

2022

orbio

PCR IN A BOX

ORBIO | Herrmann-von-Helmholtz-Platz 1 76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Inhalt

1. Was ist orbio?	1
2. Wer ist orbio?.....	1
3. Umsetzung	2
4. Kosten- und Marktanalyse	8
5. Marketing.....	11
6. Ausblick	11
7. Sponsoren	11

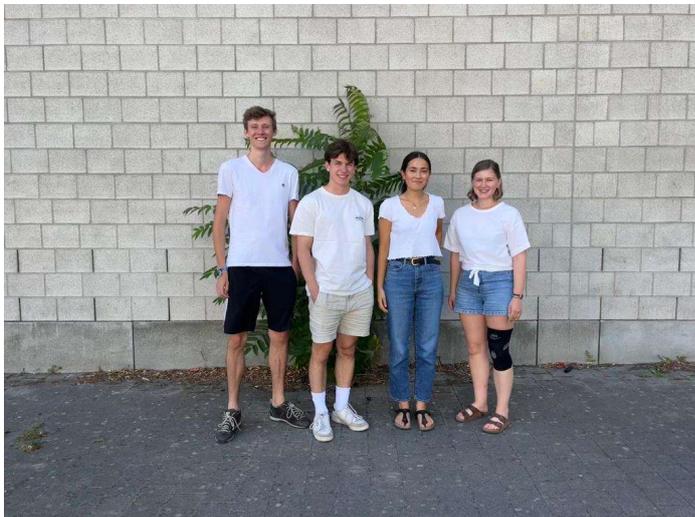
1. Was ist orbio?

In den letzten zwei Jahren ist, durch das Aufkommen des neuartigen Coronavirus die Nachfrage an sicheren, kostengünstigen und vor allem schnellen Nachweismethoden für die Viruserkrankung stark gestiegen. In kurzer Zeit konnten Antigen-, sowie PCR-Tests (Polymerase Chain Reaction) entwickelt werden. Die Antigen-Tests liefern zwar ein schnelles Ergebnis, können jedoch aufgrund mangelnder Sensitivität nicht zum sicheren Nachweis des Virus verwendet werden. Ein PCR basierter Test bietet den Vorteil einer deutlich höheren Sensitivität, allerdings bringt dies höhere Kosten, sowie ein bis zwei Tage Wartezeit bis zum Ergebnis mit sich.

Aus diesem Umstand heraus ergab sich für uns die Motivation einen PCR-Test mit einfachen, günstigen Mitteln umzusetzen und die Zeit von Test bis Testergebnis zu verringern. Die Idee entwickelte sich schließlich hin zu einem System mit den Dimensionen eines Schuhkartons, auf Basis einer Lab-on-a-disc (LoaD), nach aufgeben der Probe automatisch eine vollständigen PCR-Ablauf durchführt und durch Einsatz im point-of-care Bereich die Zugänglichkeit zu günstigen Tests ermöglichen soll.

2. Wer ist orbio?

Wir sind ein Team aus vier Studierenden des Karlsruher Institut für Technologie, die sich im November letzten Jahres zusammengefunden haben, um eine kostengünstigere Alternative zu den herkömmlichen Thermocyclern zu entwickeln. Dazu ist Expertise aus verschiedenen Bereichen notwendig, die wir aus den Studiengängen Bioingenieurwesen, Maschinenbau und Wirtschaftsingenieurwesen zusammenbringen. Nicklas Rondot (Wirtschaftsingenieurwesen) und Leon Middendorf (Maschinenbau) sind für die



Prototypentwicklung und Hardware zuständig, wobei sich Leon auf die Auswahl und Auslegung der Heizplatten und Nicklas auf die Elektronik konzentriert hat. Alina Stein (Bioingenieurwesen) und Johanna Bartl (Bioingenieurwesen) sind für das Assay-Design, also die Auswahl der erforderlichen Reagenzien sowie die Kompatibilität der Technik mit der biochemischen Reaktion zuständig. Zudem ist Nicklas für das Marketing zuständig.

