the samples with higher concentration. It is intended to rely this preparatory work in developing correlations for the analyte concentrations which would prove the presence of PSA and haemoglobin.

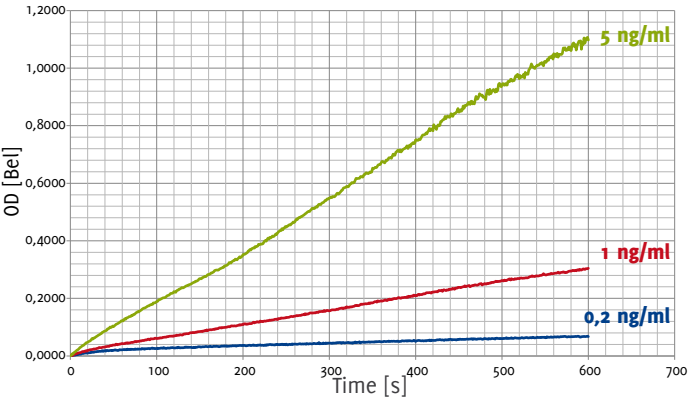


Figure 4:
Luminous intensity variation in the targeted range of 0.01 Bel to 1 Bel.
To simplify the graphic, the sample containing no HRP has been omitted.
Diagram: IMMS/Senova.

The initial work described above on the electronics has confirmed that the technology is in principles suitable for the levels required in the diagnosis of cancer. Tests are being continued through 2017. Attention is now being focussed on the samples with lower concentrations, the use of shorter measuring intervals and tests of robustness by repetition. In addition, Senova is working on further tests using chip surfaces provided with biological functionality and using biological samples on the current chip.

> *Smart Jacket*
> *ENTOMATIC*
> *KOSERNA*
> *HoTSens*
> *INSPECT*
> *AFIA*

> *Contents*

* *Funding*

To support Senova in this, IMMS has developed a mobile test system for use in investigating the various parameters associated with early diagnosis of cancer so that Senova can establish exact details for luminous intensity in relation to concentration and improve the accuracy of the graduation as the joint work continues. It should be possible to specify an ASIC on this basis in the course of 2017 which will be smaller, more exact, less affected by noise and better tailored to the application, while at the same time being less costly.

*More about
testing and
characterisation:
www.imms.de.*

Contact person: Dr. Balázs Németh, balazs.nemeth@imms.de

*Details and
video for the
INSPECT project:
www.imms.de.*



The project in which these results have been achieved has been jointly funded by the federal “Land” of Thüringen with the reference 2015 FE 9159 and by the EU in the EFRE (regional development) context.

The joint partners with IMMS in the project are Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, CDA GmbH, Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. and X-FAB Semiconductor Foundries AG.



INSPECT – Krebsfrüherkennung mit Mikroelektronik

Voruntersuchungen mit einem mobilen Testsystem für die Entwicklung integrierter Systeme zur individualisierten Krebsfrüherkennung. Foto: IMMS.

Motivation und Überblick

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 500.000 Menschen an Krebs.¹ Die Überlebensraten fünf Jahre nach der Diagnose variieren je nach Tumorart von unter 20 Prozent bis zu über 90 Prozent.² Je früher die Krankheit entdeckt wird, desto größer ist die Chance auf Heilung. Darmkrebs, die häufigste Krebsform in Deutschland, kann ein Jahrzehnt unbemerkt wachsen, bis er Symptome verursacht.³ Für einige Krebsarten können Schnelltests direkt durch den behandelnden Arzt vorgenommen werden, unmittelbar Ergebnisse liefern und zeit- wie kostenaufwändige Laboruntersuchungen sparen.

