



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

An Acoustically-Driven Biochip – Impact of Flow on the Cell-Association of
Targeted Drug Carriers

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Silke Dissauer
Matrikel-Nummer:	0203280
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A 449 Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao.Univ.Prof.Mag.Dr. Michael WIRTH

Wien, im Mai 2009

Ein herzliches Dankeschöne an alle die mich während meines Studiums unterstützt haben!

Dieser Dank geht vor allem an

Herrn Ao.Univ.Prof.Mag.pharm.Dr.Michael Wirth und Herrn
Ao.Univ.Prof.Mag.pharm.Dr. Franz Gabor für die hervorragende Betreuung und die
Einführung in das spannende Arbeiten der Zellkultur und Nanotechnologie

Mag.pharm.Christian Fillafer für die exzellente Unterstützung und die kompetenten
Ratschläge, sowohl beim experimentellen Arbeiten als auch beim Verfassen meiner
Diplomarbeit

die gesamte Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima

meine Familie, insbesondere an meine Eltern für jegliche Unterstützung während des
gesamten Studiums

meine Freunde und Studienkollegen für die Motivation und Aufmunterung in schwierigen
Zeiten und das Miterleben wundervoller Studienjahre.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
PROBLEMSTELLUNG	3
ERGEBNISSE und DISKUSSION	8
ANHANG A	15

PUBLIKATION

An Acoustically-Driven Biochip –

Impact of Flow on the Cell Association of Targeted Drug Carriers

ABSTRACT	16
1 INTRODUCTION	17
2 RESULTS AND DISCUSSION	19
3 CONCLUSIONS	28
4 EXPERIMENTAL SECTION	29

5 REFERENCES	33
LITERATURVERZEICHNIS	36
CURRICULUM VITAE	38

PROBLEMSTELLUNG

Durch die sukzessive Optimierung biotechnologischer Verfahrenstechniken stehen hochwirksame Arzneistoffe wie Proteine, Peptide, Desoxyribonucleinsäuren (DNS) oder Ribonucleinsäuren (RNS) zusehends auch für therapeutische Zwecke zur Verfügung. Die parenterale sowie die für den Patienten weitaus angenehmere perorale Applikation dieser komplexen Wirkstoffe gestalten sich jedoch aus mehrerlei Gründen schwierig. Neben der weitgehenden Denaturierung der genannten Substanzen im stark sauren Magenmilieu und der enzymatischen Spaltung durch intestinale Proteasen und Peptidasen ist fraglich, ob die Resorbierbarkeit dieser hydrophilen Makromoleküle im Gastrointestinaltrakt ausreicht, um therapeutische Plasmakonzentrationen zu erzielen. ^[1] Einen vielversprechenden Ansatz zum Schutz des Arzneistoffs unter diesen degradativen Bedingungen stellt die Verkapselung in aus Polymeren bestehenden Nano- und Mikropartikeln dar. Bei diesen Wirkstoffträgersystemen kann durch gezielte Wahl des Matrixmaterials die Freisetzungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs gesteuert werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, zielerkennende Strukturen an der Partikeloberfläche zu immobilisieren, mit deren Hilfe sowohl eine effizientere Wirkstoffresorption als auch ein verbesserter Wirkstofftransport zu bestimmten Zell- oder Gewebstypen erreicht werden kann. Somit könnte die bei konventionellen Arzneiformen unspezifische Biodistribution, im Fall der Verwendung eines zielgerichteten Wirkstoffträgersystems, in Richtung des erkrankten Gewebes verschoben werden. Folglich kann der Wirkstoff bei gleichem therapeutischem Effekt in weitaus geringerer Dosierung eingesetzt werden, wodurch sowohl die Einnahmefrequenz, Nebenwirkungsrate als auch Toxizität gesenkt würden.

Um die prinzipielle Eignung derartiger kolloidaler Systeme als Applikationsformen untersuchen und besser einschätzen zu können, sind geeignete und ausreichend

charakterisierte *in vitro* Testmodelle notwendig. Zu diesem Zweck werden vor allem Systeme verwendet, die eine möglichst funktionsgetreue Imitation von *in vivo* Verhältnissen erlauben und mit denen grundlegende Interaktionscharakteristika direkt an humanen Zellen untersucht werden können. Aus biopharmazeutischer Sicht kommt dabei in erster Linie Resorptionsmodellen eine herausragende Bedeutung zu. Vor allem bei Fragestellungen zur Wirkstoffabsorption nach peroraler Applikation haben sich Caco-2 Zellmonolayer aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Ähnlichkeit mit dem humanen Dünndarmepithel bewährt. ^[2] Bislang wurden Interaktionsstudien in diesen Testsystemen zumeist unter stationären Bedingungen durchgeführt. Bei derartigen Versuchsaufbauten werden die Interaktionseigenschaften der Nano- und Mikropartikel mit dem Zellmonolayer aber hauptsächlich von der eingesetzten Partikelkonzentration sowie der Gravitation und der temperaturabhängigen Diffusion beeinflusst. Der im menschlichen Körper vorherrschenden Dynamik aufgrund von Peristaltik, Blut- beziehungsweise Lymphfluss wird bei den derzeit verwendeten Modellen nicht oder nur ungenügend Rechnung getragen. Durch Integration dieses Parameters in *in vitro* Testsysteme ließe sich das Verhalten einer partikulären Arzneiform unter physiologischen Bedingungen wesentlich präziser vorhersagen.

Bezüglich der Auswirkung von Flussbedingungen auf die Partikel-Zell-Interaktion werden zwei unterschiedliche Effekte beschrieben: Einerseits wird durch forcierte Konvektion die Kontakthäufigkeit der Partikel mit der Oberfläche und folglich auch die Bindungswahrscheinlichkeit erhöht. Andererseits können hydrodynamisch erzeugte Scherkräfte auf rollende aber auch adhärierte Partikel desorbierend wirken. ^[3] Im Rahmen dieser dynamischen Prozesse spielen sowohl die Flussgeschwindigkeit als auch die Partikelgröße und die Stärke der Partikel-Zell Interaktion eine entscheidende Rolle. Das Wechselspiel dieser Faktoren wurde bisher insbesondere für Zell-Zellinteraktionen im

Zusammenhang mit Prozessen wie der Plättchenadhäsion, der Leukozytenmigration sowie der Tumormetastasierung beschrieben und detailgenau untersucht. ^[4,5,6,16] Ein für diese Zwecke verwendetes Fluidiksystem ist der Radial-Flow Detachment Assay (RFDA). Diese Apparatur besteht aus einem längs der Achse zentrisch durchbohrten Plexiglaszylinder und einer in festgelegtem Abstand zur Bohrungsöffnung parallel befestigten Glasplatte. Letztere kann je nach Fragestellung mit Biomolekülen oberflächenmodifiziert oder mit Zellen bewachsen vorliegen und kurz vor Versuchsbeginn ins System integriert werden. Indem das zu bewegende Medium mittels einer Peristaltik- oder Spritzenpumpe durch die Einlassbohrung gepumpt wird, entsteht zwischen der Oberseite des Plexiglaszylinders und der Glasplatte ein axialsymmetrisches laminares Flussfeld. Die effektiven Scherkräfte sind dabei in der Nähe der Einlassöffnung am höchsten und fallen mit zunehmender Radialentfernung definiert ab. Ein eintretendes Teilchen interagiert beim Durchlaufen dieses Scherkraftgradienten mit der Zieloberfläche und adhäriert entsprechend seiner Wechselwirkungsstärke in einer gewissen Distanz zum Einflusspunkt. Diese Distanz gibt den Scherkraftbereich an, ab dem die adhäsiven gegenüber den hydrodynamischen Kräften überwiegen und somit zur Bindung des Teilchens führen. ^[5]

Ein etwas einfacheres und seit kurzem auch in miniaturisiertem Maßstab erhältliches Flusssystem ist die Parallel Plate Flow Chamber (PPFC). ^[6] Dieses Modell ähnelt einem Tunnel mit rechtwinkeligem Querschnitt, an dessen Enden geeignete Pumpen über Schlauchverbindungen angeschlossen werden. Analog zum RFDA können, abgestimmt auf das zu untersuchende System, entweder oberflächenmodifizierte oder zellbewachsene Bodenplatten verwendet werden. Im Unterschied zum oben beschriebenen Modell bildet sich in der PPFC beim Anlegen eines Flüssigkeitsstroms ein homogenes, parabolisches, laminares Strömungsfeld aus, in dem die Interaktion von Partikeln mit der Zieloberfläche bei einer definierten Scherrate untersucht werden kann. ^[7]