Abbildung 2-1 das Team

3. Umsetzung

3.1 PCR-Ablauf

Die allgemeine PCR (polymerase chain reaction) lässt sich in drei Schritte unterteilen. Zunächst wird in der Denaturierungsphase bei 92°C die doppelsträngige DNA aufgespalten, sodass sich im Annealing bei 52°C die Primer komplementär an die DNA anlagern können. An die Primer bindet im Anschluss daran in der Elongation bei 68°C die Polymerase, welche die komplementären DNA-Stränge synthetisiert, sodass sich die vorliegende DNA mit jedem Durchlauf verdoppelt. Nach ca. 3 Minuten wird die Flüssigkeit wieder auf 92°C erhitzt, was zum Abbruch der DNA-Synthese führt, sodass der Prozess von Neuem beginnen kann und die DNA exponentiell vervielfacht wird.

Das Erhitzen und Abkühlen erfolgt heutzutage in Thermocyclern. Dies sind Geräte, welche etwa 50 Proben, je nach Bauform, aufnehmen und gleichzeitig bearbeiten. Dazu stehen die Proben in einer Metallaufnahme welche immer wieder aktiv geheizt und gekühlt wird.



Abbildung 3-1: konventioneller Thermocycler

<https://shop.unigreenscheme.co.uk/sequencers-dna-pcr/bio-rad-t100-thermal-cycler-pcr-instrument-qpr2t>

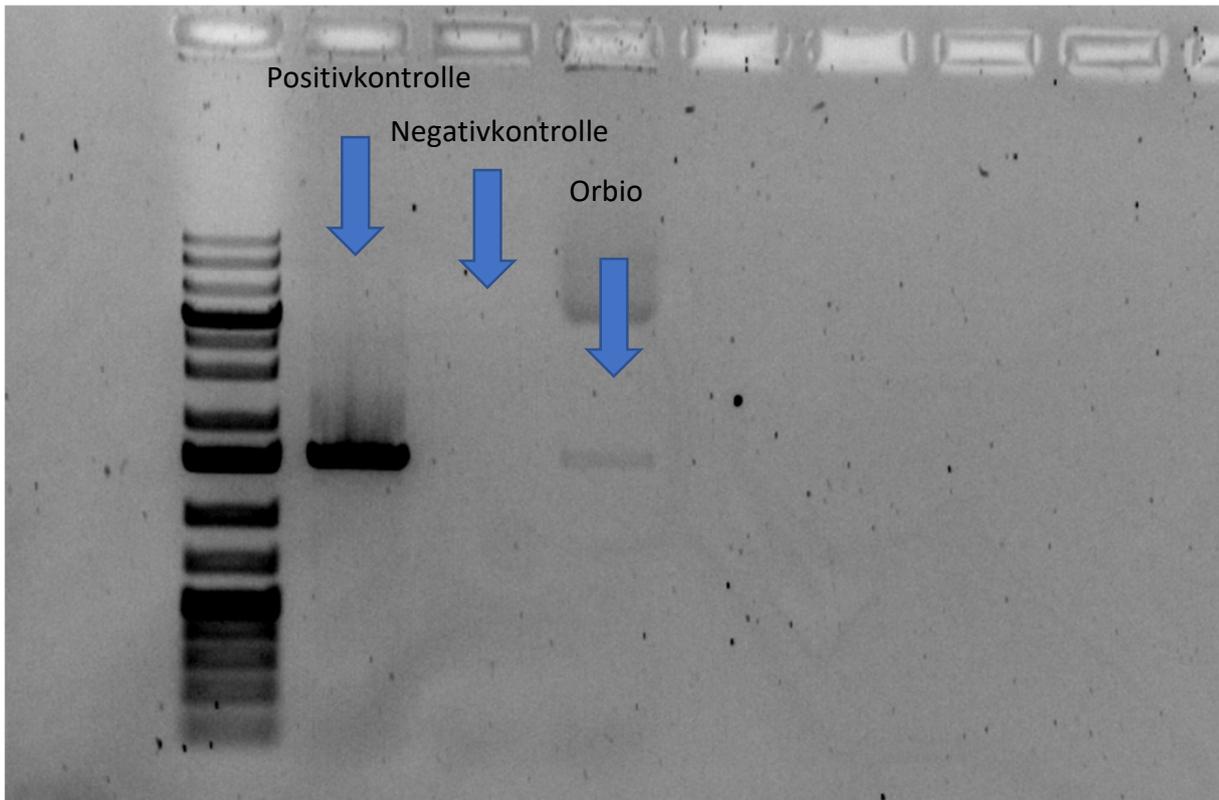
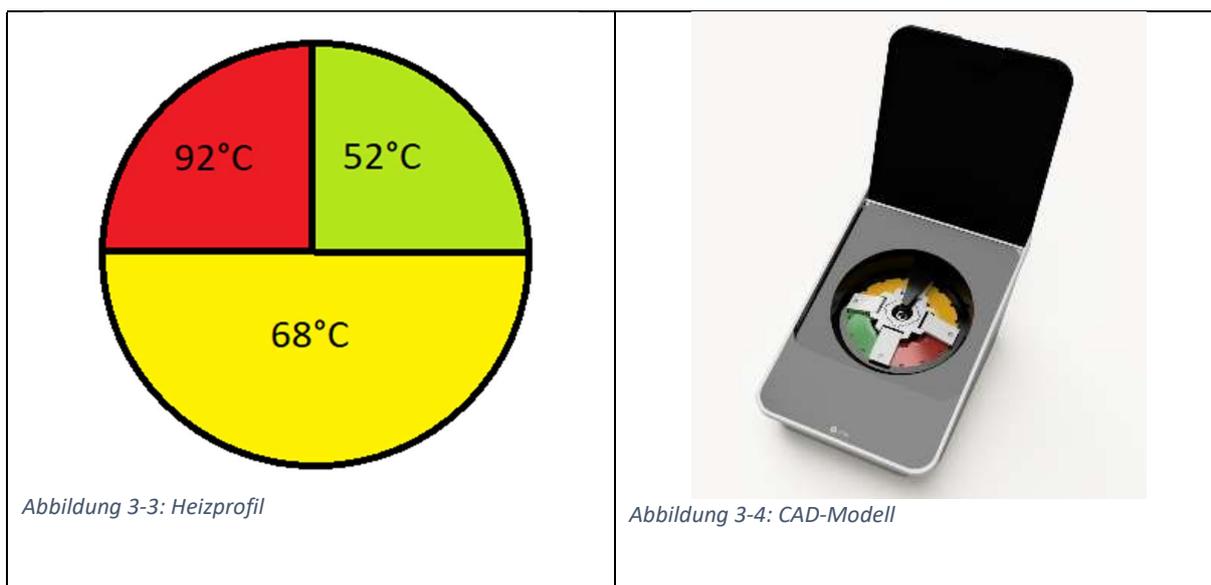


