

SPR basierte Parameterbestimmung für immunologische *in vitro* Testung von Substanzen mit künstlichen humanen Lymphknoten

FRANK SONNTAG¹, STEFAN SCHMIEDER¹, ANNIKA LUBITZ², CHRISTOPH GIESE², UWE MARX², NORBERT DANZ³, UDO KLOTZBACH¹

¹Fraunhofer Institut für Werkstoff- und Strahltechnik (IWS), 01277 Dresden, Winterbergstr. 28

²ProBioGen AG, 13086 Berlin, Goethestrasse 54

³Fraunhofer Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik (IOF), 07745 Jena, Albert-Einstein-Str. 7

Zusammenfassung

Biopharmazeutische Wirkstoffe wie beispielsweise Antikörper, Glykoproteine, Zytokine oder Impfstoffe, können neben den erwünschten Wirkungen auch unerwünschte Immunreaktionen bei Patienten auslösen. Da bislang verwendete Tiermodelle nur unzureichende Informationen liefern, hat ProBioGen das *in-vitro*-Modell eines menschlichen Lymphknotens, den human ALN (human Artificial Lymph Node) entwickelt, mit welchem das Nebenwirkungsprofil eines Wirkstoffes simuliert werden kann. Durch Wirkstoffe induzierte Immunreaktionen führen u.a. zur Antikörper-Sekretion, welche im Zellkulturüberstand mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) nachgewiesen werden können.

1 Ansatz

Biopharmazeutische Wirkstoffe wie beispielsweise Antikörper, Glykoproteine, Zytokine oder Impfstoffe, können neben den erwünschten Wirkungen auch unerwünschte Immunreaktionen bei Patienten auslösen. Sie bergen damit das Risiko unerwünschter Immunogenität, wie z.B. die Bildung neutralisierender Antikörper, die Auslösung von Hypersensibilität, Allergien oder einem anaphylaktischen Schock. Die in der Praxis bislang verwendeten Tiermodelle zu *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen liefern unzureichende Informationen über die zu erwartende Wirksamkeit und das Nebenwirkungsprofil eines Wirkstoffes bei Verabreichung am Menschen. Die hohe Spezies-Spezifität moderner Biopharmazeutika wird in Tierversuchen nicht abgebildet – ein Nachteil, der immer wieder zu unerwarteten und oft auch unerwünschten Reaktionen in der anschließenden klinischen Prüfung führt. Um dieser Herausforderung zu begegnen, hat ProBioGen das *in-vitro*-Modell eines menschlichen Lymphknotens, den human ALN (Artificial Lymph Node), entwickelt. Dabei werden in einer komplexen organoiden Gewebekultur menschlicher, immunkompetenter Zellen immunologische Strukturen und Reaktionen eines Lymphknotens nachempfunden. Modelle wie der ALN liefern neue Einsichten in die Wirkweise von Medikamenten und können für die Evaluierung der produktbezogenen Risiken herangezogen werden.

Induzieren die Wirkstoffe eine immunologische Reaktion im humanen ALN, kann diese über immunhistologische Analysen und Zytokinprofile sowie entsprechende Antikörper-Sekretion nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck soll, basierend auf der am IWS etablierten SPR-Plattform, ein System für den Nachweis spezifischer Antikörper im Zellkulturüberstand des humanen ALN entwickelt werden. Als Modellstimulation wurde das Lysat des humanen Cytomegalie-Virus (CMV) gewählt, exemplarisch sollen hier spezifische Antikörper gegen das prominente Phosphoprotein pp65 des CMV nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Technologie des humanen künstlichen Lymphknotens

Die Basis für die Bildung von immunkompetentem Gewebe in einem dreidimensionalen Matrix-unterstützten Ko-Kultur-System bilden humane Leukozyten gesunder Spender. Eine Reihe prozessbezogener sowie immunrelevanter Parameter kann zum on-line und off-line Monitoring der laufenden Immunprozesse im miniaturisierten Bioreaktor verwendet werden. Somit kann sowohl das immunogene Risiko als auch das Wirksamkeitspotenzial bestimmt werden [1].