Obwohl die genannten Systeme für spezifische Fragestellungen zweifelsfrei gut geeignet sind, ist ihre breite Anwendung in der pharmazeutischen Entwicklung schwer vorstellbar. Um sowohl hohe Durchsatzraten als auch reproduzierbare Untersuchungen zu ermöglichen, müssen *in vitro* Testsysteme in diesem Bereich miniaturisierbar, parallelisierbar und automatisierbar sein. Die durchwegs aufwendigen Apparaturen und Schlauchverbindungen von PPFCs und RFDAs, verbunden mit Kontaminationsrisiken und geringer analytischer Flexibilität erweisen sich in dieser Hinsicht als unvorteilhaft. Ein vielversprechender Ansatz, um diesen Problemen beizukommen, liegt in der Entwicklung alternativer Pumptechnologien. Diesbezüglich könnte die Forschung im Bereich mikrofluidischer Systeme, die Schnittgebiete zwischen Chiptechnologie und Fluidik darstellen, auch innovative Lösungen für pharmazeutische Testmodelle bieten. Eine besonders interessante, weil nicht-invasive Methodik sind dabei akustische Oberflächenwellen (surface acoustic waves, SAW), die ein Pumpen auf planaren Substraten erlauben. Diese aus der Halbleiterindustrie stammende Technologie wurde im letzten Jahrzehnt für fluidische Systeme etabliert und von der Firma Advantix (Teil von Olympus Life Science Research Europa GmbH) zur Marktreife gebracht.^[8] Grundsätzlich bestehen SAW-Chips aus einem deckglasartigen piezoelektrischen LiNbO₃-Substrat, auf dem mittels Lithografie und Plasma-Verdampfung interdigitierende Transducer (IDTs) aus Gold aufgebracht werden. Durch Anlegen einer hochfrequenten Spannung an diese Transducer wird die Substratoberfläche im Nanometerbereich deformiert. Dieses „Nanoerdbeben“ führt beim Einkoppeln in Flüssigkeit zu einem lokalen Druckgradienten, der in weiterer Folge eine gerichtete Strömung bewirkt.^[9] Zur Kanalisierung dieser Strömung können Strukturen aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) verwendet werden. Dieses Polymer hat sich aufgrund der günstigen Werkstoffeigenschaften, geringen Toxizität und optischen Transparenz bei der Fertigung mikrofluidischer Kanäle im Labor- und Großmaßstab bewährt.^[9]

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte die grundsätzliche Anwendbarkeit der SAW-Technologie als Pumpmethode für zellbewachsene Mikrofluidikchips untersucht werden. Im Speziellen sollte dabei ein *in vitro* Modell für den humanen Dünndarm entwickelt werden, das in der Lage ist, physiologische Flussbedingungen über einer die Resorptionsbarriere imitierenden Caco-2 Zellmonolayer zu erzeugen. Mit Hilfe dieses Systems sollten potentielle Unterschiede in der Partikel-Zellinteraktion zwischen stationären und dynamischen Inkubationsbedingungen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Mikropartikel-Bindungsstudien bei unterschiedlichen Flussbedingungen mit einem zielgerichteten Wirkstoffträgersystem aus Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) durchgeführt. Um die Cytoadhäsivität der PLGA Mikropartikel zu erhöhen wurde als Targeter Weizenlektin aus *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin, WGA), das an N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure der Zellmembranassoziierten Glykokalyx bindet, an die Partikeloberfläche gekoppelt.^[10] Inwiefern der unter stationären Bedingungen bereits beschriebene, bindungsvermittelnde Effekt an Caco-2 Zellmonolayer auch unter dynamischen Bedingungen auftritt, sollte am SAW-Biochip bei Peristaltik-Simulierenden Flussbedingungen ermittelt werden.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

„An Acoustically-driven Biochip – Impact of Flow on the Cell-Association of Targeted Drug Carriers“

von C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor, M.F. Schneider

(siehe Anhang A) maßgeblich beigetragen werden.

Kolloidale Trägersysteme stellen einen viel versprechenden Ansatz zur zielgerichteten Verabreichung von Wirkstoffen dar. Um die Effizienz solcher Applikationsformen bereits vor der Phase von Tierversuchen möglichst realistisch bewerten zu können, müssen *in vitro* Modelle etabliert werden, mit deren Hilfe man die Verhältnisse *in vivo* detailgenau simulieren kann. Bislang wurden derartige Interaktionsstudien mit Zellmonolayern zumeist stationär durchgeführt. Die unter physiologischen Bedingungen auftretenden Flüsse und damit assoziierten hydrodynamischen Kräfte werden dabei jedoch nicht berücksichtigt. Auf dieser Problemstellung gründend wurde im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit ein chipbasiertes, dynamisches *in vitro* Testmodell zur Charakterisierung der Partikel-Zell Interaktion entwickelt. Mittels hochfrequenzgesteuerter akustischer Oberflächenwellen werden in diesem mikrofluidischen System exakt regulierbare laminare Flüssigkeitsströme erzeugt. Durch Variation der Ausgangsleistung der Hochfrequenzquelle können geringste Flüssigkeitsmengen (pl bis ml) in Mikrokanälen mit Scherraten zwischen $0,01 \text{ s}^{-1}$ und 1000 s^{-1} gepumpt werden. Dabei kann nicht nur eine zeitlich konstant gesteuerte, gleichmäßige

Strömung des flüssigen Mediums erzielt, sondern es können auch pulsatile Strömungsverhältnisse simuliert werden.

Um Zellen auf einer abgegrenzten Wachstumsoberfläche kultivieren und das überstehende Medium kanalisieren zu können, wurden mittels Formgussverfahren tunnelartige 3D-Mikrokanäle (44 mm x 4 mm x 3 mm, Länge x Breite x Höhe) aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) hergestellt. Die beschriebene Kanalstruktur wurde vorrangig deshalb derart dimensioniert, um ein ausreichendes Fassungsvermögen für das Zellkulturmedium zu bieten; grundsätzlich können aber beliebige Geometrien gefertigt werden. So ist beispielsweise auch die Modellierung von verengenden und bifurkierenden Kanälen des Blutgefäßsystems realisierbar.^[9]

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden Bindungsstudien auf konfluenten Caco-2 Zellmonolayern mit BSA- beziehungsweise WGA-modifizierten Mikropartikeln durchgeführt. Die Partikel wiesen eine durchschnittliche Größe von $2,86 \pm 0,95 \mu\text{m}$ und eine Dichte von $\sim 1,28 \text{ g cm}^{-3}$ auf. Nach Anzüchten der Zellen in den 3D-Mikrokanälen wurden die Mikrokanäle für die einzelnen Versuche mit 500 μl der jeweiligen Partikelsuspension ($7,5 \times 10^5$ Partikel / 500 μl) befüllt und unter stationären bzw. dynamischen Bedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Puffer gewaschen, der PDMS-Kanal abgezogen und der Deckglas-assozierte Zelllayer auf einem Objektträger in FluorSafe™ eingebettet. Die Anzahl der zellgebundenen Mikropartikel wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und softwaregestützter Auswertung derer ermittelt.

Interaktion von proteinmodifizierten Mikropartikeln mit Caco-2 Zellen unter stationären Bedingungen

Um die Auswirkungen dynamischer Inkubationsbedingungen auf die Bindung von BSA- beziehungsweise WGA-Mikropartikeln an Caco-2 Zellen besser einschätzen zu können, wurde zunächst ein Referenzwert unter stationären Bedingungen ermittelt. Hierbei sedimentieren die eingesetzten Partikel im Gleichgewicht zwischen Reibungskraft und Schwerkraft mit einer Geschwindigkeit von $1,4 \mu\text{m s}^{-1}$. Folglich kann bei einer Versuchsdauer von 30 min eine Sedimentation von 83% der Mikropartikel auf den Zelllayer angenommen werden. Bei der eingesetzten Partikelkonzentration entspricht dies einer maximalen Oberflächenbedeckung von 3500 mm^{-2} .