Übliche Schnelltests arbeiten nur qualitativ

Stand der Technik sind dabei unter anderem Teststreifen, auf denen Antikörper-Moleküle aufgebracht sind. Diese Bindungsmoleküle sind farbig markiert, halten in der Probenflüssigkeit das gesuchte Molekül fest und liefern nach fünf bis zehn

¹ <https://www.krebshilfe.de/informieren/ueber-krebs/was-ist-krebs/>

² im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung, http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html

³ <http://www.darmkrebs.de/ueberblick/>

Minuten einen Befund als Ja-Nein-Aussage in Form einer vorhandenen oder nicht-vorhandenen farbigen Linie. Unterschiedlich starke Einfärbungen dieser Markierung sind für Anwender jedoch nicht interpretierbar. Ein blasser Strich kann auch übersehen werden.

> *Smarte Jacke*

> *ENTOMATIC*

> *KOSERNA*

> *HoTSens*

> *INSPECT*

> *AFIA*

> *Inhalt*

* *Förderung*

Quantitative Schnelltests sollen künftig genaue Diagnosen ermöglichen

Lassen sich dagegen genaue Konzentrationen bestimmter Moleküle in Probenflüssigkeiten feststellen, sind verlässliche Diagnosen möglich. Insbesondere bei Prostatakrebs, der häufigsten Krebsform bei Männern in Deutschland,⁴ können solche quantitativen Methoden die Vor-Ort-Diagnostik erheblich erleichtern. Das prostata-spezifische Antigen (PSA) kann Hinweise auf Krebs liefern, wird aber immer vom Körper produziert. Für unter 50-Jährige liegt die PSA-Konzentration bei weniger als 2,5 ng/ml (Nanogramm, also Milliardstel Gramm, pro Milliliter), bei über 70-Jährigen bei etwa 6,5 ng/ml. Diese Werte können unabhängig vom Alter variieren und Entzündungen, mechanische Reizungen oder Krebs als Ursache haben. Wenn ein Karzinom wächst, steigt die individuelle PSA-Konzentration eines Patienten kontinuierlich an. Kann man also in regelmäßigen Abständen die PSA-Konzentration messen, ist eine zuverlässige Frühdiagnose und damit eine frühzeitige Therapie möglich.

Mikroelektronik soll Antigen-Konzentrationen bei Darm- und Prostatakrebs messen

Für solche quantitativen Messungen entwickelt das IMMS mit Thüringer Partnern im Projekt INSPECT⁵ ein biologisch-mikroelektronisches Schnelldiagnostik-System zur immuno-onkologischen Früherkennung von Darm- und Prostatakrebs. Das IMMS entwickelt die Elektronik, wobei die Signalverarbeitung insbesondere bei extrem geringen Signalleistungen sowie deren effiziente Rauschunterdrückung im Fokus stehen. Ausgangspunkt für die geplante Mikroelektronik-Entwicklung sind die Erkenntnisse der Forschergruppe GreenSense* des IMMS zu einem entwickelten Halbleiter-basierten optischen Sensor-Array-System für die Diagnostik von Infektionskrankheiten.

Infos und

Video zu

INSPECT auf

www.imms.de.

Infos zu

GreenSense auf

www.imms.de.

Voruntersuchungen zu neuen Anforderungen an die anwendungsspezifische integrierte Schaltung (ASIC), zur Biofunktionalisierung der Chip-Oberflächen und erste erfolgreiche Tests zur optischen Messung chemischer Reaktionen im direkten Kontakt mit der Elektronik wurden durchgeführt und bilden die Grundlage für das Diagnostik-System, das die Partner bis 2019 entwickeln werden.

⁴ http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html

⁵ Mikroelektronische Diagnostik-Plattformen für die personalisierte Krebsforschung und Mikro-Bioreaktoren.

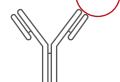
Immobilisierung
der primären

Antikörper



ASIC

Anreicherung
des **Analyten**
aus einer
Probe



Markierung des Analyten
durch einen **Farbstoff**-
markierten sekun-
dären Antikörper



Messung
des **Signals**

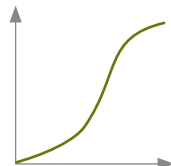


Abbildung 1: Grundprinzip für den quantitativen Nachweis des Analyten (PSA bzw. Hämoglobin)

Grafik: Senova/IMMS.

