

University of Groningen

## Microfluidic Digestive Systems for Drug Analysis

de Haan, Pim

DOI:  
[10.33612/diss.190919502](https://doi.org/10.33612/diss.190919502)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
de Haan, P. (2021). *Microfluidic Digestive Systems for Drug Analysis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.190919502>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Appendices

## Summary

Characterization of the behavior of drugs in the gastrointestinal (GI) tract is essential in drug development. As many drugs are administered orally, in the form of tablets, capsules, or oral solutions, the drugs need to be able to survive the harsh conditions in the GI tract. Once they arrive at the lining of the stomach or intestine, the physical-chemical properties of the drugs should allow the translocation over the gut wall, into the circulatory tract of the patient. Only then can a drug move to its action site, for example in a target organ. This thesis describes novel, miniaturized systems that may find applications in drug development as well as food and toxicological research. Chapter 1 provides a general background on the setting of the work described in this thesis. As this work took place on the crossroads of biology, physics, chemistry, and engineering, a brief introduction into the relevant aspects of each of these fields is given.

Chapter 2 reviews the recent advances in organ-on-a-chip research, with particular focus on the use of miniaturized models of the human GI tract for drug and toxicology research. After a basic introduction on the anatomy and physiology of the GI tract, a basic introduction into the pharmacokinetic process of absorption and resulting bioavailability is given. Specific examples of intestinal mimics for drug development and toxicology testing are highlighted, with emphasis on their functionality and applicability in research.

Chapter 3 describes a novel, miniaturized digestive system based on continuously flowing microreactors that have been connected in modules. Samples containing medicinal drugs or nutrients were exposed to artificial versions of digestive juices, in micromixers that represented the mouth, stomach, and intestine, respectively. Each micromixer consisted of a straight microchannel with herringbone-shaped grooves in its surface, which caused perturbations of the laminar flow patterns inside the channel. These perturbations, in turn, caused a very fast mixing of samples with every consecutive flow of digestive juices. The activity of digestive enzymes contained in the juices was proven by studying their enzyme kinetics, using food molecules as substrates. The milk protein, lactoferrin, was successfully digested in this *in vitro* digestive system and compared with a gold standard batch-wise *in vitro* digestive system as a control.

An adaptation of this *in vitro* digestive system is described in Chapter 4. The versatility of microfluidic systems was utilized to make a similar continuous-flow digestive system, but now specifically representing the physiology of the infantile GI tract. As infants only consume liquid and semisolid foods, the oral phase of digestion is less significant and mastication is entirely absent. Furthermore, the infantile digestive process is different in that both the pH of the gastric phase is higher (*i.e.* less acidic), and the concentrations of the various digestive enzymes are lower. These two factors result in a different digestive capacity in infants when compared to adults. The digestion of model milk protein, lactoferrin, was studied in this infantile system. The digestion was again compared with a commonly used batch-wise *in vitro* digestive system, and lactoferrin was digested to a much lesser extent than in the adult system.

In Chapter 5, the modular *in vitro* digestive system (as described in Chapter 3), was coupled to a barrier model containing living intestinal epithelium. This device, also termed gut-on-a-chip in the literature, had two fluidic compartments separated by a porous membrane. Human intestinal epithelial cells (Caco-2) were co-cultured with mucus-secreting cells (HT29-MTX-E12) in the top chamber of the device (apical chamber) as a mimic of the physiological intestinal barrier. The translocation of drugs from the top (apical) to bottom (basolateral) fluidic compartment had been used in the past to model drug absorption from the GI tract into the body, however, it had not been used in combination with a full *in vitro* digestion before. As a detection method, a state-of-the-art ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometric detection (UPLC-QTOF-MS) was used to very sensitively detect translocated molecules. Two drugs were used as models in this system: the calcium antagonist, verapamil, was passed through a full microfluidic digestion before it translocated through the cells into the basolateral side; without any negative effects from the digestion. The proton pump inhibitor, omeprazole, was then exposed to a full digestion, which led to a decomposition of the molecule in gastric juice as it is acid-labile. In a subsequent experiment, omeprazole was not passed through the mouth and stomach, but directly only through the intestinal digestive stage before it reached the epithelial cells. This set-up showed a translocation of omeprazole that mimics the enteric-coated formulation that is usually given to patients. Finally, verapamil was co-administered to the full system in a food matrix consisting of apple juice, to prove that this system is also capable of functioning when administering liquid foods.

