

Application Report

QPatchにおけるCiPA Milnes hERG動態アッセイ

改良型*in silico*活動電位モデリングおよび不整脈予測を目指したFDAのCiPA要件を満たすために、これまで困難とされてきたMilnes hERG心臓安全性アッセイをQPatch向けに開発し、その実施例を以下に示す

Summary

- QPatchによる hERG動態アッセイは、その高い忠実度からFDAのMilnesプロトコルによるマニュアルパッチクランプで得られるデータと同等のデータが取得できた
- 長時間脱分極試験パルスを繰返し適用した実験全体にわたり、安定したhERG電流特性が得られた
- 本アッセイにより、薬剤の結合および捕捉によるhERG電流の振幅および減衰の動態変化を検出することができた
- 広範囲の薬物捕捉活性を示す臨床薬を使用して、薬理的バリデーションを行った

Introduction

心毒性における副作用は、未だに創薬プロセスにおいて新規化合物の開発が中止される要因となっており (Valentin and Redfern, 2017), ヒトの臨床リスク予測のためには前臨床においてより厳格な*in vitro*, *ex vivo*および*in vivo*アッセイやモデルが必要とされている。現在製薬業界では従来のヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル (hERG, $K_v11.1$) アッセイおよびQT延長検出アッセイに対する過度の依存から脱却する方向にあり、特に心不整脈による患者のリスク予測についてよりバランスの取れたアッセイを提供する新たな取り組みが進められている。FDAが主導するComprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) と日本の規制当局 (JiCSA, CSAHi) は、パッチクランプによる電気生理学スクリーニングパネルに他のヒト心臓イオンチャンネルを追加することでより正確にモデル化し、不整脈リスクを予測することを目指している。この広範なデータを最新式のヒト心室活動電位の*in silico*モデルで解析することにより不整脈の予測が行われる。英国, EU, 米国, 日本のワーキンググループの5年間にわたる広範な共同作業の結果、心筋イオンチャンネルアッセイの'ビッグ6'パネル (hERG, $Na_v1.5$, $Ca_v1.2$, K_vLQT1 , $K_v4.3$, および $K_v2.1$) から得られたデータを、標準的な*in silico*活動電位モデルに組み入れることで、十分にリスクプロファイルが明らかになっ

たほとんどの臨床薬 (ただしすべてではない) について、催不整脈リスクを正確に予測できることが明らかとなった。

FDAおよびCiPAワーキンググループによる最近の研究では、いわゆる 'Milnes' 電位プロトコル (Milnes et al., 2010; 図1) で得られたhERG-薬物動態データを、改良型の 'ダイナミック'O'Hara-Rudy *in silico*モデルに適用することで、キニジンやシサブリドなどの化合物の心臓への負荷を正確に予測できることが示された (Li et al., 2017)。薬物のhERGチャンネルへの結合と解離の動態は化合物の効力を決定する基本的要素であるが、チャンネルのポアに捕捉される化合物がより高い臨床でのリスクを有するという証拠が示された (Pearlstein et al., 2016)。薬物の作用、効力および心臓への負荷の重要性を鑑み、hERGチャンネルへの結合動態特性および薬物捕捉性を確実に測定するために、これまでは高忠実度が保証されたマニュアルパッチクランプ記録のみが採用されてきた。

本レポートでは、自動パッチクランプ (APC) プラットフォーム上で、ダイナミックな薬物-hERG動態を正確に記録することができる'Milnes'電位プロトコルの適用例を報告する。

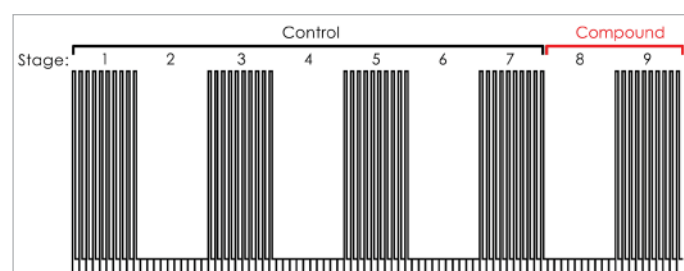


図1 - MilnesダイナミックhERG電位プロトコル。保持電位-80mVに保った細胞に、25秒毎に10秒間脱分極させる試験パルスを、ステージ1, 3, 5, 7, 9において10回ずつ反復して与えた。続いて次の10パルス列が繰り返されるまでは、細胞を250秒間にわたって-80mVに保持した (ステージ2, 4, 6, 8)。薬物捕捉の評価は、最後の10パルス列を適用する前のステージ8において、化合物を細胞に曝露して行った。