Abbildung 3-2 Erster erfolgreicher PCR-Testlauf auf unserem Gerät. Zu sehen ist das schwache Band auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle, es wurde also eine gleich lange (selbe) DNA vervielfacht. Aufnahme einer Gelanalyse

3.2 Idee

Unsere Hauptidee zur Zeiteinsparung und Vereinfachung während des PCR-Ablaufes ist es die Auf- und Abkühlzeiten eines normalen Thermocyclers durch ein Verschieben der Proben in die verschiedenen Temperaturbereiche zu ersetzen. Statt alle Proben gleichzeitig zu heizen und zu kühlen rotieren wir in unserem Aufbau jede Probe durch die geforderten Temperaturbereiche. Diese Bereiche werden dabei auf konstanter Temperatur gehalten. Somit sparen wir nicht nur Zeit, sondern auch Energie ein, die sonst beim Kühlen in die Umwelt geblasen würde.



Für eine vollständige PCR von der Proben Entnahme bis zum fertigen Testergebnis fehlen jedoch noch einige Schritte: Aus den entnommenen Zellen muss zuerst die DNA extrahiert werden. In der Regel ist dies ein getrennter Arbeitsschritt im Labor. Wir hoffen durch Integration dieses Schrittes in unser Gerät das Labor sowie den Laborassistenten ersetzen zu können um PCR auch in entlegenen Regionen oder wenig ausgestatteten Laboren ohne großes Vorwissen einsetzen zu können.