61

- > Smarte Jacke
- > ENTOMATIC
- > KOSERNA
- > HoTSens
- > INSPECT
- > AFiA

Lösungsansatz und Voruntersuchungen

Grundprinzip und Ziele des Gesamtsystems

Der biotechnologische Ausgangspunkt für das neue Testsystem ist vergleichbar mit dem der Teststreifen: Mit einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung sollen gezielt Analyten in einer Probe nachgewiesen werden, bei Prostatakrebs das PSA und bei Darmkrebs Hämoglobin.

Neu ist (vgl. Abbildung 1), dass die entsprechenden primären Antikörper auf der Oberfläche eines Mikroelektronik-Chips aufrecht fixiert werden (A). Wird eine Probe auf den Chip gegeben, bilden sich dort unsichtbare Antikörper-Antigen-Komplexe (B), sofern die gesuchten PSA- bzw. Hämoglobin-Analyten in der Lösung enthalten sind. Diese werden in einem zweiten Schritt sichtbar gemacht, indem farbig markierte sekundäre Antikörper hinzugegeben werden, die an den Analyten der Antikörper-Antigen-Komplexe andocken (C). Die farbige Lösung mit sekundären Antikörpern, die nicht an die Oberfläche gebunden sind, wird mit einer Waschlösung weggespült. Die festgehaltenen farbigen Antikörper verändern die optische Dichte, die mit dem ASIC detektiert und ausgewertet wird (D).

Hierfür wird zuerst die Lichtintensität vor der Reaktion gemessen und danach, wie stark das Licht durch die Farbmenge gedämpft wird. Aus den beiden Messwerten wird ein logarithmisches Verhältnis gebildet. Die für eine Diagnose erforderliche Messgenauigkeit soll im Bereich von 0,01 Bel bis 1 Bel liegen.

Systemaufbau

Diese Reaktionen und Messungen sollen in einem kompakten und mobilen Gerät stattfinden. Dieses soll man per Standardschnittstelle an Rechner oder Laptop anschließen können, wo sich mit einer Software der Test steuern, die Daten anzeigen und weiterverarbeiten lassen. Die Probe wird in die Reaktionskammer über dem ASIC gegeben und mechanisch sowie elektrisch mit dem System verbunden. Lichtquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen erzeugen in einem festen Abstand zum Chip

> Inhalt

* Förderung

ein homogenes Licht, das in konstanter Intensität über die Zeit die Probe ausleuchtet. Mit dem Gerät sollen Ärzte ohne Umweg ins Labor zuverlässig messen können, um Diagnosen zu stellen. Dank der im Voraus biofunktionalisierten Mikroelektronik sollen Anwender die Schnelltests ohne Vorbereitungsaufwand durchführen können.

> *Smarte Jacke*

> *ENTOMATIC*

> *KOSERNA*

> *HoTSens*

> *INSPECT*

> *AFIA*

> *Inhalt*

* *Förderung*

Erste Vorversuche als Basis für die Entwicklung des neuen Mikroelektronik-Chips

Um Krebs in einem sehr frühen Stadium feststellen zu können, muss die Mikroelektronik sehr geringe Antigen-Konzentrationen von etwa einem Nanogramm pro Milliliter erkennen können, die sehr schwache relative Lichtintensitätsunterschiede in Größenordnungen von den oben genannten 0,01 Bel bis 1 Bel verursachen.

Das IMMS hat die technische Machbarkeit dieser Zielvorgaben für die Krebsdiagnostik grundsätzlich bewertet. Dafür wurden in einem ersten Schritt mit einem bereits vorliegenden ASIC untersucht, wie dieser Helligkeitsunterschiede in Probenlösungen mit bekannten Teilchenkonzentrationen abbildet.

Dieser für Forschungszwecke relativ groß gehaltene Chip war ursprünglich für den Nachweis von Infektionskrankheiten und damit für andere Randbedingungen entwickelt worden. Er beinhaltet eine Matrix aus 6 x 7 Photodioden (Abbildung 2). Diese war realisiert worden, um parallel verschiedene Krankheitserreger durch die Messung von Lichtunterschieden zu detektieren.

