

## スポンサーセッション

### Automated Patch-Clamp – 高い信頼性のある data 取得を目指して



ナニオン・テクノロジーズ GmbH (Nanion Technologies GmbH)



サイトセントリクスバイオサイエンス GmbH (Cytocentrics Bioscience GmbH)



バイオリン・サイエンティフィック株式会社 (Biolin Scientific K.K.)

#### AUTOMATED PATCH CLAMPING FOR MASSIVELY PARALLEL ION CHANNEL SCREENING

Nanion Technologies, Gabrielenstr. 9, 80636 Munich, Germany

Niels Fertig

Further development of existing automated patch clamp devices and introduction of new systems widen the range of possible experiments and increase throughput. This meets the need to have gold standard electrophysiology compatible with primary ion channel drug screening requirements.

Here, we present chip-based approaches, which allows for parallel patch clamp recordings without compromising neither data quality nor sophistication regarding technical features. Using microstructured glass bottom microtitre plates, recordings from 768 cells can be performed in an automated fashion with one of the platforms, the SyncroPatch 384/768PE. With the development of a miniaturized, modular system, the SyncroPatch 384/768PE, and its integration in fully automated robotic platforms, all the advantages of the chip-based patch clamp technique are now completely realized and implemented. This indeed enables highly efficient, parallel ion channel screening with the chip-based approach in the industry standard of the microtitre plate format. Success rates achieved are routinely over 85 %. A full run of 768 cells for dose response analysis takes about 20 minutes, delivering several thousand data points per hour.

While cell usage is of little concern when using standard cell lines such as HEK cells, it becomes a crucial constraint with cells of limited availability, such as primary or otherwise rare and expensive cells, like induced pluripotent stem (iPSC) cell-derived cardiomyocytes or neurons. Data will be shown recorded on both the SyncroPatch 384/768 PE and the Patchliner platform, with which up to 8 cells can be recorded in parallel even in the current clamp mode.

Stacking the solutions inside a pipette and rapid application to the cell allows a fast and accurate solution exchange (<10ms) and exposure times (<200ms) utilizing the Patchliner platform. With that procedure, we could reliably activate even fast desensitizing receptors such as nAChRs, as well as the more slowly acting GABA<sub>A</sub>Rs, repetitively. To test, whether different temperatures affect PAMs of nAChRs, we used a heated pipette to increase the temperature of the added solution and then rapidly applied to the cell. Currents significantly decreased with increasing temperature, supporting the idea of the strong temperature dependence of allosteric modulation by PNU-102596 on nAChRs.

Taken together, the devices are extremely versatile allowing for fast external perfusion, internal perfusion and temperature control, supporting high quality recordings from a multitude of different voltage- and ligand gated ion channels, cell lines, primary cells and even organelles. Reduced cell usage, increased throughput and integration into robotic environments improve cost efficiency, preciseness and are speeding up the whole HTS process of drug development.

#### Automated Cytocentering™ Patch Clamp Recordings of Primary and iPSC-derived Cells Open New Paths in Basic and Applied Ion Channel Research

Thomas Knott<sup>1</sup>, Olaf Scheel<sup>1\*</sup>, Stefanie Frech<sup>1</sup>, Dirck Lassen<sup>1,2</sup>, Peter van Stiphout<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cytocentrics Bioscience GmbH, Joachim-Jungius-Str. 9, 18059 Rostock, Germany

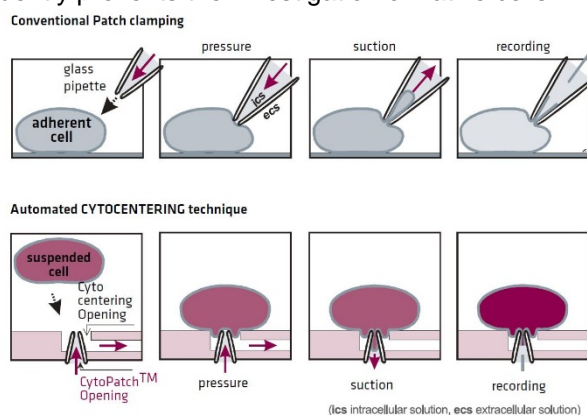
<sup>2</sup> Cytocentrics BV, High Tech Campus 9, 5656 AE Eindhoven, The Netherlands

\* Corresponding author. E-mail address: [o.scheel@cytocentrics.com](mailto:o.scheel@cytocentrics.com)

In recent years, automated patch clamp became a standard tool for drug discovery and safety pharmacology. Several high and medium throughput platforms offer seal and recording quality sufficient for generating routine results when using recombinant cell lines. However, when primary cells or induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cells are used, most available systems are stretched to their limits: low seal quality does not provide for a proper voltage clamp necessary to identify all relevant ion channels with a sufficient signal to noise ratio. Special non-physiological buffer compositions are often required to allow seal formation and stable whole-cell recordings. These may interfere with the channels'

regulation leading to non-physiological channel characteristics such as altered activation and inactivation kinetics or non-physiological shape and duration of action potentials. Moreover, most automated systems require a high cell amount, a fact that frequently prevents the investigation of native cells.