Die amplifizierte DNA muss aktuell mittels Gelelektrophorese ausgewertet werden, um einen Nachweis des Zielgens zu erhalten. Jedoch ließe sich dieser Schritt, durch den Einsatz einer real-time PCR, die bereits nach dem Ablauf der PCR-Reaktion ein qualitatives Ergebnis liefert, in das Gerät integrieren.

3.3 Technische Umsetzung

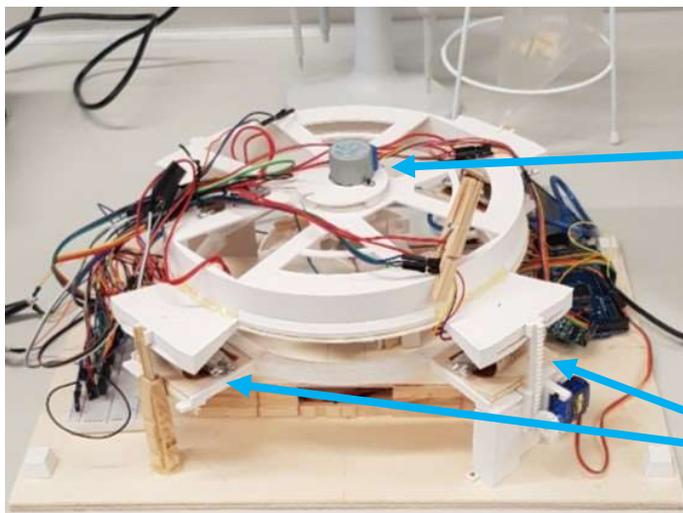
Zwischen unserem ersten Entwurf und dem heutigen Prototyp liegen viele Entwicklungsschritte, durch die wir jeweils wichtige Erkenntnisse erlangen konnten. In der ersten Phase wurden die Bauteile einzeln getestet, von den Heizmatten über verschiedene Kartuschendesigns aus Plexiglas und pressure adhesive Tape, Trichterkonstruktionen bis hin zu unterschiedlichen Pumpen. Die größten Herausforderungen lagen hierbei in der Auswahl des richtigen Motors, der sowohl niedrige als auch hohe Drehzahlen exakt ansteuern kann und der Wärmeübertragung von den Heizmatten durch die Kartuschen auf die Reagenzien. Diese Probleme konnten gelöst werden, indem zwei Motoren verbaut wurden: ein Brushless-Motor aus dem Hobby Bereich für die Drehung im Bereich von 100-20.000 rpm und ein Schrittmotor für die Ansteuerung der Heizplatten während der PCR. Zur genauen Positionierung der Kartuschen innerhalb des Heizfeldes - auch nach etlichen

Umdrehungen - wurde ein Sensor eingebaut, welche durch sein stetiges Feedback mögliche Ungenauigkeiten unterbindet.

Erste Testläufe der Wärmeübertragung zeigen deutlich, dass eine einseitige Aufheizung zu lange dauern würde. Deshalb wurde in folgenden Aufbauten zuerst eine beidseitig bestrahlende Wärmequelle eingesetzt, später zu einer beidseitig berührenden Erwärmung mit verbesserten Wärmeübertragung gewechselt.

Um beidseitig Wärmeleitung und die Drehung zu ermöglichen, muss der Kontakt zwischen Heizfeld und Probe variable gestaltet sein. In unserem aktuellen Aufbau kann dazu durch zwei Servomotoren der oberer Heizbereich leicht angehoben, die Probe gedreht und die Wärmequelle wieder fest angepresst werden.

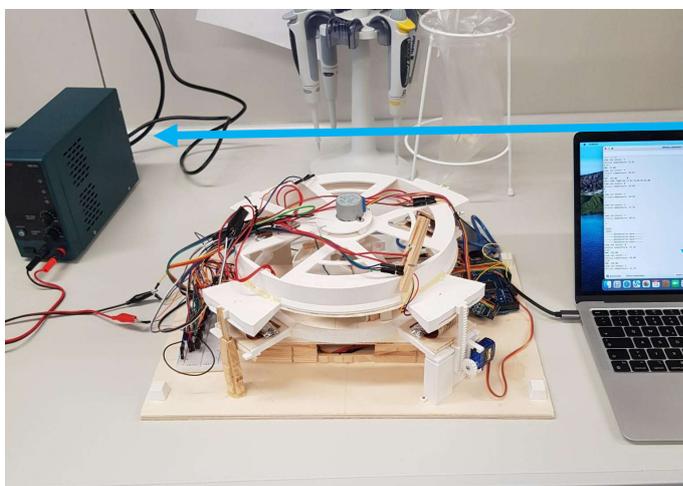
Die Temperaturen der Heizmatten können eingestellt werden und halten durch den verwendeten PID-Regler ihre Temperatur um wenige (etwa ± 1.5) Grad genau. Dies erwies sich in unseren Tests als ausreichend. Durch einen besser getunten Regler ist eine genauere Ansteuerung für komplexere Reaktionen sicherlich möglich.