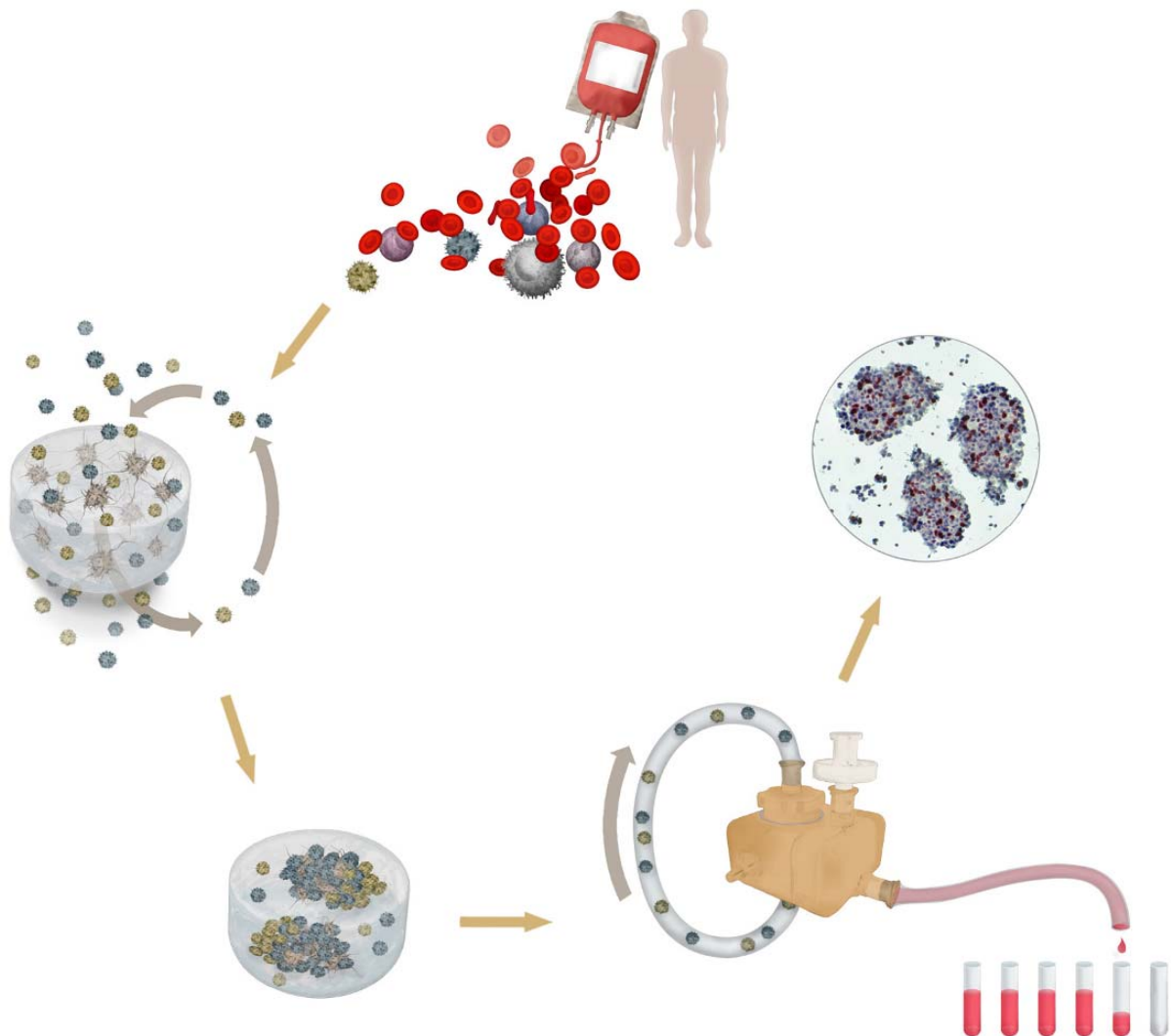


Bild 1 Prozessschema von der Präparation der Immunzellen bis zur Perfusionkultur im miniaturisierten Bioreaktor zur Testung von Substanzen

