

DISS. ETH NO. 28952

***TRANSLATIONAL ENGINEERING FOR ADDRESSING
LIMITATIONS IN LEUKEMIA DRUG SCREENING***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

FURKAN GÖKÇE

M.S. in Electrical and Electronics Engineering, Middle East Technical University, Ankara, Türkiye.

born on 07.09.1992

citizen of

Türkiye

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Hierlemann

Prof. Dr. Philippe Renaud

Prof. Dr. Timm Schroeder

Dr. Mario M. Modena

2023

Abstract

This thesis is aimed at addressing the limitations of leukemia drug screening platforms and improve their predictive power by employing state-of-the-art translational-engineering approaches. Drug screening has provided important information about tumor-growth inhibition and tumor-cell killing and has driven the increase in cancer survival rates over the last decades, especially for acute lymphoblastic leukemia patients. More recently, the genomic profiling of primary leukemia cells has helped to understand the genetic lesions that occur in leukemia. Despite such progress, the treatment of resistant and relapsed leukemia remains challenging. Recently developed drug-screening platforms have been coupled with molecular disease profiling to provide functional information to select treatment options for high-risk leukemia patients. The clinical benefits of such screening platforms have already been reported, indicating their translational power. However, existing platforms cannot be used to predict the responses to prodrugs, a class of therapeutics that often require metabolic activation to become effective. In addition, existing platforms mostly rely on endpoint measures or few time points to assess drug efficacy and cannot probe real-time drug effects, which would provide access to information on pharmacodynamics of drugs.

Microfluidics and advanced 3D cultures offer a powerful toolbox to enable the testing of prodrugs or the real-time screening of drug effects. 3D cell cultures replicate tissue-specific cell-cell or cell-scaffold interactions, e.g., via cell signaling, and promote tissue-specific functions. Microphysiological systems rely on microfluidics to combine different 3D tissue models and to recapitulate organism-level tissue-tissue interactions. In addition, integrated microsensors enable label-free and real-time assessment of the status of the cell cultures. To address the limitations of functional drug screening platforms, three dedicated platforms have been conceived:

- i. A microphysiological drug screening platform was designed to co-culture primary patient-derived leukemia cells, mesenchymal stromal cells, and human liver microtissues within the same microfluidic platform. The developed platform recapitulated the metabolic activation of ifosfamide in vitro. Sample-specific sensitivities to lethal and short-lived ifosfamide metabolites were identified in primary leukemia, which could not be assessed in existing drug screening assays.
- ii. Feeder-free cultures of primary patient-derived leukemia cells were realized by supplementing the culture medium with selected cytokines. A high-throughput screening methodology was used to optimize feeder-free media for primary cells derived from three leukemia patients. Observed viabilities in the feeder-free cultures after 3 days were similar to those in state-of-the-art, stroma-based co-cultures.
- iii. A platform with integrated sensors for impedance cytometry enabled the label-free detection of drug efficacy on suspension cultures of leukemia cells. Cell-line-based experiments demonstrated a basis for a scalable in vitro assay to screen time-dependent drug effects on feeder-free cultures of primary cells.

The presented platforms have the potential to be utilized for functional screening, with the goal of further increasing the predictive power of existing drug-screening assays to improve the clinical outcome of patients.