Fachartikel

zu diesem

Forschungs-

Chip auf

www.imms.de.

Das optische Prinzip für die Signalwandlung dieses Forschungs-Chips soll auf die Krebsdiagnostik übertragen und in einem neuen ASIC-Design schaltungstechnisch auf die spezifischen Anforderungen ausgelegt werden.

Auf diesen Chip wurden Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösungen (TMB) gegeben, die mit Meerrettich-Peroxidase-Enzym (HRP) angereichert wurden. Durch chemische Reaktionen färben sich die Flüssigkeiten blau ein. Mit den ASICs wurde gemessen, wie sich die Reagenzien im Zeitverlauf durch die Verfärbung abdunkeln.

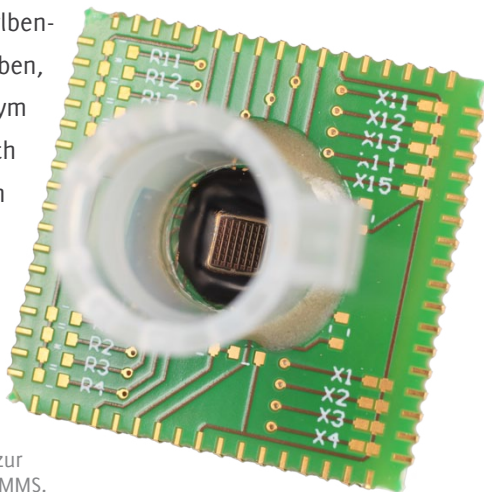
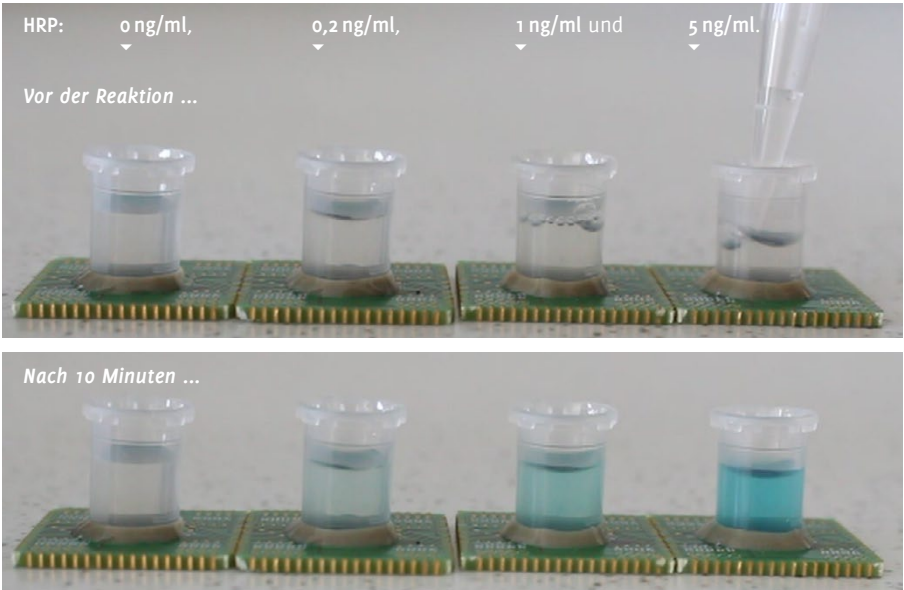


Abbildung 2: Der für die Voruntersuchungen zur Krebsdiagnostik genutzte ASIC (Mitte). Foto: IMMS.

Abbildung 3: Unterschiedliche Verfärbungen durch die Reaktionen in den Testlösungen mit vier verschiedenen HRP-Konzentrationen von 0 / 0,2 / 1 und 5 ng/ml HRP. Fotos: Senova.