Aus Spenderblut werden Lymphozyten und Monozyten isoliert, teilweise differenziert und anschließend in eine dreidimensionale Matrix überführt. Die Matrixkultur im miniaturisierten Bioreaktor wird kontinuierlich mit Medium versorgt, optional ein Zellkreislauf integriert. Induziert die zu charakterisierende Substanz nach Inokulation eine Immunantwort, kommt es zur Zellaggregation und Ausbildung von Mikroorganoiden, in dessen Verlauf die Aktivierung und Reifung von B-Zellen induziert wird, wodurch Plasmazellen entstehen. Diese produzieren und sekretieren spezifische Antikörper gegen das inokulierte Antigen. Nach ausreichender Inkubation kann dies anhand von immunhistologischen Analysen und Zytokinprofilen oder Antikörpern im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

2.2 SPR Messsystem

Das SPR-Messsystem setzt sich aus einem am Fraunhofer IOF entwickelten Auslesesystem, mit den dazugehörigen SPR-Chips, und einer am Fraunhofer IWS entwickelten On-Chip-Mikrofluidik mit dem dazugehörigen Probenhandlingsystem zusammen [2,3].

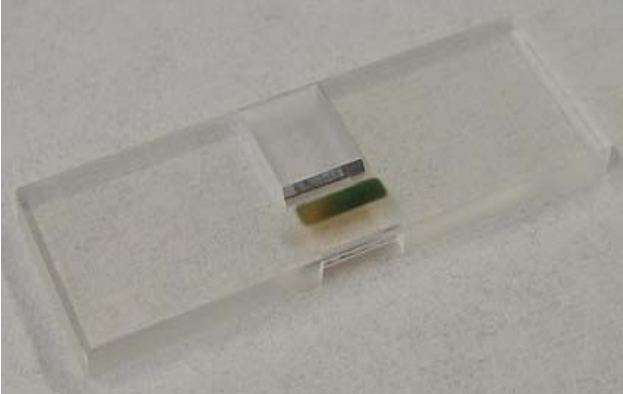


Bild 2 SPR-Chip



Bild 3 Messgerät des Auslesesystems

Die SPR-Chips (**Bild 2**) im Objekttträgerformat ($76 \times 26 \times 4 \text{ mm}^3$) sind als Einwegartikel ausgelegt und werden mittels Spritzguss aus TOPAS gefertigt. Für eine justage-unkritische Kopplung zum optischen Auslesesystem und zur Vereinfachung des gesamten optischen Aufbaus sind Linsenelemente in den Chip integriert. Die Oberseite des Chips ist mit einer etwa 50 nm dicken Goldschicht, auf der bis zu 40 Messflächen in einer Reihe realisiert werden können, beschichtet.

Das Auslesesystem besteht aus einem Messgerät (**Bild 3**) und dem dazugehörigen Rechner mit der Gerätesoftware. Die SPR-Chips werden auf dem Messgerät unter Nutzung von Anschlüssen passiv positioniert. Als Lichtquelle dient eine Leuchtdiode (LED) mit einer Wellenlänge von 810 nm. Deren Licht wird kollimiert auf den SPR-Chip gestrahlt und durch die integrierten optischen Elemente auf die Goldfläche fokussiert. Je nach Brechungsindex des anliegenden Mediums werden bei einem bestimmten Einfallswinkel Oberflächen-Plasmonen angeregt, wodurch die Reflexion an der Chipoberfläche bei diesem Winkel sinkt. Das an der Goldfläche reflektierte Licht verlässt wiederum kollimiert den SPR-Chip und wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Auf der vertikalen Achse des Kamerabildes wird der Einfallswinkel und auf der horizontalen Achse die Position auf der Goldfläche abgebildet. Daraus kann mittels Bildverarbeitung für jede Messfläche der aktuelle Winkel des durch die SPR hervorgerufenen Intensitätsminimums ermittelt und aufgezeichnet werden. Binden Biomoleküle an die Oberfläche an, dann verändert sich die Resonanzbedingung für die Oberflächenplasmonen und es kommt zu einer Änderung des Resonanzwinkels. Neben einer für Referenzmessungen und Kontrollzwecke benötigten Anzahl an Flächen stehen bis zu 30 Messflächen zur Verfügung, die mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen belegt werden können. Somit können bis zu 30 verschiedene Analyten in einer Probe detektiert werden.