Schrittmotor

Heizblöcke

Abbildung 3-5: erster erfolgreich getesteter Prototyp



Stromquelle

Laptop mit Datenausgabe

Abbildung 3-6 Test-Setup im Labor des KIT

Die Probenaufbearbeitung besteht ebenfalls aus mehreren Schritten. Zuerst müssen die Zellen manuell in die Maschine eingelegt werden. In einem ersten Waschprozess werden die Zellen auf die Silicamembran gewaschen. Eine weitere Lösung bricht die Zellen auf. Ihre DNA-Stränge bleiben jedoch an der Silicamembran heften. Ein weiterer Schritt löst nun diese DNA-Stränge aus der Membran und schwemmt sie in die endgültige Probenkammer, in welcher die DNA auf die nötigen Reagenzien zur PCR trifft.

All diese Prozessschritte benötigen Energie. Diese führen wir dem System durch eine sehr hohe Drehzahl zu. Durch die dadurch wirkenden Zentrifugalkräfte werden die Buffer und Lösungen durch die Membran immer weiter nach Außen gezogen.

Zur PCR ist letztendlich nur noch die DNA von Nutzen, all die anderen Bestandteile und Lösungen sollten möglichst nicht in der Probenkammer enden, um Interferenzen zu vermeiden. Zu diesem Zweck ist kurz nach der Silicamembran ein drehrichtungsabhängiger Schalter eingebaut. Seine Funktion beruht auf der Corioliskraft.