Contrary to previously deployed automated patch clamp platforms the Cytocentering™ method features a real patch pipette, which is surrounded by a second concentric Cytocentering™ channel and both are embedded in a microfluidic quartz covered chip. This unique design enables the emulation of the manual patch clamp process by sealing a cell at the tip of a pipette (resulting in stable gigaohm seals without fluoride containing intracellular buffer). Only 150 nl cell suspension is consumed during a single experiment. With its additional features such as the continuous bi-directional and fast perfusion system, intracellular perfusion, temperature control as well as the flexible and interactive AssayDesigner software, Cytocentering™ patch clamp offers flexibility and data quality, en par with manual patch clamp for research of primary cells or iPSC-derived cells.



We present current- and voltage-clamp recordings of freshly dissociated rat dorsal root ganglion neurons (DRG) and of human iPSC-derived cardiomyocytes (Cor.4U® by AxioGenesis and iCell® cells by CDI). Moreover, the Cytocentering™ channel can be used to apply mechanical force onto the patched cell to activate mechano-sensitive channels, as demonstrated by whole-cell voltage-clamp recordings of Piezo channels in Neuro2A cells.

The integration of a traditional glass pipette into a microfluidic chip has overcome the limitation of other automated patch clamp techniques and the benefits of an automated device were successfully combined with the quality and flexibility of conventional manual patch clamp.

#### 創薬研究におけるオートパッチクランプシステムの有用性およびデータ活用の将来像

エーザイ株式会社 グローバル CV 評価研究部, 茨城県つくば市光東台 5-1-3

吉永貴志

致死性の重篤な不整脈 (Torsades de points, TdP) を誘発したために市場から撤退した薬剤は数多く存在する。この事態を受け、2000年代にICH E14/S7Bガイドラインが制定された。QT延長リスク評価のための非臨床試験に関するS7BガイドラインでhERGチャネルに対する評価が求められていることもあり、今や創薬の現場ではhERGチャネルに対する評価は通常のスクリーニングとしてスタンダード化されている。

ところが、2013年の7月、米国で開催されたCSRC/HESI/FDAのジョイント会議で、心毒性評価に対して非常に大きなインパクトを与える提案がなされた。それはICHガイドラインのE14の廃止およびS7Bの改定を目指したパラダイムシフトの提案である。この背景には、臨床でTdPが減少しているという事実よりE14/S7Bガイドラインは成功を収めていることを前提として、臨床で排除すべき真のリスクはTdP等の不整脈でありQT延長そのものが本質的な問題ではないこと、hERG阻害活性だけで判断すると有望な化合物をふるい落とししてしまう可能性があることなどが理由である。このパラダイムシフト達成のために設定された活動項目としては、心筋細胞に存在する複数のイオンチャネル (マルチチャネル) に対する *in vitro* データを用いた *in silico* モデルの活用及びヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた評価系の活用である。

心筋細胞には多くのイオンチャネルやトランスポーターが存在しており、低分子化合物のターゲットになり得る主なイオンチャネルとしては、Naチャネル、Caチャネル、Kチャネル等が考えられる。*in silico* モデルを用いた催不整脈予測のためには、マルチチャネルに対する阻害活性情報が重要であり、その情報は信頼のおける質の高いデータに裏付けられていることが必須であることはいうまでもない。

我々は、臨床においてTdPが報告されている薬剤を含む10薬剤をピックアップし、6種類のイオンチャネル (Nav1.5, Cav1.2, hERG, KCNQ1/KCNE1, Kv4.3/KChIP2, Kir2.1) に対する作用を評価した。検討初期にはスクリーニングで使用している測定機器でデータを取得したが、吸着性の高い薬剤の阻害活性に対しては阻害曲線が大きく右シフトするなど妥当な結果が得られなかった。そこで、吸着性化合物の評価にも配慮したシステム構造、同一細胞に累積的に異なる濃度の化合物を添加可能、電流測定中でも電位固定が連続的に可能という特徴を有する自動パッチクランプシステム Sophion QPatch-HTX (Biolin Scientific) を用いて評価したところ、安定した質の高いデータを取得することができた。またそのデータを東京大学が開発した“心臓シミュレーター、UT-heart”にインプットすると、臨床でTdPを誘発した薬剤が *in silico* モデルでもTdPを誘発するという世界初の結果を得ることもできた。これは得られた *in vitro* データを最新の *in silico* 研究に応用し成功した例ではあるが、解決すべき課題も残されており、生理的条件を考慮した *in vitro* データとして、イオンチャネルの kinetics に対する評価や実験温度をコントロールするなど、自動パッチクランプシステムのさらなる進化が求められる。