Die On-Chip-Mikrofluidik besteht, wie in **Bild 4** schematisch dargestellt, aus einer Flusszelle und einer Abschlussplatte, welche Öffnungen für die fluidische Kontaktierung, so genannte Fluidikports, enthält. Als Flusszelle wird eine doppelseitige Klebefolie verwendet, in welche mittels Laser die entsprechenden Kanalstrukturen für die Mikrofluidik eingebracht werden. Im Anschluss an die anwendungsspezifische Funktionalisierung werden SPR-Chip, Flusszelle und Abschlussplatte miteinander verklebt. Die Höhe der Kanäle wird über die Dicke der Klebefolie definiert. Üblicherweise wird eine Kanalhöhe von $50 \mu\text{m}$ realisiert. Durch die planare Oberfläche der Chips und die definierte Anordnung der Fluidikports steht eine spezifische Schnittstelle zur Verfügung, die das weitere Handling deutlich vereinfacht. Die Temperierung und fluidische Kopplung der Chips erfolgt im SPR-Auslesesystem über eine Anschlussplatte. Über in die Anschlussplatte integrierte O-Ringe wird eine dichte Verbindung der Mikrofluidiksysteme von Chip und Anschlussplatte realisiert.

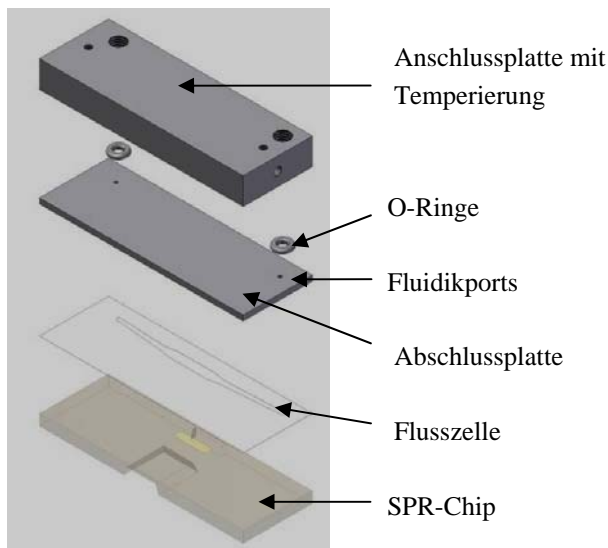


Bild 4 Schematischer Aufbau der On-Chip-Mikrofluidik

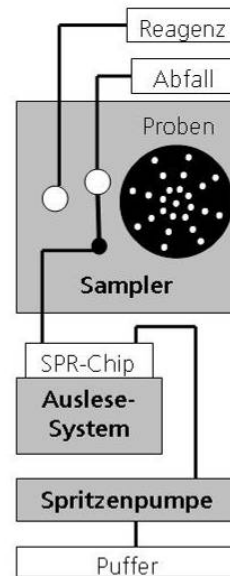


Bild 5 Schematischer Aufbau des Probenhandlings

Das automatisierte Probenhandlingsystem besteht, wie in **Bild 5** schematisch dargestellt, aus einem Probensamplers, einer Spritzenpumpe und mehreren Reservoiren. Durch Auswahl des entsprechenden Reservoirs durch den Probensamplers ist es möglich den Chip definiert mit Probe oder Reagenz zu befüllen bzw. mit Puffer zu spülen. Probensamplers, Thermostat und Pumpe werden per Software gesteuert. Dabei können Samplersposition, Temperatur, Pumprichtung, Förderrate und zeitliche Abläufe frei programmiert und somit verschiedene Messregimes realisiert werden.