Wie aus Figure 2 (Seite 21) ersichtlich, besteht in der Zellbindung unter stationären Bedingungen ein deutlicher Unterschied zwischen BSA- und WGA-modifizierten Mikropartikeln. Im Fall von BSA-MP wurden nach den Waschschritten 94 ± 64 zellassozierte Partikel pro mm^2 detektiert. Dies entspricht nur 3% der theoretischen Belegung und kann auf die geringe Affinität von BSA zu Caco-2 Zellen zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu ergab die softwaregestützte Auswertung eine Bindung von 1500 ± 307 WGA-MP pro mm^2 unter denselben Versuchsbedingungen. Die im Vergleich zu BSA-MP 16-fach erhöhte Zellassoziations (siehe Figure 3A+B, Seite 22) weist auf die selektive Bindung von WGA an N-Acetyl-D-Glukosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Strukturen der zellulären Glykokalyx hin. ^[14,15]

Einfluss von hydrodynamischen Kräften auf zellassozierte Partikel

Um den Einfluss unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten auf bereits zellgebundene Mikropartikel zu untersuchen, wurden Caco-2 Monolayer wie zuvor beschrieben unter stationären Bedingungen mit BSA- beziehungsweise WGA-MP beladen. Nach drei

Waschschritten mit isotonem Puffer wurde 30 min lang bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten inkubiert. Bereits in Anwesenheit geringer hydrodynamischer Kräfte konnte bei beiden proteinmodifizierten Partikeltypen eine Reduktion der Bindung an die Zellmembran beobachtet werden (siehe Figure 4, offene Symbole, Seite 26). Im Fall von BSA-MP wird dieser Effekt durch eine um 30% beziehungsweise 50% verringerte Zellbindung bei Flussgeschwindigkeiten von $300 \mu\text{m s}^{-1}$ beziehungsweise $800 \mu\text{m s}^{-1}$ veranschaulicht. Eine Inkubation bei höheren Flussgeschwindigkeiten resultiert in einer annähernd vollkommenen Loslösung der albuminmodifizierten PLGA-Partikel vom Zellmonolayer (siehe Figure 3C, Seite 22). Letzteres tritt im Fall von WGA-MP bei keiner der untersuchten Strömungsbedingungen auf. Obwohl es auch hier zu einer flussgeschwindigkeitsabhängigen Reduktion der Anzahl zellgebundener Partikel kommt, konnten auch bei der höchsten untersuchten Geschwindigkeit ($1700 \mu\text{m s}^{-1}$) 400 ± 168 Partikel pro mm^2 detektiert werden. Im Vergleich zu BSA-MP zeichnen sich WGA-MP damit durch eine mindestens 17-fach, bei den höchsten Flussgeschwindigkeiten sogar 39- beziehungsweise 44-fach, erhöhte Adhäsion am Monolayer aus.

Aus dem Verlauf und der geringen interexperimentellen Abweichung der Bindungskurven in Figure 2 (Seite 21) kann gefolgert werden, dass auf dem SAW-Chip reproduzierbare Flüssigkeitsströme erzeugt werden können. Das gilt als Grundvoraussetzung für die Nutzung des Chipsystems als dynamisches *in vitro* Modell. Die Standardabweichungen der Datenpunkte erscheinen zwar relativ hoch, sind aber vergleichbar mit denen in ähnlichen Studien und sind vermutlich auf die Kombination aus Einsatz einer biologischen Zelloberfläche und bildgestützter Quantifizierung zurückzuführen. Um die Abweichungen zu verringern, könnten rezeptormodifizierte planare Oberflächen als Substrate verwendet werden. Dadurch würde die Partikelbindung auf einem homogen beschichteten Material erfolgen und etwaige Tiefenschärfeeffekte bei der optischen Auswertung könnten vermieden werden. Hinsichtlich der Untersuchung der Interaktion von

Wirkstoffträgersystemen mit biologischen Barrieren stellt dieser Ansatz jedoch keine sinnvolle Alternative dar. ^[16,17,18]

Interaktion von proteinmodifizierten Mikropartikeln mit Caco-2 Zellen unter dynamischen Bedingungen

Wie bereits erwähnt, bestimmt bei stationären Bedingungen die Sedimentation im Schwerfeld die Depositionsrate der Partikel auf dem Zelllayer. Unter Flussbedingungen kommt es im 3D-Mikrokanal hingegen zur Ausbildung eines parabolischen Strömungsprofils. Unabhängig von der Flussgeschwindigkeit ergibt sich dadurch rein rechnerisch, dass nur 56% der eingesetzten Kolloide während der Versuchsdauer in Kontakt mit dem Monolayer kommen. Neben dieser systemimmanenten Reduktion der Depositionsrate kommt es unter Flussbedingungen jedoch zu einer zusätzlichen Abnahme der Anzahl zellassoziierter Partikel (siehe Figure 4, Seite 26). ^[5,19] Ausgehend von den Bindungskapazitäten von 3% für BSA- und 43% für WGA-MP unter stationären Bedingungen, ergibt sich für die dynamischen Experimente rechnerisch eine maximale Oberflächenbedeckung von $\sim 70 \text{ mm}^{-2}$ beziehungsweise $\sim 1000 \text{ mm}^{-2}$. Im Fall der niedrigsten Flussgeschwindigkeit ($300 \mu\text{m s}^{-1}$) erweist sich diese Annahme als durchwegs zutreffend, wie experimentell bestimmte Bindungszahlen von $77 \pm 31 \text{ mm}^{-2}$ für BSA-MP und $747 \pm 241 \text{ mm}^{-2}$ für WGA-MP belegen. Bei der höchsten untersuchten Flussgeschwindigkeit ($1700 \mu\text{m s}^{-1}$) kommt es zu einer beinahe vollständigen Inhibition der Bindung von BSA-MP an die Caco-2-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte im Fall von WGA-MP auch bei direkter Inkubation unter Flussbedingungen eine zwar reduzierte, aber dennoch vergleichsweise hohe Partikelbindung an den Zellmonolayer nachgewiesen werden. Dieser durch das cytoadhäsive Lektin vermittelte Effekt war sowohl bei den kleinsten, als auch bei den größten Scherraten eindeutig vorhanden. Dennoch muss darauf

hingewiesen werden, dass auch WGA-modifizierte Mikropartikel bei höheren Flussgeschwindigkeiten eine deutlich reduzierte Adhäsion zum Caco-2 Zellmonolayer zeigen. Dies könnte sowohl auf einer begrenzten Cytoadhäsivität des Lektinmoleküls als auch der Größe der verwendeten Partikel beruhen. Da mit abnehmendem Partikelradius geringere hydrodynamische Anpressdrücke auftreten, sollten bei hohen Scherraten mit Nanopartikeln höhere Depositionsraten erreicht werden können als mit Mikropartikeln.^[6]

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der entwickelte SAW-Chip als *in vitro* Modell für die Simulation von physiologischen Flussbedingungen geeignet ist. Im Rahmen erster Experimente mit diesem System wurde gezeigt, dass die Bindung von proteinmodifizierten Partikeln an Caco-2 Zellen unter dynamischen Inkubationsbedingungen stark reduziert ist. Durch Modifikation der Partikeloberfläche mit Weizenlektin werden jedoch sowohl unter stationären als auch dynamischen Bedingungen wesentlich höhere Bindungsraten erreicht als bei BSA-modifizierten Partikeln. Die Ergebnisse bestätigen auch die generelle Funktionalität des Lektin-Konzepts zur Verbesserung der Adhäsion von partikulären Arzneistoffträgern an Enterozyten nach peroraler Applikation. Darüber hinaus wird aus den Ergebnissen der durchgeführten Studien ersichtlich, dass elaborierte *in vitro* Modelle für die Entwicklung von effektiven zielgerichteten Wirkstoffträgersystemen hohe Bedeutung haben. In dieser Hinsicht hat sich der entwickelte SAW-Biochip als geeignetes System zur Simulierung von physiologischen Flussbedingungen erwiesen.

An Acoustically-Driven Biochip - Impact of Flow on the Cell-Association of Targeted Drug Carriers**

Christian Fillafer, Gerda Ratzinger, Jürgen Neumann, Zeno Guttenberg, Silke Dissauer, Irene K. Lichtscheidl, Michael Wirth, Franz Gabor, Matthias F. Schneider*

- [*] - C. Fillafer, G. Ratzinger, S. Dissauer, Prof. M. Wirth, Prof. F. Gabor
University of Vienna
Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics
Faculty of Life Sciences
Althanstr. 14
1090 Vienna (Austria)
Phone: (+43)-1-4277-55406
Fax: (+43)-1-4277-9554
E-Mail: franz.gabor@univie.ac.at
- J. Neumann, Dr. M.F. Schneider
University of Augsburg Experimentalphysik I – Biological Physics Group
Universitätstr. 1
86135 Augsburg (Germany)
Phone: (+49)-821-598-3311
Fax: (+49)-821-598-3225
E-Mail: matthias.schneider@physik.uni-augsburg.de
- Dr. Z. Guttenberg
Olympus Life Science Research Europa GmbH
Sauerbruchstr. 50
81377 Munich (Germany)
- Prof. I.K. Lichtscheidl
University of Vienna
Cell Imaging and Ultrastructure Research
Althanstr. 14
1090 Vienna (Austria)

- [**] The authors thank U. Länger and Y.X. Wang for help with preparation of the microspheres, Rohde&Schwarz GmbH for assistance with the high frequency generator and K. Sritharan, S. Nuschele for helpful discussions. Parts of this work were supported by the CellPROM project, funded by the European Community as contract No. NMP4-CT-2004-500039 under the 6th Framework Programme for Research and Technological Development in the thematic area of “Nanotechnologies and nanosciences, knowledge-based multifunctional materials and new production processes and devices”. The contribution reflects the author’s views and the community is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