Results and discussion

DMSO安定性

細胞を-80mVで電位固定し、25秒ごとに10秒間脱分極させる10回の試験パルスによってhERG電流を励起し（ステージ1）、その後細胞を-80mVで250秒間保持した（ステージ2）。このサイクルを繰り返して（図1）、安定したベースラインを得た。実験条件を最適化後、DMSO（ステージ9）におけるすべての試験パルス応答が、最終のコントロールスイープ（ステップ7; 図2）と比較して波形が類似していたことが肝要である。また、hERG電流の力学的変化は薬物捕捉として現れるため、安定したベースラインがダイナミックhERGアッセイにとって最も重要となる。

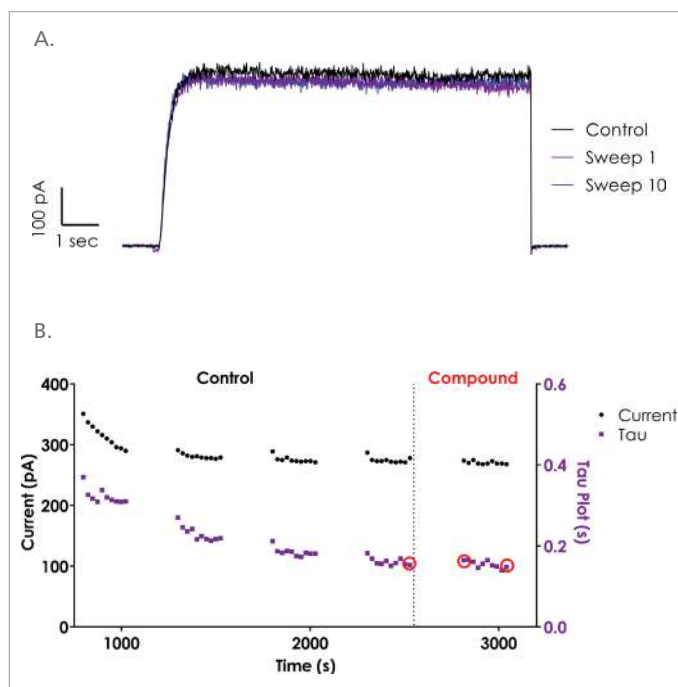


図2 - Milnesプロトコル適用後のhERG電流および活性化動態のDMSO安定性
A) ステージ9のhERG電流動態は、安定したベースラインを示すステージ7終端の最後のコントロール脱分極電流のそれと同様であった（Bの赤丸は示されたトレースを示す）。B) Aに示す実験の電流値および活性化フィッティングによるTau値。

hERG薬物捕捉の測定

捕捉特性が明らかなドフェチリドおよびテルフェナジンの2薬剤を、Milnes電位プロトコルを使用しMettrionで最適化されたダイナミックhERGアッセイを行った。各実験において、細胞はドフェチリド（10,30,100nM）またはテルフェナジン（1,30,100nM）の単一濃度に曝露された。臨床的に催不整脈薬であることが明らかとなっているドフェチリドの存在下での第1回目の試験パルス（図3）は、脱分極ステップ中に明確な薬物結合と抑制を示し、10秒でほとんどプラトーに達した。10回の連続脱分極の後には、ドフェチリドがポアに捉えられ、阻害が瞬間的に起こるため、それ以上の時間依存的な薬物結合は観察されなかった。同様に、心室性不整脈を誘発する傾向から市場より撤退を余儀なくされた抗ヒスタミン剤であるテルフェナジンは、hERGチャネルのポアにおける明確な捕捉が示された（図3）。