2.3 Funktionalisierung der SPR-Chips

Alle verwendeten Chemikalien wurden von VWR International bezogen. Nach Reinigung der Goldoberfläche mit 65%iger, rauchender Salpetersäure wurden die SPR-Chips für drei Minuten in eine Neutralisierungslösung aus einem Teil Wasserstoffperoxid (30%), einem Teil Ammoniaklösung (25%) und fünf Teilen Wasser gestellt. Nach Spülen mit doppelt destilliertem Wasser erfolgte die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit 200 μl DTSSP (6,7 mg/ml H_2O) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. DTSSP (3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate]) ist ein homobifunktionaler, aminreaktiver Crosslinker, welcher primäre Aminogruppen kovalent bindet. Anschließend erfolgte die Immobilisierung der Antigene mit Hilfe einer inversen Flusszelle, wobei je nach benötigter Messflächenanzahl eine 4-Kanal-Flusszelle oder eine 17-Kanal-Flusszelle eingesetzt wurde. Dazu wurden je fünf Mikroliter der Antigenlösungen ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro Messfläche aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wird die gesamte Messfläche für eine Stunde mit Casein ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und TrisHCl (100 mM) gegen unspezifische Wechselwirkungen geblockt.

2.4 Vermessung von Antikörperlösung, Serum und Zellkulturüberständen

Vor der Messung wurde der PBS-Spülpuffer (phosphate buffered saline) auf 80°C erhitzt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Vacuubrand) entgast, bis keine Blasenbildung mehr zu beobachten war. Die Messung erfolgt bei einer konstanten Temperatur von 30°C . Zuerst wird der Inkubationsraum mit PBS gespült bis sich eine stabile Basislinie einstellt. Im Anschluss wird die Goldoberfläche mit der Probe inkubiert. Für das Erreichen einer hohen Sensitivität wird dabei das Probevolumen von $90\mu\text{l}$ mehrfach über die Messflächen gepumpt. Abschließend wird erneut mit PBS gespült bis die Messkurve ein stabiles Niveau erreicht.

3 Ergebnisse

In ersten Versuchen erfolgte ein Test der Chip-Funktionalität mit Antikörperlösung. Dabei wurden bei einer Konzentration von 10,5 ng/µl Signale im Bereich von 20 Pixeln gemessen, wie in **Bild 6** beispielhaft dargestellt. Die Referenzflächen hingegen zeigen keine Änderung (nicht dargestellt). Im Anschluss wurde eine Messung mit CMV-positivem Spenderserum durchgeführt (**Bild 7**), welches 1:3 verdünnt wurde. Dabei ist die Bindung von IgG an Protein A (60 Pixel), als auch die Bindung von pp65-Antikörpern an das immobilisierte pp65-Antigen (5 Pixel) zu erkennen.

