



Doctoral Thesis

Microfluidic studies of single cells, membrane passage and drug-neutralizing antibodies

Author(s):

Eyer, Klaus

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010175843> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 21876

**MICROFLUIDIC STUDIES OF
SINGLE CELLS,
MEMBRANE PASSAGE
AND DRUG-NEUTRALIZING ANTIBODIES**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Klaus Eyer

Master of Sciences ETH in Pharmaceutical Sciences
Eidg. dipl. Apotheker

date of birth 20.09.1985
citizen of Naters

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Petra S. Dittrich, examiner
Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, co-examiner
PD Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner

2014

Abstract

Upon drug stimulus, the immune system of a patient can respond in many ways and severely influence the outcome. One particular case, the development of neutralizing antibodies during drug therapy, is often associated with therapy failure in long-term schemes. In these cases, the detection of therapy failure can be delayed by insensitive measures to evaluate therapy outcome. Therefore, a reliable, cost-effective and sensitive test for the detection of neutralizing antibodies in patient serum would be beneficial. Several strategies are promising for the detection of neutralizing antibodies. The existing test systems can be divided into cell-based and cell-free approaches. Whereas the cell-based approaches are highly specific and sensitive, they are rather laborious and costly, and need to be exerted by trained personnel. On the other hand, the advantage of cell-free systems is the ease of handling. However, the simplicity results in a loss in sensitivity since most cell-free approaches are only testing binding, and not receptor activation. The aim of this thesis was to combine elements of both approaches that should result in an easy to handle, specific and sensitive analytical device to detect neutralizing antibodies in human serum. As a model system for these studies, luteinizing hormone was chosen as an antigen of interest, and a commercially available neutralizing antibody and pooled serum were used to simulate the neutralizing moiety and the sample matrix.

In this thesis, two different approaches are described. The first approach uses single-cell analysis to detect the neutralizing antibodies. To create and validate such a platform, studies to analyze intracellular proteins and metabolites were conducted first. These studies relied on fluorescence measurements, either by direct assays, immunoassays or enzyme-linked immunoassays. After completion of these studies, the cellular response to luteinizing hormone was analyzed by implementation of a competitive enzyme-linked immunoassay for cyclic adenosine monophosphate at the single-cell level. Here, the developed platform could reveal high intercellular heterogeneity in the cellular answer to the same stimulus. However, it was found that cellular heterogeneity in the response would mask the changes in intracellular cAMP concentration due to neutralizing antibodies. Furthermore, the platform is rather complex and not easy to handle. However, the developed microfluidic system can be used to analyze intracellular contents of single cells in a reliable, quantifiable manner and can therefore help to conduct studies that are inter-

ested in cellular heterogeneity. In a second approach, a system composed of immobilized cell-derived vesicles was created. Although much simpler than a normal cell, cell-derived vesicles contain membrane-bound receptors as well as some intracellular proteins. Furthermore, vesicles have beneficial properties over cells such as easier handling, better stability, a possibility for batch production and storage. Moreover, the detection of any processes on, at or across the membrane is typically more sensitive than in a cell-based assay due to less interfering processes. The detection system uses cell-derived vesicles that generate luminescence upon binding and receptor activation of luteinizing hormone. By the combination of cell-derived vesicles and microfluidics the highly sensitive and quantitative detection of LH-neutralizing antibodies was achieved with a limit of detection of as little as 0.5 nM neutralizing antibody in a 10 % vol/vol serum matrix. This would correspond to 5 nM highly specific neutralizing antibodies in patients serum. The detection thereof only needs 20 minutes. However, if a more thorough characterization is needed, dose-response curves can be generated in less than 2 hours to estimate concentrations and dissociation constants of the antibodies present.

Although promising, future studies have to focus on the testing of actual patients and control sera to estimate the robustness of the device. Furthermore, the test system could be expended to other therapeutic proteins to widen the field of application.

