

DISS.ETH NO. 29381

SCALABLE *IN VITRO* BLOOD-BRAIN-BARRIER MODELS FOR BIOLOGICAL AND
PHARMACEUTICAL RESEARCH

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

WEI WEI

Master of Engineering, University of Chinese Academy of Sciences (UCAS), Beijing, China

born on 12.05.1993

citizen of

China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Carlotta Guiducci

Dr. Mario Matteo Modena

2023

ABSTRACT

This thesis presents the design, realization, characterization and application of microfluidic-based *in vitro* blood-brain-barrier models recapitulating an *in vivo*-like three-dimensional (3D) cellular organization and physiological environment to investigate the barrier response to external insults and to screen for BBB-permeable compounds against central nervous system (CNS) diseases.

The high selectivity of the BBB maintains brain homeostasis, however it also poses a major roadblock in the effective delivery of drugs and therapeutics to treat CNS diseases. Barrier exclusion of therapeutics from the brain is among the main factors behind the high attrition rate of brain-targeted therapeutics. Therefore, investigating the ability of new drugs to cross the BBB during drug development will help in finding new treatment options for CNS diseases.

Compared to widely used *in vivo* animal models, *in vitro* models offer lower costs, higher throughput, and the possibility to use human-based cellular models, which reduces potential issues related to species-dependent differences between human and animal BBB models. In addition, advanced *in vitro* models have been instrumental in reducing animal use and expedite drug development.

In this thesis, two open-microfluidic platforms to realize 3D BBB models to study barrier responses to external insults and the barrier permeability to chemotherapeutics have been developed:

(i) A human-cell-based blood-brain-barrier platform with integrated, transparent electrodes to monitor barrier tightness in real time via impedance and high-resolution imaging. The platform was used to investigate how the barrier reacts to external injury events, such as an ischemic insult. Electrical measurements showed a rapid decrease of the barrier electrical resistance before the appearance of actin stress-fiber bundles during the ischemic insult.

(ii) A microfluidic high throughput, open-microfluidic BBB model fabricated in standard plastic material, combined with a 3D-cell culture-based tumor model platform for drug screening. The platform was used to evaluate the delivery of candidate compounds into the CNS and the efficacy of the compounds against the tumor and their toxicity on healthy cells.

The developed platforms feature dynamic 3D *in vitro* BBB models to improve the understanding of the role of the BBB in CNS diseases and to advance the identification of therapeutics for brain diseases. The models offer the possibility to elucidate intricate mechanisms underlying the pathogenesis of CNS diseases and to facilitate the identification of potential therapeutics for brain disorders. The developed platforms exhibit high sensitivity and resolution in detecting BBB reorganization. They allow for mid-to-high throughput screening, making these platforms an attractive tool for biological and pharmaceutical research. Taken together, the developed platforms represent a significant advancement and have the potential to pronouncedly enhance our understanding of BBB biology and CNS disease pathology.

ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasst sich mit dem Entwurf, der Realisierung, der Charakterisierung und der Anwendung von mikrofluidischen *in-vitro*-Modellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS), die eine *in vivo*-ähnliche dreidimensionale (3D) Zellorganisation und physiologische Umgebung aufweisen, um die Reaktion der Barriere auf äußere Einflüsse zu untersuchen und nach BHS-durchlässigen Substanzen gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) zu suchen.

Die hohe Selektivität der BHS hält die Homöostase des Gehirns aufrecht, stellt aber auch ein großes Hindernis für die wirksame Verabreichung von Medikamenten und Therapeutika zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen dar. Der Ausschluss von Therapeutika aus dem Gehirn durch die Barriere ist einer der Hauptfaktoren für die hohe Ausfallrate von auf das Gehirn ausgerichteten Therapeutika. Daher würde die Möglichkeit, schon während der Arzneimittelentwicklung neue Arzneimittel darauf hin zu untersuchen ob sie die BHS überwinden können, dazu beitragen, neue Behandlungsmöglichkeiten für ZNS-Erkrankungen zu entwickeln.

Im Vergleich zu den weit verbreiteten *in-vivo*-Tiermodellen bieten *in-vitro*-Modelle geringere Kosten, einen höheren Durchsatz und die Möglichkeit, auf menschlichen Zellen basierende Modelle zu verwenden, was potenzielle Probleme im Zusammenhang artenabhängiger Unterschiede zwischen menschlicher und tierischer BHS verringert. Darüber hinaus haben *in-vitro*-Modelle dazu beigetragen, den Einsatz von Tieren zu reduzieren und die Arzneimittelentwicklung zu beschleunigen.

In dieser Arbeit werden zwei offene Mikrofluidik-Plattformen zur Realisierung von 3D-BHS-Modellen entwickelt, um die Reaktion der Barriere auf äußere Einflüsse und die Durchlässigkeit der Barriere für Chemotherapeutika zu untersuchen:

(i) Eine auf menschlichen Zellen basierende Plattform für die Blut-Hirn-Schranke mit integrierten, transparenten Elektroden zur Überwachung der Barriereichtigkeit in Echtzeit mittels Impedanz und hochauflösender Bildgebung. Die Plattform wurde verwendet, um zu untersuchen, wie die Schranke auf äußere Verletzungen, wie z. B. einen ischämischen Schock, reagiert. Elektrische Messungen zeigten eine rasche Abnahme des elektrischen Widerstands der Barriere vor dem Auftreten von Aktin-Stressfaserbündeln während des ischämischen Schocks.

(ii) Eine in Plastikmaterial gefertigte, offene mikrofluidische BHS Plattform mit hohem Durchsatz in Kombination mit einer 3D-Zellkultur-basierten Tumormodellplattform für das Wirkstoffscreening. Die Plattform wird verwendet, um die Verabreichung von Wirkstoffkandidaten in das ZNS sowie die Wirksamkeit der Wirkstoffe gegen Tumore und ihre Toxizität für gesunde Zellen zu untersuchen.

Die entwickelten Plattformen weisen ein dynamisches *in vitro* 3D BHS-Modell auf, um das Verständnis der Rolle der BHS bei der Entstehung von ZNS-Erkrankungen zu verbessern und die Identifizierung von Therapeutika für Hirnerkrankungen voranzutreiben. Das entwickelte BHS Modell

ist geeignet für die Aufklärung komplexer Mechanismen, die der Pathogenese von ZNS-Erkrankungen zugrunde liegen, und erleichtert die Identifizierung potenzieller Therapeutika für Hirnerkrankungen. Die entwickelten Plattformen weisen eine hohe Empfindlichkeit und Auflösung bei der Erkennung von BHS-Umstrukturierungen auf und ermöglichen ein Screening mit mittlerem bis hohem Durchsatz, was sie zu einem attraktiven Instrument für die biologische und pharmazeutische Forschung macht. Zusammengefasst stellen die entwickelten Plattformen einen bedeutenden Fortschritt auf diesem Gebiet dar und haben das Potenzial, unser Verständnis der Biologie der BHS und der Pathologie von ZNS-Erkrankungen erheblich zu verbessern.