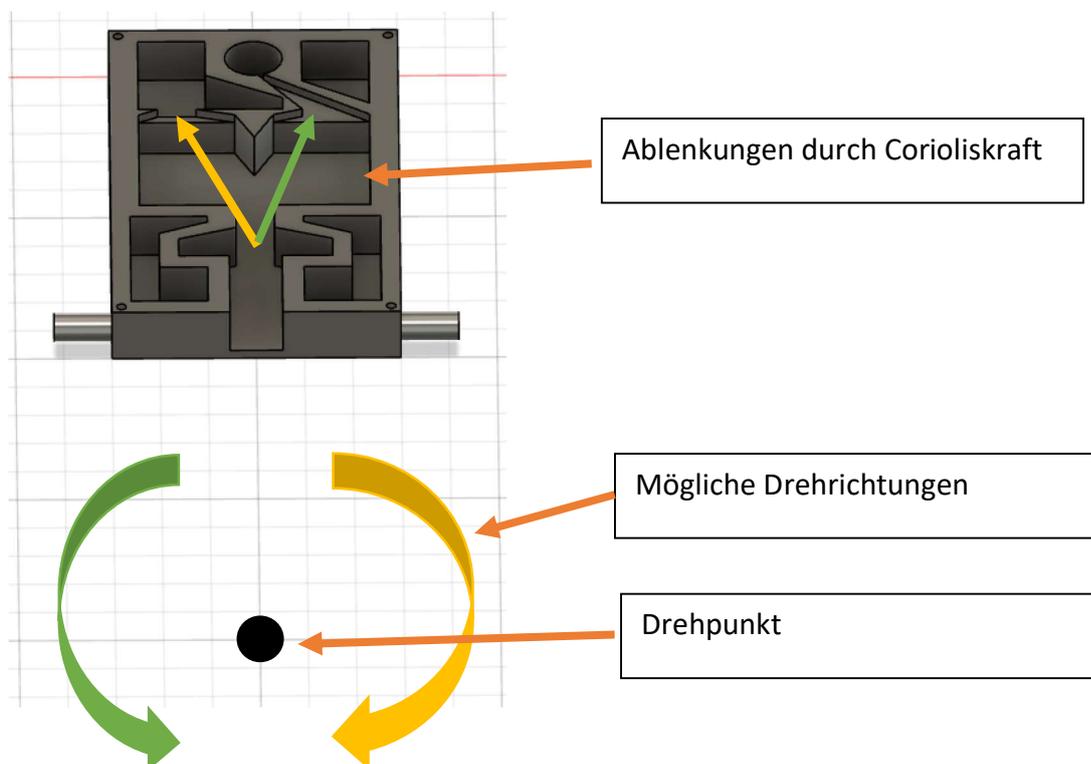


Abbildung 3-7: Kartusche mit Coriolis-Switch zur Abtrennung der DNA von sonstigen Bestandteilen

Aktuell laufen auf unserem Prototypen 4 Proben und 4 Heizmatten gleichzeitig. Denkbar sind jedoch eine beliebige Anzahl an Proben, so dass sich das Gerät statt von Heizbereich zu Heizbereich kontinuierlich drehen könnte. Limitierend ist so nur noch die Größe des Gerätes.

3.4 Programmierung Bauteile

All unsere Geräte werden von Arduinos betrieben. Grund dafür ist deren günstiger Preis, aber vor allem deren einfacher Anschluss an sonstige Sensoren oder Aktoren.

Bisher sind wichtige Funktionen noch auf verschiedenen Arduinos untergebracht, in naher Zukunft wird jedoch alles zentral gesteuert sein. Alle Funktionen wurden von uns selbst entwickelt und programmiert.

Die Heizblöcke bestehen aus 30W Heizmatten (5,50€) die einen Aluminiumblock auf die gewünschte Temperatur heizen. Im Block ist ein Temperatursensor (TMP36GT9Z, 190€) verbaut um dem PID-Controller das nötige Feedback zu geben. Die geforderte Leistung wird von einer externen Stromquelle bereitgestellt und über vom Arduino durch PWM-Signale angesteuerte Transistoren (TIP 120, 0,29€) an die Matten weitergegeben. Aktuell werden die Matten auf 20V betrieben. Der anfängliche Aufheizvorgang aller Matten dauert einige wenige Minuten, danach läuft das Gerät stabil. Mit einer größeren Stromquelle ließe sich dieser Zeitraum verkürzen.

4. Kosten- und Marktanalyse

4.1 Kosten

Eine erste Kostenabschätzung von unserem jetzigen Prototypen sie wie folgt aus:

Position	Kosten Prototyp	Kosten Massenproduktion
Arduino/ microcontroller	10€	4€
Heizmatten	22€	16€
Kartuschen	0,5€	0,5€
Schrittmotor	4€	4€
Servomotor	2,50€	2€
Brushless-Motor	8,5€	8€
Gehäuse	8€	5,50€
Klein-Elektronik- Bauteile	10€	10€
Summe	65,50€	50€

Klar zu sehen ist, dass unser Gerät ein Bruchteil von dem eines professionellem Gerät kostet. Das liegt sowohl an den nicht als Medizinprodukt zugelassenen Teilen, als auch an den Personalkosten, die wir im Rahmen unseres Studiums aufgebracht haben. Wird unser Gerät in größerem Maßstab produziert, sehen wir eine Hardwarekostensenkung müssen aber noch die Arbeitszeit hinzurechnen.

Als Medizinprodukt müssen gewisse Standards eingehalten werden, so darf auf keinem Fall eine Probe durch eine benachbarte oder vorherige kontaminiert werden. Um nicht das ganze Gerät reinigen zu müssen haben wir uns dafür entschieden, die Probenbehälter als Einmalprodukte auszulegen. Diese müssen nach jedem Durchlauf entsorgt werden. Da es sich jedoch nur um simple Plastikteile handelt, sind deren Anschaffungskosten im Vergleich zu den nötigen Chemikalien zu vernachlässigen.

Die benötigten Chemikalien hängen jeweils vom gewünschten Test ab, bei einem konventionellen PCR-Test belaufen sich die Kosten auf ca. 2 € pro Test. Insgesamt würden sich so Kosten von 5-10 € pro Test ergeben.