Abstract

The interaction of targeted drug carriers with epithelial and endothelial barriers *in vivo* is largely determined by the dynamics of the body fluids. To simulate these conditions in binding assays, a fully biocompatible *in vitro* model was developed which can accurately mimic a wide range of physiological flow conditions on a thumbnail-format cell-chip. This acoustically-driven microfluidic system was used to study the interaction characteristics of protein-coated particles with cells. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles ($2.86 \pm 0.95 \mu\text{m}$) were conjugated with wheat germ agglutinin (WGA-MP, cytoadhesive protein) or bovine serum albumin (BSA-MP, nonspecific protein) and their binding to epithelial cell monolayers was investigated under stationary and flow conditions. While mean numbers of $1500 \pm 307 \text{ mm}^{-2}$ WGA-MP and $94 \pm 64 \text{ mm}^{-2}$ BSA-MP respectively were detected to be cell-bound in the stationary setup, incubation at increasing flow velocities increasingly antagonized the attachment of both types of surface-modified particles. However, while binding of BSA-MP was totally inhibited by flow, grafting with WGA resulted in a pronounced anchoring effect. This was indicated by a mean number of $747 \pm 241 \text{ mm}^{-2}$ and $104 \pm 44 \text{ mm}^{-2}$ attached particles at shear rates of 0.2 s^{-1} and 1 s^{-1} respectively. Due to the compactness of the fluidic chip which favours parallelization, this setup represents a highly promising approach towards a screening platform for the performance of drug delivery vehicles under physiological flow conditions. In this regard, the flow-chip is expected to provide substantial information for the successful design and development of targeted micro- and nanoparticulate drug carrier systems.

Keywords

flow, chip, particle, microfluidic, WGA

1. Introduction

Physiological and pathological processes such as the site-specific adhesion of platelets, leukocytes or metastasizing cancer cells underlie sophisticated mechanisms in order to efficiently function in the presence of hydrodynamic flow. Substantial knowledge about these processes has been generated by simulating physiological shear conditions with *in vitro* fluidic systems such as the parallel plate flow chamber (PPFC) and the radial flow detachment assay (RFDA).^[1-4] Although primarily aimed at understanding physiology, these fundamental studies also bear essential implications for the development of targeted colloidal drug carriers.^[1, 3, 5] Presently, the target effect of site-specific drug delivery systems is by default determined with *in vitro* cell binding assays under stationary conditions. However, regarding the extent and specificity of particle binding, recent reports have identified clear discrepancies between the results obtained from stationary and more realistic, dynamic models of the *in vivo* environment.^[6-8] Particularly, the presence of substantial hydrodynamic drag forces upon application *in vivo* is expected to explicitly affect the deposition characteristics of ligand-coated particles.^[7, 9, 10] The peristaltic motion in the gastrointestinal tract, for example, leads to streaming velocities of $\sim 85 \mu\text{m s}^{-1}$ in the jejunum and $\sim 55 \mu\text{m s}^{-1}$ in the ileum.^[11] The variation of flow conditions in the circulatory system is even more pronounced as illustrated by effective shear rates ranging from 1 s^{-1} in wide vessels to 10^5 s^{-1} in small arteries.^[12] To attain preferential binding of the carrier to the diseased tissue in this environment, the size and ligand coating density of the colloids has to be adjusted according to the flow conditions as well as the expected receptor density and affinity at the target tissue.^[1, 2, 5] In order to be able to practically optimize these parameters of potential drug delivery vehicles, parallelisable *in vitro* bioassays have to be developed which offer the possibility of controllable flow generation. At this, increased experimental throughput is highly necessary in order to cope with the extensive amount of

samples which have to be processed to generate sufficient data sets. Although well suited for specific questions, the PPFC and RFDA are of limited use for such applications. When multiple experiments are demanded at high reproducibility, the complexity of these methods' tubing and chambers becomes cumbersome to handle. Microfluidic pumping techniques might allow for approaching these shortcomings successfully. The most common methods to generate flow in miniaturised systems are thermophoresis (via Marangoni forces), electrochemical reactions, surface patterning methods, electro-osmosis, induced charge electro-osmosis as well as several mechanical pumping strategies.^[13, 14] However, these techniques' suitability is limited for systems which are required to comply with cell growth and cell viability. For such applications a micropumping technology based on acoustic streaming might represent a highly promising alternative. This technique generates locally defined surface acoustic waves (SAWs) which, when coupled into liquid, result in a defined pressure gradient that can be utilized for streaming (Figure 1A).

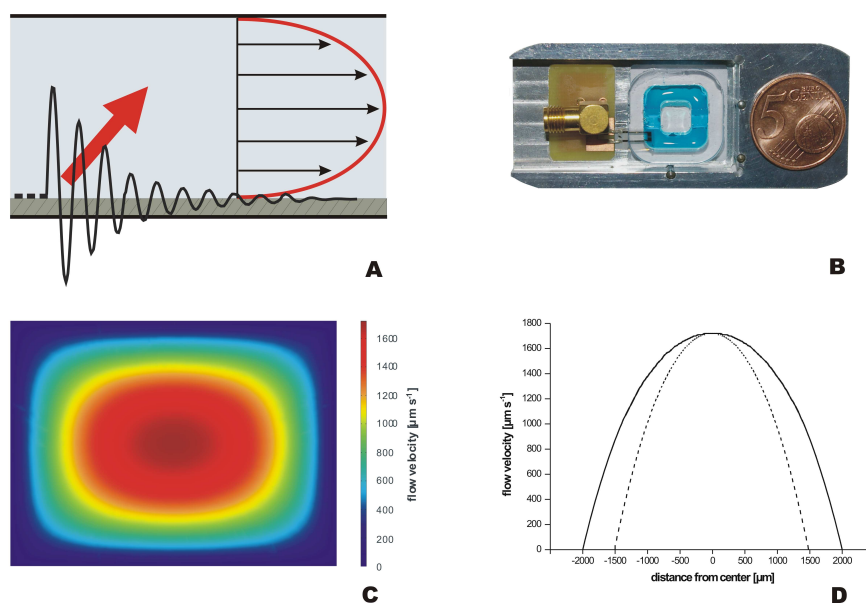


Figure 1. SAWs are generated on a piezoelectric chip and lead to fluid streaming with a parabolic flow profile when coupled into a liquid-filled channel (A). Dimensions of the SAW-chip with a positioned 3D-microchannel (B). Cross section of the flow velocity profile generated in a 3D-microchannel by acoustic streaming 4 mm x 3 mm (width x height) (C). Horizontal (D, solid line) and vertical cut (D, dashed line) through (C).

In the work presented, the applicability of this technology to controllably produce fluid flow in a miniaturized pharmaceutically relevant *in vitro* bioassay was tested. At this, the effect of shearing on the association of protein-decorated particles with epithelial cell monolayers was investigated. Biocompatible poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles (MP) conjugated with fluorescence labelled wheat germ agglutinin (WGA) and bovine serum albumin (BSA) served as representative targeted and non-targeted model drug carrier systems. This model system was chosen, since studies have shown that decoration with WGA mediates binding to Caco-2 cells under stationary conditions.^[15, 16] The extent of a targeting effect in the presence of hydrodynamic drag was investigated using the micropumping SAW-chip (Figure 1B) to simulate physiological flow conditions.