The following chapters focused more on tools for use in gut-on-a-chip research. Chapter 6 describes a different approach to liquid delivery, using a mass flow control system based on Coriolis mass flow sensors. Commonly used syringe pumps deliver a somewhat pulsatile flow of e.g. cell medium to microfluidic devices, at a set volumetric flow rate (volume per time), with its working mechanism involving the slow emptying of a syringe filled with cell medium. We devised a system with pressurized containers of cell medium, which are connected to downstream Coriolis mass flow controllers. This mass flow controller first measures the mass flow (mass per time) and then regulates a built-in valve to keep the flow rate at a pre-set mass flow. In doing so, it is delivering mass flows to the microfluidic set-up very accurately and for extended periods of time.

In Chapter 7, we describe a new microfabrication procedure to make thin poly(dimethylsiloxane) (PDMS) membranes with arrays of micropores in them. These porous membranes are used in gut-on-a-chip devices to separate the two channels (representing the apical and basolateral compartments) and to serve as the solid support onto which the epithelial cells may grow. Commonly used procedures involve deep-reactive ion-etched molds, which requires highly specialized equipment; this chapter, however, describes a procedure using standard photoresist-based photolithography. After fabrication, the 30- $\mu\text{m}$ -thick membranes containing cylindrical 12- $\mu\text{m}$ -diameter pores were incorporated in gut-on-a-chip devices, and epithelial cells were shown to thrive when grown on these membranes.

Chapter 8 describes the fabrication of microfluidic devices and components by stereolithographic 3D-printing. This fabrication method builds structures by laser-curing a resin onto a platform, thus building the final structure layer-by-layer. Several microfluidic components were designed and fabricated, including a static mixer, a cartridge for enzyme immobilization, and several universal connectors. The cartridge was employed as an immobilized enzyme reactor for use in *in vitro* digestions, with the enzyme,  $\alpha$ -amylase, immobilized onto the channel walls to mimic enzymatic digestion in the oral phase. The activity of this enzyme was studied by digestion of a fluorescently labeled starch sample. In the future, similar microreactors can be developed for the remaining two digestive phases (in the stomach and intestine).

Chapter 9, finally, provides a general discussion on gut-on-a-chip devices and the other topics discussed in this thesis. It places the research in a broader context, gives implications for use in drug and toxicology research, and gives directions for future work.

## **Nederlandse Samenvatting**

Het karakteriseren van het gedrag van geneesmiddelen in het verteringsstelsel is essentieel bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Veel geneesmiddelen worden oraal toegediend, bijvoorbeeld als tablet, capsule, of drank, en daarom moeten deze geneesmiddelen in staat zijn om de omstandigheden in het maag-darmkanaal te doorstaan. Wanneer deze geneesmiddelen daarna aankomen bij de maag- of darmwand, moeten de fysisch-chemische eigenschappen van het geneesmiddel ook nog zodanig zijn dat ze kunnen worden opgenomen door de darmwand en het geneesmiddel de bloedstroom van de patiënt kan bereiken. Een geneesmiddel heeft dit nodig om te kunnen werken op de juiste plaats, bijvoorbeeld in het doelorgaan. Dit proefschrift beschrijft nieuwe, geminiaturiseerde systemen die toepassing kunnen vinden in zowel geneesmiddelonderzoek als in voedingsonderzoek en toxicologisch onderzoek. Hoofdstuk 1 biedt een algemene achtergrond voor het werk dat beschreven is in dit proefschrift. Omdat dit werk zich heeft afgespeeld op het snijvlak van de biologie, natuurkunde, scheikunde en technologie, wordt een korte inleiding gegeven over de relevante aspecten van elk van deze velden.

Hoofdstuk 2 beschouwt de recente ontwikkelingen in het organ-on-a-chip-onderzoek, met een bijzondere focus op het gebruik van geminiaturiseerde modellen van het menselijke maag-darmstelsel in geneesmiddelonderzoek en toxicologisch onderzoek. Eerst wordt een basale introductie over de anatomie en fysiologie van het maag-darmstelsel gegeven, met daarna een introductie over het farmacokinetische absorptieproces en de daaruit volgende biologische beschikbaarheid. Specifieke voorbeelden van darmmodellen voor geneesmiddelonderzoek en toxicologisch onderzoek worden naar voren gebracht, met nadruk op hun functionaliteit en toepasbaarheid in het onderzoek.

