团体标准

T/ZHCA xxx-2023

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| 基于iPSC-CMs心脏毒性体外评价试验The *in vitro* evaluation test for drug cardiotoxicity based on iPSC-CMs （征求意见稿） |

2022-xx-xx发布

2023-xx-xx实施

前  言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省食品药品检验研究院提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本文件起草单位：浙江省食品药品检验研究院、浙江大学转化医学院、杭州荣创生物科技有限公司。

本文件主要起草人：

**基于iPSC-CM心脏毒性体外评价试验**

1 范围

本文件规定了一种药物心脏毒性评价的体外测试方法。

本文件适用于采用人诱导多能干细胞衍生心肌细胞MEA实验评价药物心脏毒性。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人诱导多能干细胞衍生心肌细胞 iPSC-CM

人诱导多能干细胞（iPSC）来源的心肌细胞（iPSC-CM），表达心脏特异性因子和结构蛋白，具有天然心肌细胞的电生理、生化、收缩和跳动活性，可进行电信号分析，为体外药物筛选和毒性评价提供替代模型。

3.2

电生理检测 Electrophysiology tests

MEA系统来分析细胞反应的电信号。MEA可以检测到所有参与电生理反应的通道，而不是只有单个离子通道。所以能够被用来定义特定离子通道或者受体与药物互作所引起的的细胞整体特征性反应。iPSC衍生心肌细胞与MEA技术联用，是一种强大的药物筛选工具。通过分析急性的药物心脏反应对一系列电生理信号的影响。

4 试验原理

药物诱导的心脏复极失调导致QTc间期延长是发生尖端扭转型室性心动过速（TdP）快速性心律失常和SCD的重要危险因素，其中一种潜在的机制是通过阻断由hERG编码的心脏钾通道，通常称为 hERG通道。这种阻断可导致心脏复极延迟，心电图上显示QTc延长。iPSC-CM是探索抗精神病药物致心脏毒性作用机制的宝贵工具。以iPSC-CMs为模型，通过MEA进行电信号分析，可以评估测试化合物对场电位（FP）的影响以及 iPSC-CM 中心律失常样波形的发生。实验采集的数据为iPSC-CM群落整体的场电位变化，而不是单纯的某一个离子通道的变化正。根据检测到的场电位时程FPD（Field Potential Duration，模拟ECG的QT间期）结合心率数据进行校正得到FPDc（Field Potential Duration correction，模拟ECG的QTc间期）的变化，进行化合物的心脏安全性评价。

5 试剂和材料

5.1 细胞：人源性心肌细胞

5.2 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：Gibco；

5.3 胰酶（0.25%）：Gibco；

5.4 心肌细胞培养基(RPMI 1640+B27 supplement)：Gibco；

5.5 TrypLE Express Enzyme：Gibco；

5.6 DMEM/F12(1:1) basic(1x)：Gibco；

5.7 Matrigel：Corning；

5.8 1% w/v Tergazyme：Sigma；

5.9 离心管：Corning；

5.10 细胞培养板：Corning；

iPSC-CM 的培养所选用试剂与材料均为成熟的标准化产品，为实验室常用品牌，有利于减少因试剂或材料引起的误差。

6 仪器

6.1 倒置显微镜：具有拍摄功能；

6.2 二氧化碳培养箱：可进行细胞培养，230V，50/60Hz；

6.3 电子天平：分度值为0.1mg；

6.4 水平低速离心机：Vmax 14000 min-1；

6.5 移液器：量程包含100-1000μl、20-200μl、2-20μl；

6.6 生物安全柜：Supply Filter 18×48×4.2,Exhaust Filter 18×24×5.1；

6.7 MEA检测设备（Multi Channel System ,MCS）：MEA 2100；

6.8 计算机：能够运行Cardio2D、Cardio2D+、Prism软件。

1. 试验步骤

* 1. MEAs 准备

MEA电极板清洗：用1% Tergazyme 溶液浸泡过夜之前使用过的MEAs，MEAs用去离子水充分清洗三次。MEAs用去离子水孵育三次，每次30min，将MEAs放置于超净台中紫外1 h吹干消毒。

MEAs包被：MEAs中加入70%乙醇15min以灭菌，彻底清除乙醇后将MEAs转移至10 cm的培养皿中放置于超净台中紫外1 h，小心地在MEAs每孔中间电极区加10 μl用DMEM/F12稀释后的Matrigel，确保基质胶覆盖所有电极。将MEAs移入细胞培养箱，孵育至少1h。注意不要让基质胶变干。

* 1. 心肌细胞铺板

细胞培养基温浴至室温选取30-40天 iPSC-CMs，加入TrypLE Express Enyzme后放置于CO2培养箱中消化15 -20 min，加入终止液，用1 ml移液枪小心、轻柔地吹打贴壁的心肌细胞，将吹打好的细胞悬液转移至15 ml离心管中，常温、250 g条件下离心5 min ，用细胞培养基均匀重悬心肌细胞并进行计数，密度约为1x107活细胞/ml。