2. Results and Discussion

2.1 The acoustically-driven microfluidic system

Similar to conventional flow assays such as the PPFC and RFDA, the acoustically-driven flow chip is based on a fluidic channel which is directly accessible during the experiment via microscopy. However, in contrast to the previously mentioned assays that are driven by external mechanical pumps, the developed microfluidic chip uses a planar, non invasive pumping principle for flow generation. This technique realizes the contamination-free pumping of liquid volumes as small as a few microliters by surface acoustic streaming which can generate shear rates between 0.01 s^{-1} and 1000 s^{-1} depending on the system's geometry. As a consequence of the high frequency signal based generation of the SAW, the pumping performance is continuously actuated and varied via the parameters of a conventional signal generator (see Video S1 of the Supporting Information).^[17] By channelizing the streamed liquid into 3D-microchannels, which are readily fabricated in almost arbitrary geometries by elastomeric molding, a flow chamber can be created. In this

study, a rather simple 44 mm x 4 mm x 3mm (length x width x height) racetrack-format poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-cast was used (Figure 1B). The channel was dimensioned in such a manner that sufficient medium could be included for uncomplicated cell culturing of epithelial Caco-2 monolayers. Thus, the usually necessary transfer of a cell-covered substrate to the flow chamber or alignment of an elastomeric cast on the cultured cells can be avoided. However, the pumping technique is not limited to rectangular casts of this size, but can be easily adapted to drive flow in smaller structures with constrictions or bifurcations.^[17] Channels including the latter geometries could be exceptionally insightful tools for a realistic simulation of the complex vessel-flow in the circulatory system.^[9] At this, it is additionally helpful, that not only continuous flow modes can be accurately mimicked on the SAW-chip, but that also precisely defined pulsed pumping is possible. While being hardly achievable with mechanical pumps, this streaming mode is controllably induced by amplitude modulation of the high frequency signal (see Video S2 of the Supporting Information). Thereby, the effects of pulsating flow combined with defined shear rates could be collectively investigated regarding their impact on distribution and adhesion processes in the branched circulatory system.^[9]

Besides its compliance with microfluidic channels, which allows for reducing the necessary amount of reagents to a minimum, the chip-based setup additionally bears the advantage of omitting tubing and connectors which are otherwise necessary to pipeline liquid within the system. Consequently, the dead volume associated with mechanical pumps is avoidable and the entire device can be downsized notably (Figure 1B). This feature is essential, as it permits parallelization of several SAW-chips in one platform thus increasing the amount of samples which can be processed simultaneously. Even a setup with multiple SAW-pumps and channels in a microplate format is realizable, entailing the ability to use microplate readers for analysis. Such an extension to more sensitive analytical methods could be a powerful tool to gain information on adhesion phenomena

involving nanoparticles or proteins, since analyses based on microscopic imaging hit on their limits in this size regime.

2.2 Cell-binding of surface-modified microparticles under stationary conditions

To establish reference values for the experiments involving fluid flow, the extent of binding of BSA- and WGA-MP to Caco-2 monolayers was primarily determined in a stationary setup (flow velocity_{max} = 0 $\mu\text{m s}^{-1}$). For the used microparticles with a mean size of $2.86 \pm 0.95 \mu\text{m}$ and a density of $\sim 1.28 \text{ g cm}^{-3}$ a sedimentation controlled particle deposition is expected.^[18] In the equilibrium state between frictional force and gravitation, settling of the colloids occurs with a constant z-velocity of $1.4 \mu\text{m s}^{-1}$. Consequently, 83% of the homogenously distributed particles are assumed to deposit on the surface within 30 min leading to a maximum coverage of 3500 mm^{-2} . In practice, however, only $94 \pm 64 \text{ mm}^{-2}$ BSA-MP were detected after stationary loading (30 min), washing and stationary chase-incubation (30 min) (Figure 2, stars). The rather low number of cell-associated particles, which corresponds to 3% of the

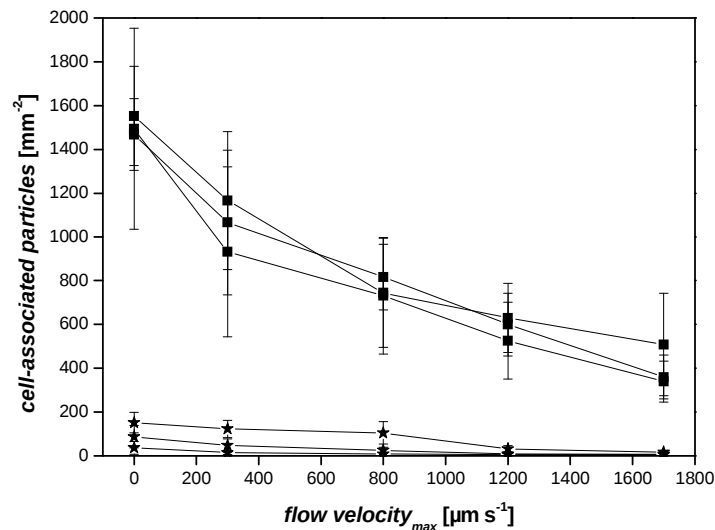


Figure 2. Mean number of WGA- (squares) and BSA-MP (stars) associated with Caco-2 monolayers after loading for 30 min at stationary conditions, washing and chase-incubation under stationary or flow conditions. Each set of data points was obtained from independent experimental series.

theoretical load, can be explained by the reportedly low affinity of albumin-coated PLGA-particles to Caco-2 cells.^[6, 15] Due to the lack of interactive strength the washing steps resulted in the detachment of all except a few non-specifically bound particles. In contrast, conjugation with f-WGA led to a clearly enhanced adhesion of colloids to the monolayer. This is in line with previous studies which have identified WGA as an agent for enhancing adhesion to Caco-2 cells.^[19, 20] Following incubation under stationary conditions a mean number of $1500 \pm 307 \text{ mm}^{-2}$ cell-associated particles, which corresponds to 43% of the maximum load, were detected. This 16-fold increased interaction as compared to BSA-MP is explicitly illustrated in Figure 3 and can be attributed to specific binding of the lectin to

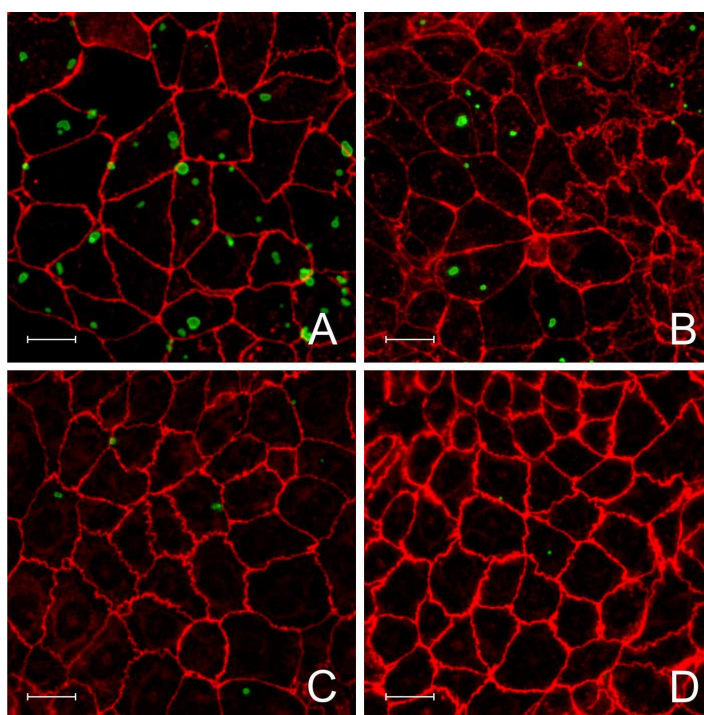


Figure 3. Cell-associated WGA-MP (A) and BSA-MP (C) respectively after loading for 30 min, washing and chase-incubation under stationary conditions (flow velocity_{max} = 0 $\mu\text{m s}^{-1}$). Chase-incubation performed under flow conditions (flow velocity_{max} = 1700 $\mu\text{m s}^{-1}$; B and D respectively). Microparticles (green) and tight junction associated protein ZO-1 (red). Bar represents 20 μm .

membrane-associated N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-neuraminic-acid residues.^[15, 21] WGA-MP which had not bound to the cell membrane were removed in course of the washing steps.

2.3 Impact of flow on cell-bound particles

To investigate the effect of different shear rates on cell-associated BSA- and WGA-MP, stationary particle-loaded Caco-2 monolayers were chase-incubated under flow conditions. At this, acoustic streaming induces laminar fluid flow in the channel and thereby generates hydrodynamic forces acting on the attached microparticles. If the adhesive bonds break and do not re-establish elsewhere, the fluid flow transports the colloids to the coupling region of the SAW, where the considerable lift forces redisperse them in the channel cross-section. Consequently, most of these particles are not available for reattachment to the cells. Using this setup, a shear rate dependent reduction of the number of cell-bound particles was monitored for both types of surface-modified colloids (Figure 2). While low shear rates (flow velocity_{max} = 300 $\mu\text{m s}^{-1}$ and 800 $\mu\text{m s}^{-1}$) led to the detachment of ~30% and 50% respectively of the initially cell-associated BSA-MP, incubation at higher shear rates (flow velocity_{max} = 1200 $\mu\text{m s}^{-1}$ and 1700 $\mu\text{m s}^{-1}$) almost completely removed the albumin-conjugated colloids from the cell-surface (Figure 3D). Obviously, the few BSA-MP, which were associated with the Caco-2 monolayer after stationary loading and washing, are characterized by low adhesivity which is not sufficient to anchor the particles in the presence of shear forces. In contrast, conjugation of microparticles with carbohydrate-binding protein not only led to higher cell-binding under stationary conditions but also enhanced retention on the Caco-2 monolayer in the presence of flow (Figure 2, squares). This is illustrated by a mean number of $1057 \pm 351 \text{ mm}^{-2}$ and $400 \pm 168 \text{ mm}^{-2}$ monolayer-associated colloids at the lowest and highest flow velocity studied. Consequently, as compared with BSA-MP, WGA-MP were characterized by at least 17-

fold increased retention over the whole range of flow velocities investigated. Interestingly, in case of the highest shear rates, the effect of the lectin-corona was even more pronounced as exemplified by 39-fold and 44-fold improved adhesion over albumin-conjugated colloids (Figure 3C).