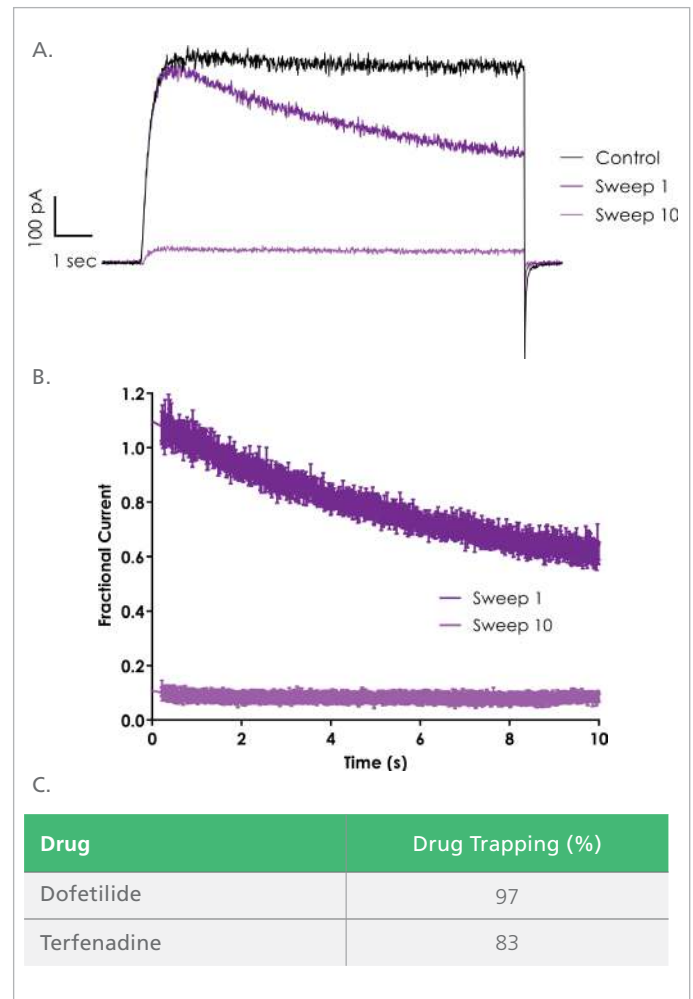


図3 hERG 薬物捕捉の例（ドフェチリド 100nM）
A) ドフェチリド適用前後の代表的なhERG電流トレース（ステージ9、スイープ1および10）。時間依存的な薬物結合は、スイープ1で見ることができ、スイープ10では見られず、薬物捕捉の特徴が示されている。B) コントロールスイープで正規化されたスイープ1および10の平均電流。C) 既知の捕捉薬物であるドフェチリドおよびテルフェナジンの捕捉率（%）。

非捕捉薬物によるMilnesプロトコルの検証

QPatchにおける記録設定とMettrionで最適化された実験条件によってhERG薬物捕捉が促進したり、薬物結合メカニズムと誤解されうる人為的影響が生じる可能性を排除するために、シサプリドおよびベラパミルを用いてMilnesプロトコルを用いたアッセイをバリデートした。両薬物は薬物捕捉を示さないことが、マニュアルパッチクランプによって既に示されている（Milnes et al., 2010; Li et al., 2017）。シサプリド（300nM）は、薬物適用中の最初の脱分極時hERG電流トレースに見られるように、hERGチャネルに迅速に結合する（図4）。しかしながら、捕捉特性がある薬物とは異なり、スイープ10では再度、脱分極中に時間依存的な薬物結合および電流の抑制を明確に示す。これは、シサプリドが電位ステップと電位ステップの間にポアから解離し、次の脱分極の間にチャネルが開かれた際に、再度結合するために起こる。ベラパミルも同様にパルス1と10の間で明確な時間依存的な結合を示し（生データ

未提示), QPatchダイナミックhERGプロトコルアッセイ (表, 図4) によって非捕捉性薬物としての特性を確認することができた。ベラパミルはhERG電流の抑制作用を示すものの臨床的に安全な薬物であり, ベラパミルによる不整脈のリスクはhERG捕捉の欠如および内向きのCaV1.2 L-タイプ電流の阻害により緩和されていることが示唆される。