Hoofdstuk 3 beschrijft een nieuw geminiaturiseerd verteringssysteem bestaande uit continu stromende microreactoren die als modules aan elkaar verbonden zijn. Monsters met geneesmiddelen of voedingsmiddelen zijn hierin blootgesteld aan kunstmatige versies van verteringssappen, in micromixers die de mond, maag, en darm vertegenwoordigen. Elk van deze micromixers bestond uit een recht microkanaal met visgraatgroeven in het oppervlak die de laminaire stroming in het kanaal kunnen verstoren. Deze verstoringen zorgen op hun beurt voor een zeer snel mengproces van de monsters met de opeenvolgende toevoegingen van verteringssappen. De activiteit van de enzymen die deel uitmaken van de verteringssappen is

aangetoond door de enzymkinetiek te meten met voedselmoleculen als substraat. Het melkeiwit lactoferrine is succesvol verteerd in dit *in vitro* verteringssysteem, en is daarbij vergeleken met een gebruikelijke *in vitro* verteringsmethode in een groter batchproces als controle.

Een variant van dit *in vitro* verteringssysteem is beschreven in hoofdstuk 4. We hebben gebruik gemaakt van de veelzijdigheid van microfluidische systemen om een soortgelijk continu stromend verteringssysteem te maken, maar nu specifiek als model voor het verteringsstelsel van pasgeborenen. Pasgeborenen krijgen alleen maar vloeibaar of halfvast voedsel, en daarom is de orale verteringsfase van veel minder groot belang; kauwen is natuurlijk geheel afwezig. Daarbij is het verteringsproces in pasgeborenen ook anders op twee andere vlakken: de pH van de maagfase is hoger (dat wil zeggen, minder zuur), en de concentratie van de verscheidene verteringsenzymen is lager. Deze twee factoren samen resulteren in een andere verteringscapaciteit bij pasgeborenen dan in volwassenen. Het verteringsproces van het melkeiwit lactoferrine is ook in dit systeem bestudeerd en vergeleken met een vertering in een *in vitro* batchproces zoals dat gebruikelijk is. De lactoferrine werd in veel mindere mate verteerd dan in het volwassen verteringssysteem.

In hoofdstuk 5 is het modulaire *in vitro* verteringssysteem (beschreven in hoofdstuk 3) gekoppeld aan een barrièremodel met daarin levend darmepitheel. Dit model, in de literatuur ook wel aangeduid als darm-op-een-chip, bevatte twee vloeistofcompartimenten gescheiden door een poreus membraan. Menselijke darmepitheelcellen (Caco-2) en slijmproducerende cellen (HT29-MTX-E12) zijn in co-culture gekweekt in het bovenste kanaal van dit systeem (de apicale kamer) als model voor de fysiologische darmbarrière. De translocatie van geneesmiddelen van bovenste (apicale) naar onderste (basolaterale) vloeistofstroom is ook in het verleden al gebruikt als model voor geneesmiddelabsorptie in het maag-darmstelsel, maar nog niet eerder is het gebruikt in combinatie met een complete voorafgaande *in vitro* vertering. De getransloqueerde moleculen zijn met zeer hoge gevoeligheid gemeten met een ultrahigh performance vloeistofchromatografiesysteem met quadrupole-time-of-flight massaspectrometrische detectie (UPLC-QTOF-MS). Twee geneesmiddelen zijn gebruikt in dit systeem: de calciumantagonist verapamil is aan een volledige microfluidische vertering blootgesteld voordat het transloqueerde door de cellaag naar de basolaterale vloeistofstroom, zonder enige negatieve effecten van de vertering. In een vervolgonderzoek werd de protonpompremmer omeprazol blootgesteld aan volledige vertering, waarbij het molecuul in maagsap uiteen viel als gevolg van zuurinstabiliteit. Omeprazol is daarna in een



vervolgexperiment buiten de mond en maag om, direct in de darmfase toegediend voordat het doorstroomde naar de epitheelcellen. In deze opstelling transloqueerde omeprazol wel zonder negatieve gevolgen van de vertering, op een manier die de maagsapresistente coating van omeprazolformuleringen nabootst die gebruikelijk is voor gebruik door patiënten. Tot slot werd verapamil nog eens bestudeerd in de volledige vertering, maar nu met gelijktijdige toediening van een voedselmatrix bestaande uit appelsap, om aan te tonen dat dit systeem ook kan blijven functioneren wanneer er vloeibaar voedsel wordt toegediend.