Regarding reproducibility of the binding assays on the SAW-chip, it should be highlighted that the three data series for each particle type plotted in Figure 2 were obtained from separate experiments. The low deviation between the curves underlines the SAW-pump's ability to controllably and reproducibly generate flow in the 3D-microchannels, which is a crucial prerequisite that determines the practical usability of the system. The standard deviation of each data point is comparable with those in similar studies and very likely a result of the image-based quantification combined with the cellular substrate inherent characteristics.^[7] To minimize this, homogenous receptor-coated surfaces could be used, albeit at the cost of setting aside the complexly constituted cell membrane. Hence, when probing the interaction of targeted drug carriers with biological barriers, a substitution of the cell monolayer by an artificial substrate is not expedient since it reduces the relevance for comparisons with the *in vivo* conditions.^[3, 7, 8] When studying isolated adhesion phenomena, however, the incorporation of precisely surface-engineered substrates is certainly realisable as well as preferable in terms of analytical accuracy.^[5, 12, 22]

2.4 Cell-binding of surface-modified microparticles under flow conditions

2.4.1 Impact of flow on particle deposition in the channel

To estimate the effect of flow on the deposition rate of particles in the 3D-microchannels, the stationary condition was compared with streaming. The experimental microfluidic setup is characterized by Reynolds numbers of $Re = 1$ and $Re = 6$ for the lowest and highest velocity respectively which indicates laminar flow. As determined by computational fluid dynamics simulations the flow profile in the channel is parabolic

(Figure 1C, D). Considering these conditions and that the images used for quantification of the adherent particles were taken in a small central region of the channel, the lateral y-component of the velocity was assumed to be widely independent from the vertical z-component. Therefore, a particle's trajectory in the flowing fluid contains components in the direction of flow (x) as well as in the vertical direction (z) with the former one depending on the latter. At the start of the experiment, the 3D-microchannels are filled with buffer containing 7.5×10^5 homogenously distributed microparticles which sediment with a constant z-velocity. Upon engaging the flow, these particles are travelling for one channel length until again reaching the coupling zone of the SAW-pump where they are homogenously redistributed over the cross-section of the channel. On each of these rotations, particles below a critical height Δz_{crit} settle out on the cell monolayer. For a flow velocity v_{max} of $1700 \mu\text{m s}^{-1}$ the critical height Δz_{crit} is determined to be $\sim 224 \mu\text{m}$. Taking into account that the particle density in the channel decreases with duration of the experiment, $\sim 56\%$ of the microparticles are expected to have deposited on the cell monolayer after 30 min. This corresponds to a theoretical surface coverage of 2400 mm^{-2} . In the case of lower flow velocities the increased critical height Δz_{crit} interestingly does not lead to a higher deposition rate since its effect is widely levelled out by the proportionally lowered particle flux density. Consequently, almost equal particle deposition rates on the cell monolayer were to be expected under all investigated flow conditions.

2.4.2 Binding of BSA- and WGA-MP to a Caco-2 monolayer under flow conditions

In order to investigate the binding of BSA- and WGA-MP from a streaming medium to Caco-2 monolayers, the particle suspension was transferred to the 3D-microchannels and fluid flow was instantly engaged. As illustrated in Figure 4 (open symbols), incubation under flow

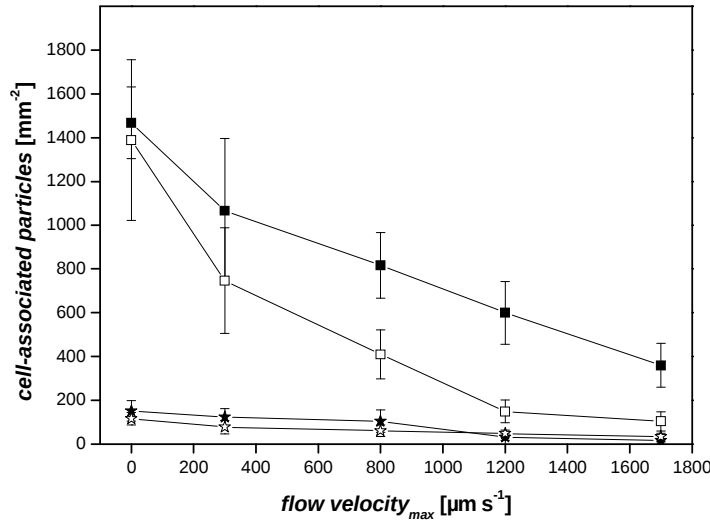


Figure 4. Mean number of WGA-MP (squares) and BSA-MP (stars) associated with Caco-2 monolayers upon incubation under stationary and flow conditions. Monolayers pre-loaded with microparticles for 30 min under stationary conditions (filled symbols). Direct incubation of microparticles with monolayers under stationary and flow conditions (open symbols).

conditions led to a clearly decreased cell binding of the ligand-conjugated colloids. Partially, this effect is system inherent and can be attributed to the previously discussed reduction of particle deposition due to the parabolic flow in the channel. Taking this into account and considering the binding potential of 3% and 43% as determined in the absence of hydrodynamic forces, a maximal surface coverage of $\sim 70 \text{ mm}^{-2}$ and $\sim 1000 \text{ mm}^{-2}$ is expected for BSA- and WGA-MP respectively under flow conditions. This estimate seems quite realistic as illustrated by $77 \pm 31 \text{ mm}^{-2}$ and $747 \pm 241 \text{ mm}^{-2}$ respectively bound particles in case of the lowest shear force. However, aside from the generally lowered base deposition, the number of cell-bound colloids was additionally diminished by the antagonizing effect of flow on particle-surface bonds.^[4, 5] For BSA-MP this increased hydrodynamic drag resulted in a nearly complete inhibition of the association with the Caco-2 monolayer. This is explicated by a marginal surface coverage of $34 \pm 16 \text{ mm}^{-2}$ cell-associated particles at the highest shear rate. Apparently, albumin-modified particles which are deposited on the monolayer under flow conditions do not notably interact with the cell

membrane. Similar conclusions have been described in a recent study where a gas lift driven ussing chamber setup was used to simulate the effect of gastrointestinal flow on particle binding.^[6] In contrast to albumin-conjugated colloids, WGA-MP exhibited higher binding at all investigated flow-conditions. The advantage of lectin-conjugation was clearest at low shear rates. However, even at the highest flow velocities studied at least threefold more particles associated with the cell monolayer as compared with BSA-MP. These observations lead to the conclusion that colloids lacking appropriate surface chemistry do not notably attach to Caco-2 cells at relatively moderate shear rates ranging from 0.2 s^{-1} to 1 s^{-1} . When considering this combined with the very low cytoadhesion under stationary conditions, the use of BSA-MP as drug carriers is limited. The use of plain colloids for most pharmaceutically relevant applications has to be relativized even more due to the reportedly marginal cytoadhesion of unconjugated PLGA particles.^[15] To efficiently compliment the advantageous biocompatibility and biodegradability of particles made from PLGA and similar polymers, surface modification with targeting ligands is essential. In this regard, however based on stationary studies, wheat germ agglutinin has been proposed as a promising candidate to serve this purpose for peroral applications. Due to its carbohydrate binding properties, which mediate adhesion to enterocytes as well as mucus, a prolonged gastrointestinal residence time of sustained release drug carriers might be achieved.^[6, 15, 23] Using the SAW-driven microfluidic device, it was possible to show that the interaction between WGA and the Caco-2 cell's glycocalyx is indeed sufficient to mediate the binding of $3\mu\text{m}$ -sized particles under physiological flow conditions. This observation further underlines the potential of wheat germ agglutinin for peroral delivery, where low shear rates act on the carrier. However, in the presence of higher flow velocities, the studied WGA-MP exhibit a propensity to detach from the cell layer. This could be counteracted by using smaller particles, possibly in the nanometer size range, since the effective hydrodynamic drag forces decrease with particle diameter.^[1] Moreover,

conjugation of particles with alternative targeting moieties could lead to enhanced cytoadhesion under the shear rates encountered in the circulatory system. In this regard, the underlying mechanisms of shear-activated proteinic ligands like the FimH subunit of Type-1 fimbriae of *E. coli* or von Willebrand factor might lead the way for the engineering of site-specific drug carriers that efficiently adhere under flow conditions.^[12, 24]