轻柔地移除MEAs中预铺的Matrigel吸取10μl细胞悬液（约100,000 cells/well）加入MEAs中，室温中静置5 min，然后将MEAs小心移入培养箱，待细胞贴壁，约1h左右，加入足够的培养基（1-well MEAs 每孔1 ml，6-well MEAs 每孔500 μl）（使用移液管，先沿着孔壁的外缘加入培养基，逐渐向孔的两侧添加培养基使其向中心均匀填充）

为了达到最佳的细胞状态，24h候进行一次换液，之后每两天换半液虽然一般可在24h内检测到细胞跳动，但建议待细胞最佳状态后(约6-10天)进行实验。

7.3 数据记录

MEA铺板后建议的MEA记录窗口期为8-12天。实验前24小时换液。确保每个孔中的培养基体积正确且一致，因为这会影响实验中最终的化合物浓度。

表1 验证化合物及相应药物测试浓度

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Compound | Ion Current Blocked | fETPC （μM） | Concentrations Tested （μM） | Vehicle |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Dofetilide | Antiarrhythmic/class III | 0.002 | 0.0003 | 0.001 | 0.003 | 0.01 | DMSO |
| Sotalol | Antiarrhythmic/class III | 15 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | water |
| E-4031 | Antiarrhythmic/class III | 0.0084 | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | water |
| Quinidine | Antiarrhythmic/class 1a | 3.24 | 1 | 3 | 10 | 30 | DMSO |
| Mexiletine | Antiarrhythmic/class 1b | 5.4 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | DMSO |
| Verapamil | Antiarrhythmic/ L-Ca2+ channel blocker | 0.045 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | DMSO |

1. 在DMSO中制备药物储存液（以最高目标浓度的1000倍制备），并用培养基连续10倍稀释（测试药物如表1）
2. 通过监测至少20分钟的基线信号，以确认信号波形、尖峰间隔（ISI）和FP持续时间（FPD）的稳定性和恒定性
3. 在FP 达到稳定状态后，进行给药操作（累积给药程序如表2）。每个浓度下记录20分钟（以实现药物平衡），最后显示稳定ISI和FPD 的1-2分钟内的记录用于分析统计。在测试化合物的最高浓度下，DMSO的浓度约为0.5-0.6%。

表2 MEAs 累积给药方案（参考Pluriomics Pluricyte® Cardiomyocyte product sheet.）MEA (500 μL/well) 化合物浓度以3倍递增

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Stock | Action | Action | Action | Action |
| 100 nM(start) | pipet 1.5 μl(300 pM final) | Record | pipet 3.5 μl(1 nM final) | Record |
| 1 μM | pipet 1 μl(3 nM final) | Record | pipet 3.5 μl(10 nM final) | Record |
| 10 μM | pipet 1 μl(30 nM final) | Record | pipet 3.5 μl(100 nM final) | Record |
| 100 μM | pipet 1 μl(300 nM final) | Record | pipet 3.5 μl(1 μM final) | Record |
| 1 mM | pipet 1 μl(3 μM final) | Record | pipet 3.5 μl(10 μM final) | Record |
| 10 mM | pipet 1 μl(30 μM final) | Record |  | Record |

7.4 数据分析

1. 观察实验中4个主要的参数(图2)：1）场电位幅度（FPA），2）场电位持续时间（FPD），3）搏动周期（ISI），4）心律失常发生（EAD或者TAs）
2. FP分析标准：FPA≥±200 μV ；T波幅度≥20 μV ；搏动周期（ISI）为750-1500ms（对应于40-80bpm/min）FPD为320-450ms
3. 使用Fridericia公式校正FPD (FPDcF= FPD/(ISI) 0.33)
4. 数据重复：每个浓度n=3-4

# 8 结果判定

8.1 数据判定

通过针对化合物对iPSC-CM的FPDc变化率进行分析，并结合阴性对照组DMSO的变化率，进行对实验结果的判定。若化合物在某一特定浓度下明改变了iPSC-CM的FPDc并具备统计学差异（p<0.05）则表明，该化合物在这一浓度下对心肌细胞存在致心率失常的风险。若化合物在所有浓度下均无明显改变FPDc的现象出现，并不具备统计学差异（p≥0.05）则表明，该化合物在体外iPSC-CM模型上不存在致心率失常的风险。

以显著性差异和FPDc的变化率作为判定试验组相对于空白对照组是否具有促进细胞迁移的作用的主要依据。

8.2 成立条件

观察实验中4个主要的参数，场电位幅度（FPA），场电位持续时间（FPD），搏动周期（ISI），心律失常发生（EAD或者TAs）。FP分析标准：FPA ≥±200 μV ；T波幅度≥20 μV ；搏动周期（ISI）为750-1500 ms（对应于40-80 bpm/min）FPD为320-450 ms。

8.3 结果报告

在所测试的化合物给定浓度区间内，如有发现某一浓度存在明显改变iPSC-CM的FPDc则表明该化合物存在致心率失常的风险

9 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

9.1 试验依据；

9.2 细胞名称、来源、培养代数；

9.3 样品和阳性对照的信息，包括厂家、性状、配制方法、浓度等；

9.4 试验条件和方法，包括试验具体步骤；

9.5 试验结果、结论；

9.6 试验日期；

9.7 试验人签字或单位签章。