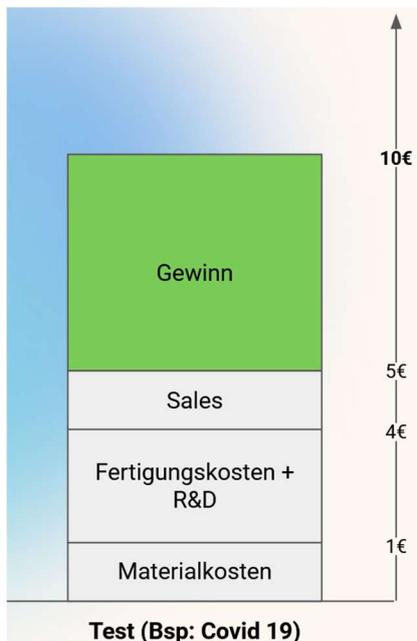


Abbildung 4-1 Preiszusammensetzung eines Tests



Abbildung 4-2 Preiszusammensetzung des Gerätes

Um Kunden langfristig zu binden verlagern wir die Entwicklungskosten des Systems auf den etwas erhöhten Preis für jeden Tests. Somit wird potentiellen Kunden das Gerät durch einen niedrigeren Einstiegspreis schmackhaft gemacht. Einen leicht höheren, aber immer noch niedrigen Preis für jeden Tests ist für die meisten kein Problem. Sind die Kosten einmal wieder eingeholt, steigt der Profit mit jedem Test.

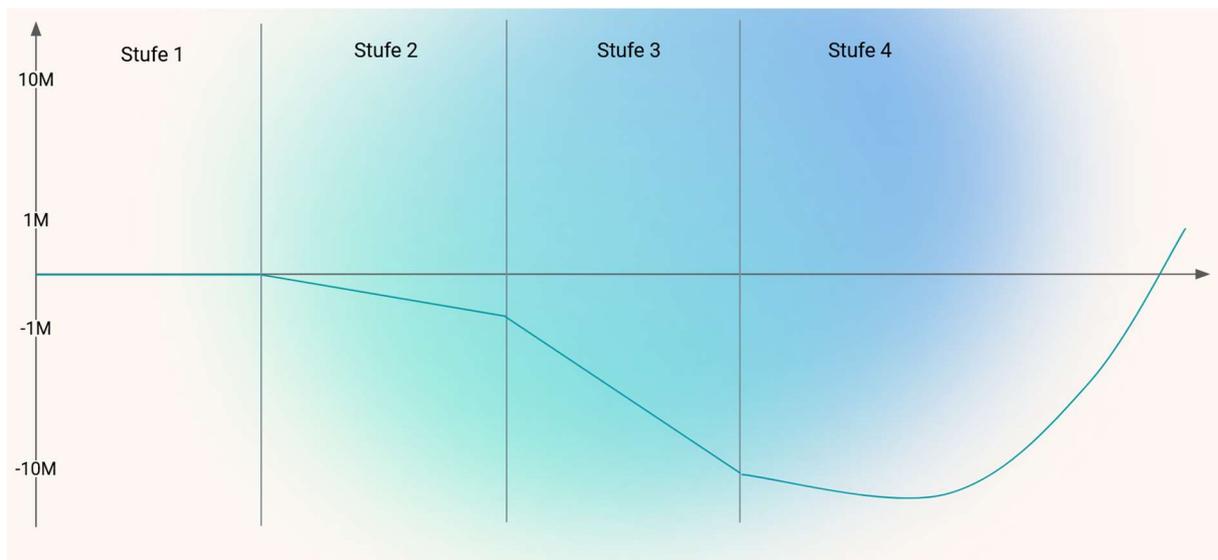


Abbildung 4-3 Langfristige Entwicklung des Profites

Aktuell befinden wir uns in Stufe 1: da wir selbst für uns arbeiten haben wir keine Personalkosten und Materialkosten für die ersten Prototypen sind minimal.