3. Conclusions

Stationary binding assays have become the current standard in preclinical biopharmaceutical testing due to the rather simple handling and lack of alternative *in vitro* models. To approach this shortcoming, an acoustically-driven thumbnail-sized microfluidic chip was developed that can controllably and reproducibly generate flow in 3D-microchannels which are compatible with cell culture. This SAW-chip was used to investigate the binding properties of albumin- and wheat germ agglutinin-conjugated microparticles to an epithelial cell layer under flow conditions. As illustrated in the present work, the results obtained from binding assays under stationary conditions notably differ from those obtained in systems simulating the dynamic *in vivo* environment. It was found that non-targeted microparticles possess a very low propensity to bind and are detached in the presence of flow, while conjugation with WGA led to a distinctly improved adhesion of particles to the cell-layer at shear rates ranging from 0.2 s^{-1} to 1 s^{-1} . In conclusion, these results clearly underline the importance of surface functionalization for the design of nano- and microparticulate drug delivery vehicles. Elaborate models of the *in vivo* conditions are necessary in order to realistically predict and optimize the performance of such systems prior to animal studies. In this context, the developed microfluidic SAW-chip is expected to provide a highly versatile platform for an investigation of flow-associated effects on particle-cell adhesion processes. Fundamental information distilled from studies using this

technology will deeply benefit the engineering of artificial drug carrier systems which perform with high efficiency in the dynamically complex physiological environment.

4. Experimental Section

Materials: Sylgard[®] 184 Silicone Elastomer Kit was purchased from Baltres (Baden, Austria). Resomer[®] RG502H (PLGA, lactide/glycolide ratio 50:50, inherent viscosity 0.22 dL g⁻¹, acid number 9 mg KOH g⁻¹) was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Fluorescein-labeled wheat germ agglutinin (molar ratio fluorescein/protein (F/P) = 2.9) from *Triticum vulgare* was bought from Vector laboratories (Burlingame, USA). FITC-labeled bovine serum albumin (F/P = 12), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), and Pluronic[®] F-68 were purchased from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). All other chemicals used were of analytical purity.

Preparation of functionalized microparticles: PLGA microparticles with a mean diameter of $2.86 \pm 0.95 \mu\text{m}$ were prepared by spray drying of a 6.5% (w/v) solution of PLGA in dichloromethane with a Buechi Mini Spray Dryer B-191 (Buechi, Flawil, Switzerland) as previously described.^[19] For surface modification, 100 mg of the PLGA microparticles were suspended in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0 (10 mL) and activated with solutions of EDAC (360 mg in 1.5 mL) and NHS (15 mg in 1 mL) in the same buffer for 2 h under end-over-end rotation at room temperature. In order to remove excess coupling reagent, the suspension was diluted threefold with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 and centrifuged (10 min, 2500 rpm, 4°C). The resulting pellet was resuspended in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (10 mL). Upon addition of F-WGA (1.00 mg) and F-BSA (1.83 mg) respectively, end-over-end incubation was performed overnight at room temperature. Remaining active ester intermediates were saturated by addition of glycine (450 mg) in 20

mM HEPES/NaOH pH 7.4 (6 mL) and further incubation for 30 min. Subsequently, the microparticles were washed three times by centrifugation (10 min, 3200 rpm, 4°C) and resuspension in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (30 mL). After the last centrifugation step, the particles were suspended in a solution of 0.1% Pluronic F-68 in isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (10 mL).

Fabrication of sterile 3D-microchannels: Base (10 g) and curing agent (1 g) of the silicone elastomer kit were mixed in a test tube, vigorously stirred and evacuated for 30 min to remove gas bubbles. After pouring the liquid prepolymer into pre-structured aluminium molds and hardening over night at 70°C, the PDMS replicas were peeled from the master and placed on 24 x 24 mm (length x width) glass cover slips. Following assembly, the 3D-microchannels dimensioned 44 x 4 x 3 mm (length x width x height) were transferred to glass Petri dishes and autoclaved for 50 min at 121°C (1 bar).

Cell Culture in 3D-microchannels: The Caco-2 cell line was purchased from the German collection of microorganisms and cell culture (DSMZ, Braunschweig, Germany). Tissue culture reagents were obtained from Sigma (St. Louis, USA) and Gibco Life Technologies Ltd. (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell-culture medium containing 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine and 150 µg mL⁻¹ gentamycine in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and subcultured with Tryple Select from Gibco (Lofer, Austria). For the microfluidic experiments, each sterile 3D-microchannel was filled with 500 µL of Caco-2 single cell suspension (1.36 x 10⁵ cells mL⁻¹) and cultivated under standard cell culture conditions until a confluent cell monolayer had formed.

Preparation of SAW-chip: LiNbO₃ slides (128°-cut x-propagation) dimensioned 15 x 15 x 0.4 mm (length x width x height) were used as piezoelectric substrates. Interdigital metal structures (IDTs) were structured on these slides by standard lithographic processes in order to predominately generate (Rayleigh-mode) SAWs.^[25] The used IDTs had 42

fingerpairs, an aperture of 600 μm and a periodicity of 26 μm , resulting in a resonance frequency of about 153 MHz. To enhance the resistance against mechanical cleaning procedures, the fingers were additionally coated with a radio frequency (RF)-sputtered SiO_2 protective coating.

Microparticle-cell interaction studies at stationary and flow conditions: For the interaction studies the BSA-MP and WGA-MP were suspended in isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 at a concentration of 7.5×10^5 particles per 500 μL . Shortly before the experiment, the cell culture medium was removed from the 3D-microchannels and the monolayers were washed once with isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (500 μL). Subsequently, the microparticle suspension was added and the channels were covered with a glass cover slip. In order to grant efficient transmission of the SAWs, 50 μL of water were pipetted on the piezoelectric chip as a coupling fluid before the 3D-microchannel was placed on top of it. This setup was mounted on a fluorescence microscope and connected to the high frequency generator, which had been configured to supply preset energy inputs corresponding to flow velocities of 0 $\mu\text{m s}^{-1}$, 300 $\mu\text{m s}^{-1}$, 800 $\mu\text{m s}^{-1}$, 1200 $\mu\text{m s}^{-1}$ and 1700 $\mu\text{m s}^{-1}$ respectively. Following incubation at either stationary or flow conditions for 30 min, the monolayers were washed three times with isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 (500 μL) and embedded as described below. For an alternative set of experiments, monolayers loaded for 30 min under stationary conditions were washed and subsequently subjected to stationary or flow chase-incubation. After two additional washing steps with isotonic 20 mM HEPES/NaOH (500 μL) the PDMS-structure was peeled off these channels as well. The glass cover slips with the adherent monolayers were embedded in a drop of FluorSaveTM (Calbiochem[®], USA and Canada) and were stored at 4°C for 12 hours prior to further analyses.

Fluorescence microscopy and software-based analysis: The embedded Caco-2 monolayers were analysed on a Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon Corp., Japan)

equipped with an EXFO X-Cite 120 fluorescence illumination system. A random series of non-overlapping fluorescence microscopic images ($n = 6$) was acquired over the channel area, whereby care was taken to analyze monolayer parts located in the centre of the 3D-microchannels. To grant comparability, the settings of the fluorescence lamp and exposure time were left constant during the data acquisition process. Finally, the number of cell-associated microparticles in every image was determined with the threshold-dependant automated particle analysis of ImageJ (NIH, USA). The number of cell-associated particles represents the mean value which was calculated from the images acquired in independent channels ($n = 2$).

Antibody staining: After incubation at stationary and flow conditions respectively, the monolayers were fixed with a 2% solution of paraformaldehyde for 15 min at room temperature and were washed with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS; 500 μ L). Upon treatment with a 50 mM solution of NH_4Cl for 15 min and with a 0.1% solution of Triton X-100 for 10 min, the cells were washed again with PBS (500 μ L). The tight junction associated protein ZO-1 was stained for 1 h at 37°C with a primary antibody (BD Biosciences, San Jose, USA) diluted 1:100 in a 1% solution of BSA in PBS. Upon washing thrice with a 1% solution of BSA in PBS, the monolayers were incubated with a 1:100 dilution of a secondary Anti-Mouse Immunoglobulin-RPE antibody (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 30 min at 37°C. Finally, the cell layer was washed three times with a 1% solution of BSA in PBS and mounted in a drop of FluorSaveTM.