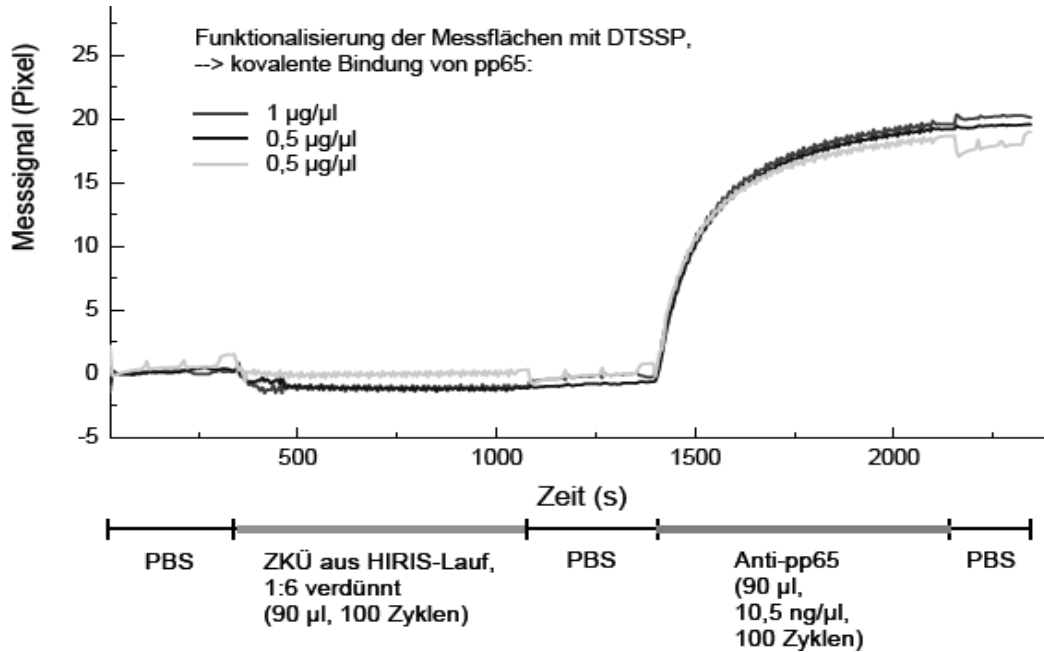


Bild 6 Signalverlauf bei der Vermessung von Antikörperlösung. Dargestellt ist die Brechungsindexänderung in Pixel bei Inkubation mit einem Zellkulturmedium mit und ohne Antikörper.

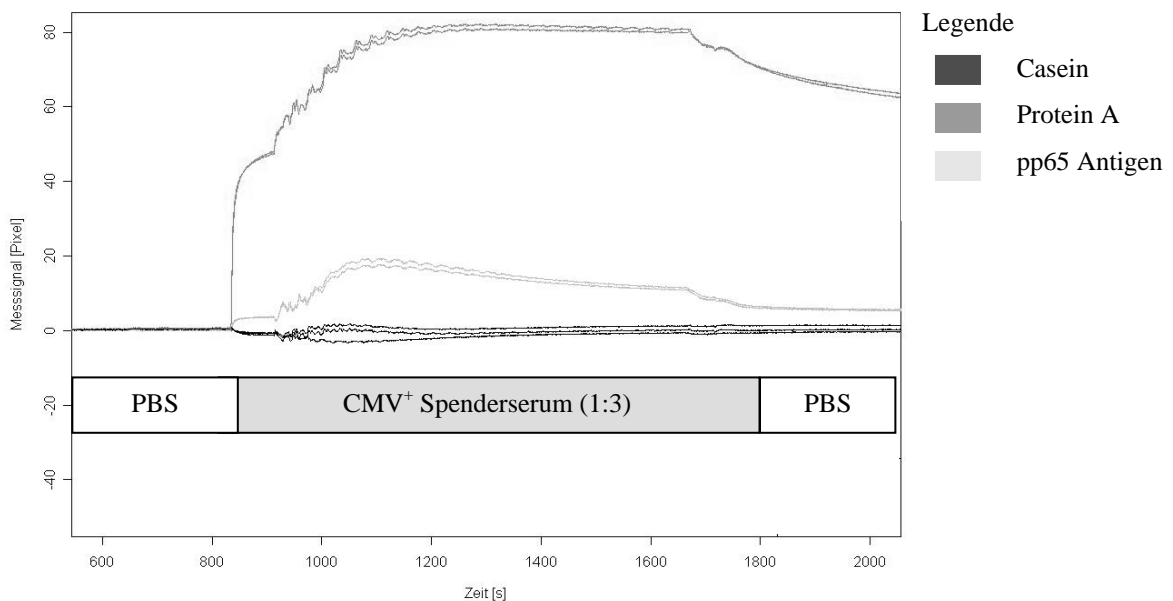


Bild 7 Signalverlauf bei der Vermessung von CMV-positivem Spenderserum. Dargestellt ist die Brechungsindexänderung in Pixel der mit pp65 funktionalisierten Messflächen (hell), der mit Protein A funktionalisierten Messflächen (dunkel), sowie der mit Casein funktionalisierten Referenzmessflächen (schwarz), bei Inkubation mit CMV-positivem Spenderserum.

Anschließend wurden Zellkulturüberstände aus Vorkulturen zum humanen ALN vermessen, in denen zunächst eine sekundäre Immunantwort induziert wurde. Dabei wurde beispielsweise, wie in **Bild 8** ersichtlich, ein Signal von 2 Pixeln gemessen, wobei die mit Casein funktionalisierte Referenzmessfläche keine Änderung zeigte.