Similar microfluidic devices as the one used for the detection of neutralizing antibodies using cell-derived vesicles were used for the study of membrane permeation. In a first approach, artificially created vesicles were immobilized in a microfluidic channel and the permeation of basic drug-like compounds was studied by means of an encapsulated pH-sensitive dye. Here, good correlation of the on-chip method with stopped-flow measurements was achieved. Furthermore, it was found that the addition of 2 mol/mol % pegylated lipids (PEG 2000) was able to slow permeation without affecting the actual order of the tested compounds. In a further study, cell-derived vesicles from a P-glycoprotein (an efflux transporter) overexpressing cell line were immobilized on-chip and P-gp substrates and inhibitors were assayed for their drug-transporter dissociation constant. Here, a good correlation was found between the on-chip measured apparent dissociation constants with an alternative assay and data provided by the Food and Drug Administration. However, the microfluidic approach allowed an estimation of the apparent dissociation constant in a short amount of time with low sample consumption. In conclusion to this part, due to the very controllable liquid handling in microfluidic environments such studies can help to answer key questions in the field of permeation research, as well as provide simple, reliable and highly controllable test systems.

Zusammenfassung

Bei einer medikamentösen Therapie kann deren Verlauf und Erfolg stark vom Immunsystem des Patienten beeinflusst werden. Eine mögliche Immunreaktion ist die Produktion von hochaffinen, neutralisierenden Antikörpern. Diese ist oftmals verbunden mit dem Scheitern einer Langzeittherapie durch den neutralisierenden Effekt der Antikörper, das Medikament wird wirkungslos. Die Entdeckung dieses Therapieversagens kann aber aufgrund unspezifischer Messmethoden des Therapieverlaufs, z.B. Magnetresonanztomographie (MRT) und Kurtzke-Skala (EDSS) bei Multiple Sklerose, verzögert sein. Darum wäre ein verlässlicher, günstiger und sensitiver Test zur Bestimmung der neutralisierende Antikörper im Patientenserum von Vorteil, da dieser spezifisch den Auslöser nachweisen kann.

Verschiedene Ansätze zur Entwicklung eines solchen Tests können unternommen werden. Die bereits existierenden Systeme zur Detektion können grob in zellbasierte und zellfreie Systeme eingeteilt werden. Der grosse Vorteil zellbasierter Systeme ist ihre gute Sensitivität und Spezifität, während dem sich vor allem die Komplexität, die schwierige Handhabung und Standardisierung nachteilig auswirken. Zellfreie Systeme sind zwar in der Regel einfacher in der Handhabung und Standardisierung, aber auch deutlich weniger sensitiv. Sie testen nur die Bindung des Antigens zum Rezeptor oder einem zweiten Antikörper (und nicht den neutralisierenden Effekt auf nachfolgende Signalwege), wodurch keine Signalamplifikation durch die Aktivierung des Rezeptors stattfindet. Das Ziel dieser Arbeit war es, Vorteile beider Methoden miteinander zu kombinieren. Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines Prototyps des analytischen Systems, welches zwar einfach in der Handhabung ist, aber trotzdem durch eine hohe Sensitivität und Spezifität besticht. Als Modellsystem für die Entwicklung eines solchen Systems wurde luteinisierendes Hormon (LH) und ein kommerziell erhältlicher Antikörper verwendet.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz stützt sich auf der Entwicklung eines Systems basierend auf Einzelzellanalyse zur Bestimmung der neutralisierenden Antikörper im Patientenserum. Zur Entwicklung einer solchen Plattform und zur Validierung derselben wurden zuerst Bestimmungen von intrazellulären Modellproteinen und -metaboliten durchgeführt. Diese Studien basierten auf der Detektion von Fluoreszenzveränderungen, ausgelöst durch direkte Assays zur Bestimmung von Enzymaktivität oder Metabolitenkonzentration, beziehungsweise über integrierte Immunoassays oder Enzym-verstärkter Immunoassays (ELISAs) zur Bestimmung von nicht

direkt nachweisbaren Zellbestandteilen. Nach Beendigung der Validierungsphase wurde die Konzentration von zyklischem Adenosinmonosphat in einzelnen Maus Leydig Tumorzellen untersucht. Zyklisches Adenosinmonophosphat entsteht durch die Rezeptorbindung und -aktivierung durch das Modellantigen LH. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein kompetitiver ELISA in die Plattform integriert. In dieser Studie wurde eine starke Heterogenität in der Zellantwort auf den LH-Stimulus nachgewiesen. Die gefundene Zellheterogenität verhinderte die Benutzung der entwickelten Plattform zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern im Serum. Ausserdem entspricht die entwickelte Plattform aufgrund seiner Komplexität nur bedingt den Anforderungen eines schnellen Diagnostik-Tests. Allerdings eignet sich das entwickelte System aber hervorragend um intrazelluläre Konzentrationen von Proteinen und Metaboliten zu bestimmen, und kann somit gut für Studien eingesetzt werden die an der Untersuchung der Zellheterogenität interessiert sind.