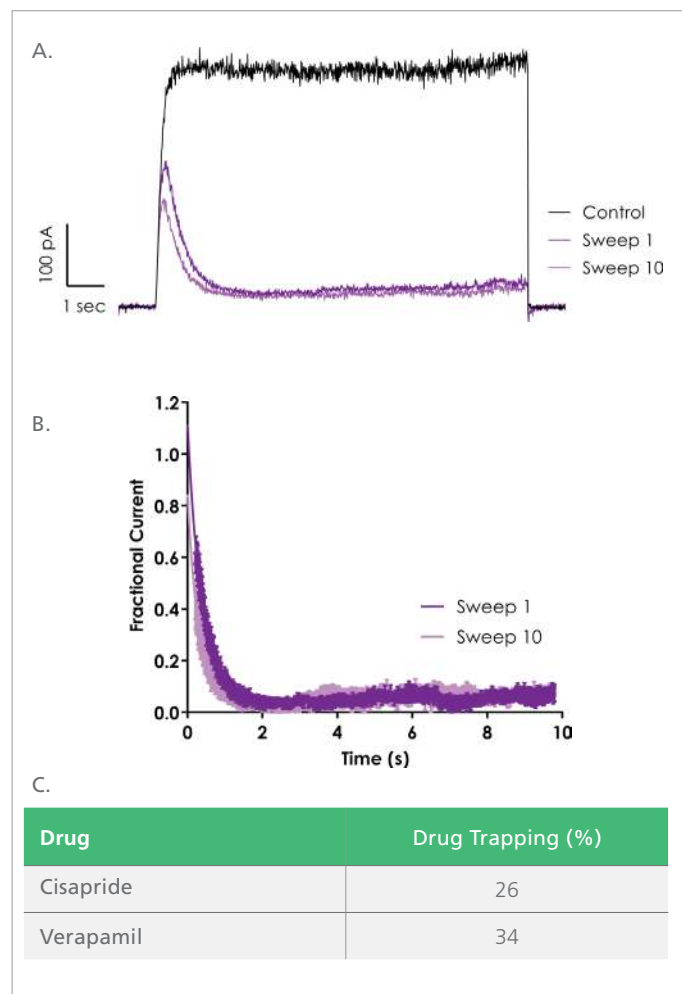


図4 - hERG 薬物捕捉を示さない化合物の例 (シサプリド 300nM)
 A) シサプリドの非存在下 (ステージ7; スイープ10, コントロール) および存在下 (ステージ9; スイープ1および10) における代表的なhERG電流トレース。時間依存的な薬物結合が最初と最後のスイープの双方で見られ, これは捕捉が起きていないことを示す。 B) コントロールスイープに対して正規化した, スイープ1および10の平均電流値。 C) シサプリドおよびベラパミルの捕捉率 (%)。捕捉特性が低いことを示している。

Conclusion

安全で効果的な新薬の開発には, 信頼性, 予測性, コスト効率の高い心臓安全性スクリーニングが不可欠である。ダイナミックhERG動態プロトコルを含むすべての必要とされるin vitroパッチクランプによる心臓イオンチャネルアッセイが, 高品質のデータが得られる一台のオートパッチクランプシステム上で実行することができれば, その取り組みの大きいなる手助けとなるだろう。

Methods

hERGを発現するCHO細胞はB'SYSから入手した。細胞の培養と回収は, Metrionで最適化されたQPatchプロトコルに従って行った。ギガオームシールおよび許容範囲のホールセルhERG電流をより高い割合で得るために, QPatch用の標準的な細胞懸濁法, シーリングおよびホールセルプロトコルを若干調整して実験を行った。

実験条件は, アプリケーションプロトコルにおいて化合物が適用される段階 (典型的には3~6回の適用期間後) において, 'Milnes'動態電位プロトコルによって誘発されるhERG電流が, 活性化動態および電流値を含むプロファイルにおいて安定するように最適化された。すべてのデータはシングルホールQPlateを用いて取得し, 単一細胞記録により力学的データを正確にフィッティングできるよう配慮した。

References:

Li Z, Dutta S, Sheng J, Tran PN, Wu W, Chang K, Mdluli T, Strauss DG, and Colatsky T (2017). Improving the *In Silico* Assessment of Proarrhythmia Risk by Combining hERG Channel Drug Binding Kinetics and Multichannel Pharmacology. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 10, e004628.

Milnes JT, Witchel HJ, Leaney JL, Leishman DJ, Hancox JC. (2010). Investigating dynamic protocol-dependence of hERG potassium channel inhibition at 37 degrees C: Cisapride versus Dofetilide. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 61, 178-191.

Pearlstein RA, MacCannell KA, Erdemli G, Yeola S, Helmlinger G, Hu QY, Farid R, Egan W, Whitebread S, Springer C, Beck J, Wang HR, Maciejewski M, Urban L, Duca JS (2016). Implications of Dynamic Occupancy, Binding Kinetics, and Channel Gating Kinetics for hERG Blocker Safety Assessment and Mitigation. *Curr Top Med Chem.* 16, 1792-1818.

Valentin JP, and Redfern, WS (2017). Prevalence, frequency, and impact of safety-related issues throughout the pharmaceutical life cycle. *Society of Toxicology conference abstract* 1722.

Author: Edward S A Humphries, Metrion Biosciences Ltd. and Thomas Binzer, Sophion Bioscience A/S