Im Verlauf der Markteinführung muss deutlich mehr Geld in die Weiterentwicklung und Zertifizierung investiert werden. Die Ausgaben steigen stark an. Schlussendlich werden diese Investitionen durch die Gewinne aus Verkauf der Geräte und Test Kits ausgeglichen und von da an als reinen Gewinn zu erkennen.

4.2 Marktanalyse

4.2.1 Zielmarkt

Einfache, günstige und schnelle Testergebnisse sind überall gefragt. Gerade die Pandemie hat gezeigt, wie wichtig solche Tests sind um Menschen zu schützen und das öffentliche Leben am Laufen zu halten. Aber auch als Diagnosewerkzeug werden PCR oder ähnliche Verfahren immer interessanter. Der Markt wächst.

Unser Produkt fällt in die Kategorie Spezialanwendungen. Es ist nicht für den alltäglichen Gebrauch von Privatpersonen vorgesehen.

Denkbare Anwendungsbereiche für unser schnelles und günstiges PCR-System sind Point of Care Zentren. Dazu zählen Apotheken, kleine Arztpraxen oder Altersheime. Tests können dort sofort und ohne langes Warten auf Laborergebnisse durchgeführt werden. Da solche Zentren sich kein voll ausgestattetes Labor mit all den benötigten Geräten leisten können ist unser all-in-one Konzept für diesen Bereich angedacht. Zudem ist die Bedienung sehr einfach: alles, was manuell gemacht werden muss ist die Probe an den richtigen Platz zu legen.

4.2.2 Wettbewerbsanalyse

Im Bereich der schnellen PCR-Tests gibt es neben uns noch einige andere Anbieter.

Zu nennen sind unter anderem Spindiag oder cue.

Spindiag verkauft ein Point of care Gerät mit ähnlichen Ansprüchen wie wir. Auch sie wollen schnelle Testergebnisse möglichst einfach und schnell produzieren. Durch unser viel einfacheres Kartuschendesign, wodurch wir einzelne Tests günstiger anbieten können, grenzen wir uns am stärksten ab.

Cue hingegen setzt auf eine Lieferung von Tests zum Kunden nach Hause. Sie sind in der Hinsicht Konkurrenz da sie ebenfalls schnelle und günstige Tests anbieten. Trotzdem muss auf die Lieferung und Laborauswertung gewartet werden.

5. Marketing

Es wurde eine Website und ein Instagram Account angelegt, die bis zur Messe online geschaltet werden sollen.

Außerdem stehen wir in Kontakt mit zwei Zeitungen, die anlässlich zu COSIMA Artikel über unser Projekt veröffentlichen wollen.

Zudem wurde eine Visitenkarte gestaltet, die auf der Messe ausgegeben werden soll.

6. Ausblick

Aktuell konnten wir mit unserer Expertise und durch das Aneignen von Kenntnissen einen erfolgreichen PCR-Test auf unserem LoAD-System zu minimalen Kosten umsetzen. Eine Verifizierung der Probenaufbereitung steht noch aus. Wir haben diese aber bewusst erst nach einer erfolgreichen PCR angesetzt, da die Probenaufbereitung um einiges einfacher als die PCR ist und wir diese sicher beherrschen wollen.

In der nächsten Stufe soll das Framework weiterentwickelt werden, sodass verschiedenste Tests auf dem LoAD-Gerät ausführbar sind, für diesen Schritt ist viel Forschung notwendig, was beispielsweise im Rahmen von Bachelorarbeiten in diesem Bereich vorstellbar wäre. Anschließend soll das System zu einer produzierbaren und zertifizierbaren Testplattform entwickelt werden, um als point-of-care System eingesetzt werden zu können. Hierzu werden Personen mit Industrieexpertise benötigt, sowie Investments.

Letztlich muss ein strategischer Partner für die Umsetzung des Projekts gefunden werden, um den Marktstart zu planen.

7. Sponsoren

Vielen Dank an unsere Sponsoren. Ohne sie wäre die Umsetzung unseres Vorhabens nicht möglich gewesen!

IBG: Reagenzien, Vergleich Tests (Thermocycler), Gelelektrophorese

IMT: Plexiglas, Pressure Adhesive Tape, Zugang zu Lasercutter und Plotcutter

Memetis: Fahrt- sowie Unterbringungskosten für COSIMA