De hierop volgende hoofdstukken richten zich meer op hulpmiddelen en apparatuur die gebruikt kunnen worden in darm-op-een-chiponderzoeken. Hoofdstuk 6 beschrijft een andere benadering voor het leveren van vloeistoffen met een zogenaamde massastroomregelaar gebaseerd op Coriolis massastroomsensoren. Spuitenpompen worden veel gebruikt om bijvoorbeeld celmedium aan te voeren naar microfluidische opstellingen, maar deze geven een licht pulserende stroom op een vooraf ingestelde volumestroom (volume per tijd). Ze werken door een met celmedium gevulde spuit langzaam leeg te duwen. Wij hebben een nieuw systeem ontworpen, waarin celmedium wordt bewaard in voorraadflessen die onder druk worden gebracht. Het celmedium stroomt dan door naar een Coriolis massastroomregelaar, die eerst de massastroom (massa per tijd) meet en vervolgens reguleert met een ingebouwde regelklep om de stroomsnelheid op een vooraf ingestelde massastroom te houden. Deze opstelling kon worden gebruikt om massastromen naar de microfluidische opstelling aan te voeren met een grote juistheid en voor langdurige periodes, zonder dat veranderende vloeistofeigenschappen invloed hadden op vloeistofstromen.

In hoofdstuk 7 beschrijven we een nieuw microfabricageproces voor het maken van dunne poly(dimethylsiloxaan) (PDMS) membranen met grote hoeveelheden microporiën erin. Deze poreuze membranen worden gebruikt in darm-op-een-chipsystemen om de twee kanalen (die de apicale en basolaterale compartimenten voorstellen) te scheiden en om als vaste ondergrond te dienen waarop de epitheelcellen kunnen groeien. De meest voorkomende procedures maken gebruik van diep reactief ionenetsen, waarvoor zeer gespecialiseerde apparatuur nodig is. Dit hoofdstuk beschrijft echter een procedure waarin gebruik wordt gemaakt van fotolithografie gebaseerd op standaard fotolak. Met deze fabricage zijn membranen van 30  $\mu\text{m}$  dik gemaakt waarin cilindrische poriën van 12  $\mu\text{m}$  diameter zijn opgenomen, en die membranen zijn vervolgens ingebouwd in darm-op-een-chipsystemen. In deze systemen zijn darmepitheelcellen op de membranen gekweekt, en die bleken daar goed te gedijen.

Hoofdstuk 8 beschrijft het fabriceren van microfluidische systemen en componenten daarvoor door middel van stereolithografisch 3D-printen. Bij deze fabricagemethode worden structuren laag voor laag opgebouwd op een printplatform door een hars met laserstralen uit te harden. Verschillende microfluidische componenten zijn ontworpen en gefabriceerd, waaronder een statische mixer, een patroon voor enzymimmobilisatie en verscheidene universele verbindingstukken. Het patroon is gebruikt om een reactor met geïmmobiliseerde enzymen te maken, waarin het enzym  $\alpha$ -amylase aan de wanden van het patroon is gebonden om de enzymatische vertering in de mond na te bootsen. De activiteit van dit enzym is bepaald door een fluorescent gelabeld zetmeelmonster te laten verteren. In de toekomst kunnen zulke microreactoren ook worden ontwikkeld voor de resterende twee verteringsfasen (in de maag en de darm).

Hoofdstuk 9, tot slot, geeft een algemene discussie over darm-op-een-chipsystemen en de andere onderwerpen die in dit proefschrift aan bod zijn gekomen. Het plaatst het onderzoek in een bredere context, geeft implicaties voor het gebruik in geneesmiddelenonderzoek en toxicologisch onderzoek, en geeft suggesties voor vervolgonderzoek.

## Acknowledgments

*I'm on my way*

*I don't know where I'm going*

*But I'm on my way*

Paul Simon – Me and Julio Down by the Schoolyard

I think that perfectly captures the beauty of doing research as a graduate student – the freedom to explore which way is the most interesting one to explore next, combined with the ability to make choices on the go. There are a couple of people I would like to thank for their help and advice. Sabeth, my thesis advisor, thank you for offering me a position in your group, for your encouragement and advice, and for the freedom you've given me to explore other alleys of research besides the main gut-on-a-chip work. I also greatly appreciate that you've given me an insight in both your language skills and teaching skills. Klaus, my thesis co-advisor, thanks for helping out with the physics and microfabrication challenges, as well as your critical assessment of results. Professors Nancy Allbritton, Roman Truckenmüller, and Klaas Nico Faber, thank you for carefully reviewing this manuscript.