Für diese Untersuchungen wurde der Nachweis verschiedener Analytkonzentrationen simuliert, um das elektronische System zu prüfen. Dafür hat der Projektpartner Senova vier Lösungen angefertigt, die 0 ng/ml, 0,2 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml HRP beinhalten, vgl. Abbildung 3.

Die unterschiedlichen Verfärbungen wurden wie folgt nachgewiesen. Für jede Lösung wurde mit der Zugabe der definierten HRP-Menge ein Helligkeitswert pro Sekunde über eine Zeitspanne von 600 Sekunden aufgezeichnet. Mit den Messungen wurden Helligkeitsveränderungen im Zielbereich von 0,01 Bel bis 1 Bel nachgewiesen und die Unterschiede zwischen den Reaktionsverläufen der zunächst höher konzentrierten Lösungen grundsätzlich wie erwartet abgebildet (Abbildung 4).

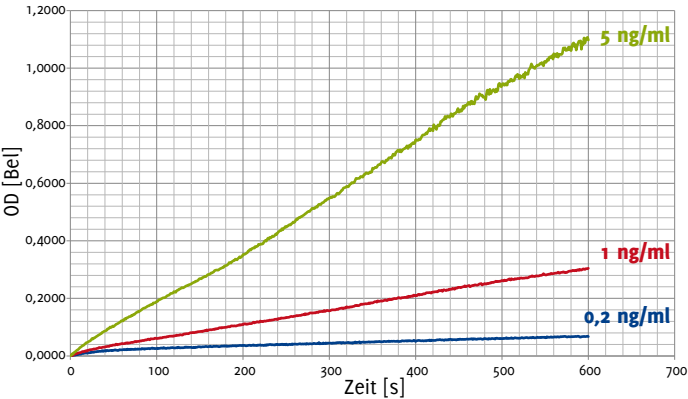


Abbildung 4:

Gemessene Helligkeitsunterschiede bei verschiedenen HRP-Konzentrationen im Zielbereich von 0,01 Bel bis 1 Bel.

Zur vereinfachten Darstellung wurde hier auf die Lösung ohne HRP verzichtet.

Grafik: IMMS/Senova.

Aus diesen und weiteren Voruntersuchungen sollen später Korrelationen zu den Analytkonzentrationen für den Nachweis von PSA und Hämoglobin erarbeitet werden.

Ausblick

Die beschriebenen ersten Untersuchungen mit der Elektronik bestätigten, dass diese prinzipiell für die Zielgrößen zur Krebsdiagnostik geeignet ist. Weitere Tests werden 2017 durchgeführt. Im Fokus stehen dabei geringere Probenkonzentrationen, kürzere Messintervalle und Wiederholungen für verlässliche Ergebnisse. Darüber hinaus werden bei Senova weiterführende Tests mit biochemisch funktionalisierten Chipoberflächen und Bioproben mithilfe des vorhandenen Chips durchgeführt.

Das IMMS hat dafür ein mobiles Testsystem entwickelt, mit dem Senova nachweisrelevante Parameter zur Krebsfrüherkennung untersucht und genaue Informationen zu Lichtintensitäten und Konzentrationen in Lösungen und zur Genauigkeit der erzielten Abstufungen für das weitere Vorgehen liefern wird. Auf dieser Basis soll 2017 ein ASIC spezifiziert werden, der kleiner, genauer, rauschärmer, speziell auf die Anwendung ausgerichtet und darüber hinaus kostengünstiger werden soll.

*Mehr zu Test
und Charak-
terisierung auf
www.imms.de.*

Kontakt: Dr. Balázs Németh, balazs.nemeth@imms.de

Infos und

Video zu

INSPECT auf

www.imms.de.



Das diesen Ergebnissen zugrundeliegende Vorhaben wurde vom Freistaat Thüringen unter der Nummer 2015 FE 9159 gefördert und durch Mittel der Europäischen Union im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) kofinanziert. Projektpartner des IMMS sind die Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, die CDA GmbH, das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. und die X-FAB Semiconductor Foundries AG.