Der zweite Ansatz wurde basierend auf immobilisierten, von Zellen abgeleiteten Liposomen entwickelt. Obwohl diese Liposomen sehr viel einfacher aufgebaut sind als eukaryotische Zellen beinhalten sie doch alle Komponenten um eine Verstärkung des Signals zu ermöglichen. Auf der anderen Seite fehlen viele störende zelluläre Prozesse, weshalb die erzeugten Signale in der Regel spezifischer sind. Die abgeleiteten Liposomen enthalten sowohl membranassoziierte Rezeptoren und Transmembranproteine als auch intrazelluläre Proteine welche für die Signalamplifikation notwendig sind. Weitere Vorteile der Liposomen liegen in ihrer einfacheren Handhabung, der besseren Stabilität und der einfacheren Lagerung im Vergleich zu Zellen. Die schlussendlich verwendeten zellbasierten Liposomen wurden von einer gentechnisch modifizierten Zelllinie abgeleitet, die in Abhängigkeit eines LH-Stimulus Biolumineszenz produziert. In diesem Teilkapitel der Arbeit konnte durch die Kombination von zellbasierten Liposomen und Mikrofluidik die sensitive und spezifische Bestimmung von neutralisierendem Antikörper gezeigt werden. Ein Detektionslimit von 0.5 nM neutralisierendem Antikörper in 10 % vol/vol Serumhintergrund konnte erreicht werden, was einer Konzentration von 5 nM in Patientenblut entspräche. Der Detektionsvorgang benötigte nur 20 Minuten. Für eine genauere Charakterisierung des im Patientenserum vorhandenen Antikörpers kann auch eine Dosis-Wirkungskurve innerhalb von 90 Minuten erzeugt werden, aus welcher die Konzentration und Bindungsaffinität abgeschätzt werden kann.

Zukünftige Studien sollten die Robustheit des Systems untersuchen. Obwohl diese ersten Resultate aussichtsreich erscheinen, sind sie mit standardisierten Reagenzien und unter kontrollierten Bedingungen entstanden und das System muss sich erst noch im klinischen Umfeld bestätigen. Des weiteren wäre es auch wünschenswert, das Einsatzspektrum des entwickelten Systems auf andere Therapeutika auszuweiten.

Das zur Detektion von neutralisierenden Antikörpern entwickelte mikrofluidische System kann, leicht modifiziert, auch zum Studium anderer Prozesse verwendet werden. Exemplarisch wurde in dieser Arbeit die Kinetik der Membranpassage von Arzneistoffen untersucht. Artifizuell hergestellte Vesikel wurden in einem mikrofluidischen Kanal immobilisiert, und ein eingeschlossener pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion der passiven Permeation von basischen Arzneistoffen verwendet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die gefundenen relativen Permeationskoeffizienten mit Werten übereinstimmen welche mittels Stopped-flow Apparat ermittelt wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die passive Permeation durch die Einbettung pegylierter Lipide verlangsamt werden kann, wobei der Einfluss bei allen untersuchten Substanzen gleichermassen verlief.

In einer weiteren Studie wurden zell-basierte Vesikel einer P-glykoprotein exprimierenden Zelllinie verwendet, um die Wechselwirkung von Arzneistoffen mit diesem Transporter zu ermitteln, welcher den Transport von Wirkstoffen aus der Zelle verursacht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Werte in guter Übereinstimmung mit publizierten Werten der amerikanischen Zulassungsbehörde sowie auch mit Werten ermittelt durch einen ATPase Assay sind. Die Vorteile der mikrofluidischen Bestimmung von Permeation liegen in den geringen Verbrauchsvolumina sowie in der kurzen Zeit welche zur Durchführung der Tests notwendig sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass solche mikrofluidischen Systeme durch ihre ausserordentliche Kontrolle über die Flüssigkeiten grosse Vorteile bergen. Diese Systeme können helfen, weitere grundlegende Erkenntnisse im Forschungsfeld der Membranpassage zu erlangen, sowie Grundlagen bieten zur Entwicklung günstiger und effektiver Testsysteme zur Arzneistoffentwicklung sowie Diagnose von Krankheiten.