Zusammenfassung

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Limitationen von Screeningplattformen für Wirkstoffe zur Leukämiebehandlung zu überwinden und deren Vorhersagekraft durch den Einsatz modernster «translational-engineering» Ansätze zu verbessern. Das Screening von Wirkstoffen hat in den letzten Jahrzehnten wichtige Erkenntnisse über die Hemmung von Tumorwachstum und die Abtötung von Tumorzellen geliefert und somit die Überlebenschancen von Krebspatienten verbessert, insbesondere für Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie. In den vergangenen Jahren hat auch das Erstellen von Genomprofilen von primären Leukämiezellen dazu beigetragen, die bei Leukämie auftretenden genetischen Veränderungen zu verstehen. Trotz dieser Fortschritte bleibt die Behandlung von resistenten und wiederkehrenden Leukämien eine Herausforderung. Kürzlich entwickelte Plattformen für das Wirkstoff-Screening wurden mit der Erstellung molekularer Krankheitsprofile gekoppelt, um funktionelle Informationen für die Auswahl von Behandlungsoptionen für Hochrisiko-Leukämiepatienten zu erhalten. Über die klinische Bedeutung solcher Screening-Plattformen wurde bereits berichtet, was auf ihre translationalen Möglichkeiten hinweist. Die bestehenden Plattformen sind jedoch nicht in der Lage, das Ansprechen von Patienten auf sogenannte Prodrugs zu prognostizieren, eine Klasse von Therapeutika, die eine Stoffwechselaktivierung benötigen, um wirksam zu werden. Zusätzlich werden die bestehenden Plattformen meist auf Endpunktmessungen oder während kurzer Messzeiten angewendet, um die Wirkung von Medikamenten zu testen. Sie sind meist nicht für Echtzeit-Wirkungen von Medikamenten geeignet, die jedoch Informationen über die Pharmakodynamik der Medikamente liefern würden.

Mikrofluidik und fortschrittliche 3D Zellkulturmethoden sind effektive Instrumente, um Tests mit Prodrugs oder Echtzeit-Screening von Medikamentenwirkungen möglich zu machen. 3D-Zellkulturen ermöglichen die Nachbildung gewebespezifischer Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen oder zwischen Zellen und ihrer extrazellulären Umgebung, so dass gewebespezifische Funktionen nachgebildet werden können. Mikrophysiologische Systeme basieren auf mikrofluidischen Strukturen, um verschiedene 3D-Gewebemodelle zu kombinieren und Interaktionen zwischen unterschiedlichen Geweben auf nachzubilden. Zusätzlich ermöglichen integrierte Mikrosensoren eine Echtzeitanalyse der Zellkulturen, ohne dass diese gezielt markiert werden müssen.

Um die derzeitigen Beschränkungen funktioneller Wirkstoffscreening-Plattformen zu überwinden, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei spezielle Plattformen entwickelt:

- i. Ein mikrophysiologisches System für das Wirkstoffscreening wurde entwickelt, um primäre, von Patienten stammende Leukämiezellen, mesenchymale Stromazellen und menschliche Lebermikrogewebe in derselben Mikrofluidik-Plattform zu kultivieren. Die entwickelte Plattform ermöglichte es, die metabolische Aktivierung von Ifosfamid in-vitro nachzubilden. Es wurden probenspezifische Sensitivitäten gegenüber kurzlebigen Ifosfamid-Metaboliten in primären Leukämiezellen identifiziert, die in bestehenden Assays fürs Wirkstoff-Screening nicht gemessen werden konnten.

- ii. Die Kultivierung von primären, von Patienten stammenden Leukämiezellen ohne unterstützende Feeder-Zellen wurde durch Ergänzung des Kulturmediums mit ausgewählten Zytokinen realisiert. Mit Hilfe einer Hochdurchsatz-Screening-Methode wurden Feeder-Zell-freie Medien für primäre Zellen von drei Leukämiepatienten optimiert. Die beobachtete Lebensfähigkeit der Zellen in Feeder-Zell-freien Kulturen nach 3 Tagen waren vergleichbar mit denen in modernen Feeder-Zell-basierten Co-Kulturen.
- iii. Eine Plattform mit integrierten Sensoren für die Impedanzzytometrie ermöglichte den Nachweis der Wirksamkeit von Medikamenten in Suspensionskulturen von Leukämiezellen ohne zusätzliche Markierung der Zellen. Zelllinien-basierte Experimente bildeten die Grundlage für ein skalierbares in vitro Assay zur Messung zeitabhängiger Medikamenteneffekte in Feeder-Zell-freien Kulturen von Primärzellen.

Die präsentierten Plattformen können für funktionelles Screening eingesetzt werden mit dem Ziel, die Vorhersagekraft bestehender Wirkstoff-Screening-Tests weiter zu erhöhen, um bessere klinische Ergebnisse in der Behandlung von Patienten zu erzielen.