I thank the Dutch Research Council (NWO) and all GUTTEST consortium partners, for funding this project and making the consortium a pleasant collaborative team. Vassilis Triantis, thank you for your contributions to the *in vitro* digestions, which are receiving interest from all kinds of areas around the world. A special word of thanks to the Wageningen folks: Milou Santbergen, thanks for a very successful collaboration; I'm glad that our projects finally came together in one functioning system that worked the first time we tried it! Hans Bouwmeester, Meike van der Zande, and Michel Nielen, thank you for your contributions to our collaborative project and for the great ideas that have led to the work in Chapter 5.

To all my current and former colleagues in the Pharmaceutical Analysis group: thanks for being great colleagues, and your constructive comments in the hallways and in group meetings. Jolanda, thanks for your support and for providing some order in the occasional chaos. Patty, thanks for teaching me basic clean room skills and your interest in funny little projects with enzymes. Jean-Paul, thanks for your contributions to the technology – besides many small contributions, your biggest contribution is described in Chapter 6 of this thesis. Ruby, thanks for teaching me to work with liver slices (I still hope that gut-liver system will be built at some point), as well as the SLAS conference visits with you and Maciej. Kelci, thanks for your ideas and work on the 3D-printing part. Margaryta, thanks for introducing me to micromixers.

Lu, thanks for teaching me how to treat cells properly and for your help in on-chip cultures. Brandon, thanks for the pleasant collaboration over the years. Saravanan, Lieuwe, and Gerrit Poelarends, thanks for a brief collaboration on enzyme immobilization; I hope one day we can finally build a functioning biocatalytic immobilized enzyme reactor. Joost Lötters, thank you for your suggestions on the work with Coriolis mass flow sensors, and for the invited lecture at the MFHS conference.

I've had the privilege to supervise three great students. Daan, thanks for your enthusiasm and initiative in 3D-printing and for building a nice enzyme cartridge. Daigo, thanks for working on the infantile digestive system, which you did with a lot of pleasure. Samuel, thanks for building lots of gut-chips, and successfully studying omeprazole uptake in them. I think all three of you enjoyed spending time in the lab, and I hope to have conveyed a little bit of my enthusiasm for research to you.

I've had the pleasure to teach in the Pharmacy program for the last year and a half, with very nice colleagues. Thanks Eduard, Henk, Jan Willem, Jennifer, and Meint for the many philosophical conversations about teaching and how to motivate students.

To my friends: thanks for your interest and support over the years! Boy, thanks for many interesting conversations with cake and good coffee. Dorine, Dianne and Egbert-Jan, Laurens and Nick: thanks for the dinners and trips. Hanneke, Melinde, and Helena, thanks for the pub quiz nights; I hope we can do that again soon. To all other friends, family, and to Ilja's parents, grandmother, and Arvid and Maxime: thanks for your support and the great trips together!

Koni and Maciej, thanks for being great friends and standing next to me as my paranymphs. We have shared many hours together in the same office, and it was great to have your support.

Mom and Dad, thanks for your endless support and encouragement over the years. You have always stimulated me to be curious about everything and to be investigative, and I think that's helped shape me as a researcher. Bram, thanks a lot for being a great brother, for your support and for helping me with advice on lay-out and printing, as well as the many cycling trips.

And Ilja, of course, thanks for everything. You've always been there for me, and that's the best I could ever wish for. I look forward to our future with lots of traveling around the world together (and I hope we can finally make our big cycling-across-the-continent trip soon).

Thanks! – Pim

## Biography

Pim de Haan was born in Assen, the Netherlands, on April 19, 1991. He studied Pharmacy at the University of Groningen and obtained his BSc in 2011, and MSc in 2015, both *cum laude*. During his Pharmacy studies, he discovered his interest in chemical-pharmaceutical research while doing research projects on the use of enzymes in the synthesis of pharmaceuticals (with Prof. Gerrit J. Poelarends) and miniaturized analytical systems for nucleic acid isolation based on electrokinetics (with Prof. Sabeth Verpoorte). For the latter of these projects, he spent seven months in Cambridge, Massachusetts, U.S.A., as a visiting student at the Massachusetts Institute of Technology (with Prof. Jongyoon Han), supported by a *Dr. Saal van Zwanenberg* fellowship and *Groningen University Fund* bursary. After graduating, he worked as a pharmacist in a Dutch hospital before starting a PhD project in the Pharmaceutical Analysis group, with Prof. Sabeth Verpoorte as thesis advisor and Dr. Klaus Mathwig as co-advisor in 2015. The outcomes of that project are described in this thesis. Pim is currently doing research in the Pharmaceutical Analysis group and teaching in the Pharmacy undergraduate program at the University of Groningen.