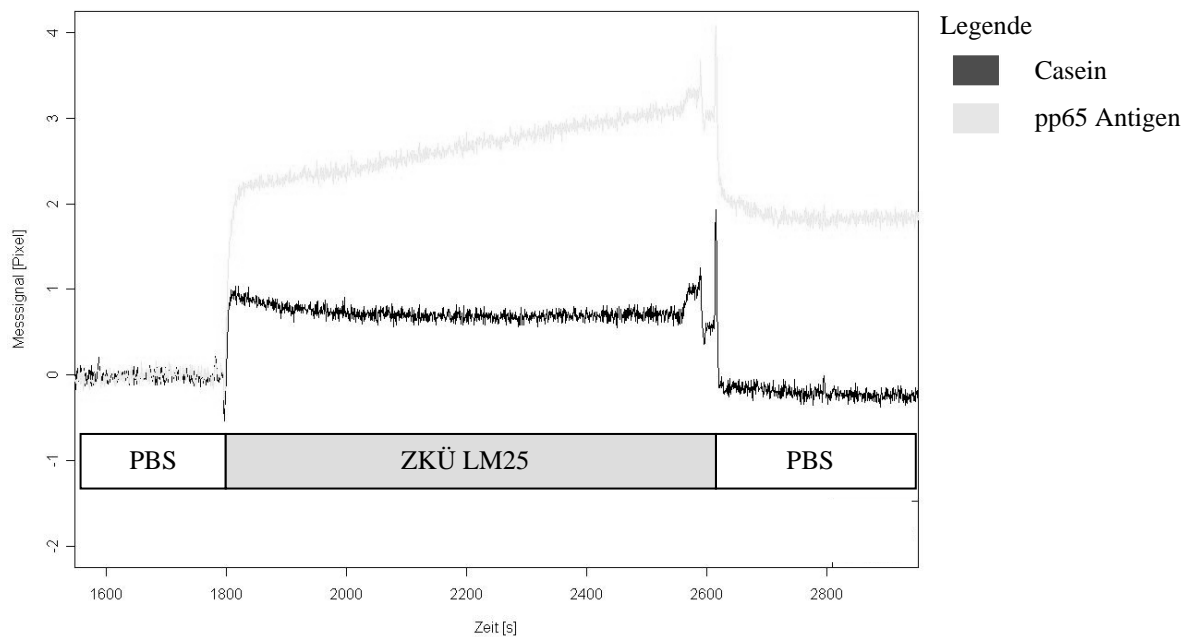


Bild 8 Signalverlauf bei der Vermessung eines Zellkulturüberstandes. Dargestellt ist die Brechungsindexänderung in Pixel der mit pp65 funktionalisierten Messflächen (hell), der mit Protein A funktionalisierten Messflächen (dunkel), sowie der mit Casein funktionalisierten Referenzmessflächen (schwarz), bei Inkubation mit Zellkulturüberstand aus einer *in-vitro* induzierten sekundären Immunantwort.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Da bislang verwendete Tiermodelle nur unzureichende Informationen liefern, hat ProBioGen das *in-vitro*-Modell eines menschlichen Lymphknotens, den human ALN (human Artificial Lymph Node) entwickelt, mit welchem das Nebenwirkungsprofil eines Wirkstoffes untersucht werden kann. Induzieren die Wirkstoffe eine Immunreaktion, dann sekretieren induzierte Plasmazellen entsprechende Antikörper, welche mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden können.

In zukünftigen Arbeiten soll durch Integration weiterer Antigene bzw. Antigen-Peptide ein Multiparameter-Analysesystem entwickelt sowie Technologien zur Chipregeneration etabliert werden.

Danksagung

Die Autoren danken Dr. Steffen Howitz von der Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH (GeSiM) für die Unterstützung bei der Mikrofluidikentwicklung sowie dem Projektträger VDI / VDE Innovation und Technik GmbH und dem Zuwendungsgeber Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Förderung des Projektes „Chip-Kompaktmessgerät auf SPR-Basis für die Point of Care Diagnostik (ChipCare)“.

Literatur

- [1] C.Giese et al: A Human Lymph Node In Vitro—Challenges and Progress, Artificial Organs 2006
- [2] N. Danz and A. Hofmann: „Plasmon Resonance Sensor“, WO 2008/025488.
- [3] A. Kick et. al.: “Development of a platform technology for the detection of genetic variations by surface Plasmon resonance”, Eurosensors 2008