References

- [1] V. R. Shinde Patil, C. J. Campbell, Y. H. Yun, S. M. Slack, D. J. Goetz, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1733.
- [2] J. B. Dickerson, J. E. Blackwell, J. J. Ou, V. R. Shinde Patil, D. J. Goetz, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 500.
- [3] H. S. Sakhalkar, M. K. Dalal, A. K. Salem, R. Ansari, J. Fu, M. F. Kiani, D. T. Kurjiaka, J. Hanes, K. M. Shakesheff, D. J. Goetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 15895.
- [4] C. Cozens-Roberts, J. A. Quinn, D. A. Lauffenberger, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 107.
- [5] A. O. Eniola, D. A. Hammer, *J. Controlled Release* **2003**, *87*, 15.
- [6] A. Weissenboeck, E. Bogner, M. Wirth, F. Gabor, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1917.
- [7] O. C. Farokhzad, A. Khademhosseini, S. Jon, A. Hermmann, J. Cheng, C. Chin, A. Kiselyuk, B. Teply, G. Eng, R. Langer, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5453.
- [8] E. Mennesson, P. Erbacher, M. Kuzak, C. Kieda, P. Midoux, C. Pichon, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 389.
- [9] A. T. Florence, in *Nanoparticles as drug carriers* (Ed.: V. P. Torchilin), Imperial College Press, London, **2006**, 9.
- [10] P. Decuzzi, M. Ferrari, *Biomaterials* **2008**, *29*, 377.
- [11] J. B. Dressman, G. L. Amidon, C. Reppas, V. P. Shah, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 11.
- [12] S. W. Schneider, S. Nuschele, A. Wixforth, C. Gorzelanny, A. Alexander-Katz, R. R. Netz, M. F. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7899.
- [13] T. M. Squires, S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977.

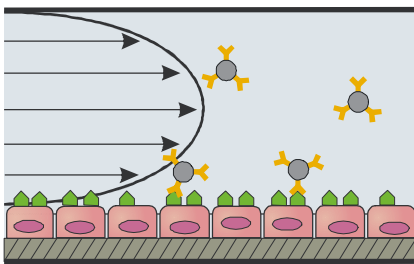
- [14] N. Lion, T. C. Rohner, L. Dayon, I. L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z. Y. Wu, C. Roussel, J. Josserand, H. Jensen, J. S. Rossier, M. Przybylski, H. H. Girault, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3533.
- [15] C. Fillafer, D. S. Friedl, M. Wirth, F. Gabor, *Small* **2008**, 4, 627
- [16] Y. Mo, L. Y. Lim, *J. Controlled Release* **2005**, 107, 30.
- [17] M. F. Schneider, Z. Guttenberg, S. W. Schneider, K. Sritharan, V. M. Myles, U. Pamukci, A. Wixforth, *ChemPhysChem* **2008**, 9, 641.
- [18] C. Vauthier, C. Schmidt, P. Couvreur, *J. Nanoparticle Res.* **1999**, 1, 411.
- [19] B. Ertl, F. Heigl, M. Wirth, F. Gabor, *J. Drug Targeting* **2000**, 8, 173
- [20] A. P. Gunning, S. Chambers, C. Pin, A. L. Man, V. J. Morris, C. Nicoletti, *FASEB J.* **2008**, 22, 2331.
- [21] M. Monsigny, A. C. Roche, C. Sene, R. Magetdana, F. Delmotte, *Eur. J. Biochemistry* **1980**, 104, 147.
- [22] B. Prabhakarparandian, K. Pant, R. C. Scott, C. B. Patillo, D. Irimia, M. F. Kiani, S. Sundaram, *Biomed. Microdevices* **2008**, 10, 585.
- [23] F. Gabor, E. Bogner, A. Weissenboeck, M. Wirth, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, 56, 459.
- [24] W. E. Thomas, E. Trintchina, M. Forero, V. Vogel, E. V. Sokurenko, *Cell* **2002**, 109, 913.
- [25] T. Frommelt, M. Kostur, M. Wenzel-Schäfer, P. Talkner, P. Hänggi, A. Wixforth, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, 100.

The Table of contents entry

Acoustically-driven microfluidics

C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F. Gabor*, M.F. Schneider

An Acoustically-Driven Biochip – Impact of Flow on the Cell-Association of Targeted Drug Carriers



Go with the flow? The accumulation of targeted drug carriers in the diseased tissue is substantially affected by the locally acting hydrodynamic drag forces. A thumbnail-sized microfluidic chip incorporating a

surface acoustic wave pump can be used to study the adhesion of particles to cells under physiological flow conditions.

Page Headings

Left page: Fillafer et al.

Right page: Acoustically-driven biochip

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Bourgeois, R. Harvey, E. Fattal, *Am J. Drug Deliv.*, **2005**, 3, 171-204
- [2] F. Gabor, M. Stangl, M. Wirth, *J. of controlled release*, **1998**, 55, 131-142
- [3] S. Kalasin, M. M. Santore, *Langmuir*, **2008**, 24, 4435
- [4] J. B. Dickerson, J. E. Blackwell, J. J. Ou, V. R. Shinde Patil, D. J. Goetz, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73, 500
- [5] C. Cazens-Roberts, J.A. Quinn, D.A. Lauffenburger, *Biophys. J.*, **1990**, 58, 107-125
- [6] V.R. Shinde Patil, C.J. Campbell, Y.H. Yun, S.M. Slack, D.J. Goetz, *Biophys.J.*, **2001**, 80, 1733-1743
- [7] A. Wixforth, *Supperlattices and Microstructures*, **2003**, 33, 389 - 396
- [8] M.F. Schneider, S.W. Schneider, *Biospektrum*, **2008**, 14, 134-139
- [9] M.F. Schneider, Z. Guttenberg, S.W. Schneider, K.Sritharan, V.M. Myles, U. Pamukci, A. Wixforth, *ChemPhysChem*, **2008**, 9, 641-645
- [10] T. Franke, A. Wixforth, *Phys. Unserer Zeit*, **2007**, 38, 88-94
- [11] J.C. McDonald, G.M. Whitesides, *Accounts of chemical research*, **2002**, 35
- [12] A. Weissenboeck, E. Bogner, M. Wirth, F. Gabor, *Pharmaceutical Research*, **2004**, 21
- [13] C.D. Pellegrina, C. Rizzi, S. Mosconi, G. Zoccatelli, A. Peruffo, R. Chignola, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2005**, 207, 170-178
- [14] C. Fillafer, D. S. Friedl, M. Wirth, F. Gabor, *Small* **2008**, 4, 627
- [15] M. Monsigny, A. C. Roche, C. Sene, R. Magetdana, F. Delmotte, *Eur. J. Biochemistry* **1980**, 104, 147.

- [16] H. S. Sakhalkar, M. K. Dalal, A. K. Salem, R. Ansari, J. Fu, M. F. Kiani, D. T. Kurjiaka, J. Hanes, K. M. Shakesheff, D. J. Goetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 15895.
- [17] O. C. Farokhzad, A. Khademhosseini, S. Jon, A. Hermmann, J. Cheng, C. Chin, A. Kiselyuk, B. Teply, G. Eng, R. Langer, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5453
- [18] E. Mennesson, P. Erbacher, M. Kuzak, C. Kieda, P. Midoux, C. Pichon, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 389.
- [19] A. O. Eniola, D. A. Hammer, *J. Controlled Release* **2003**, *87*, 15.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Silke Dissauer

Geboren am 19. Juni 1984 in Mürzzuschlag

Österreichische Staatsbürgerin

Röm. Kath.

Ledig

Eltern: Rudolf und Hannelore Dissauer

Geschwister: Mag. phil. Marlies Dissauer

Ausbildung

Seit 09.2008	Verfassen der Diplomarbeit: „ <i>An Acoustically-Driven Biochip – Impact of Flow on the Cell-Association of Targeted Drug Carriers</i> “
03. – 08.2008	Praktische Arbeit zur Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Universität Wien
05.06.2008	Abschluss aller Lehrveranstaltungen des dritten Studienabschnittes
22.01.2008	Abschluss der zweiten Diplomprüfung
26.02.2004	Abschluss der ersten Diplomprüfung
01.10.2002	Inskription an der Universität Wien

12.06.2002	Matura mit Gutem Erfolg
1994 - 2002	Bundesgymnasium Mürzzuschlag
1990 - 1994	Volksschule Veitsch

Studienbegleitende Tätigkeiten

SS 2008, WS 08/09	Tutor in den Übungen „Industrielle Arzneimittelherstellung“
08.2007	Ferialpraktikum in der Dispensierstelle der Firma Dr. Peithner KG, 1232 Wien
07.2006	Ferialpraktikum in der „Marien Apotheke“, 1060 Wien
07.2005	Ferialarbeit bei der Firma Herba Chemosan, 8011Graz
10 – 12.2004	geringfügig beschäftigt im Baxter - Plasmazentrum, 1070 Wien

weitere Ferialarbeiten

2004 und 2007	Betreuerin der Jugenerholungsakton Mürzzuschlag
2003	Bezirkspensionistenheim Mürzzuschlag
2001 und 2002	Bezirkshauptmannschaft Mürzzuschlag