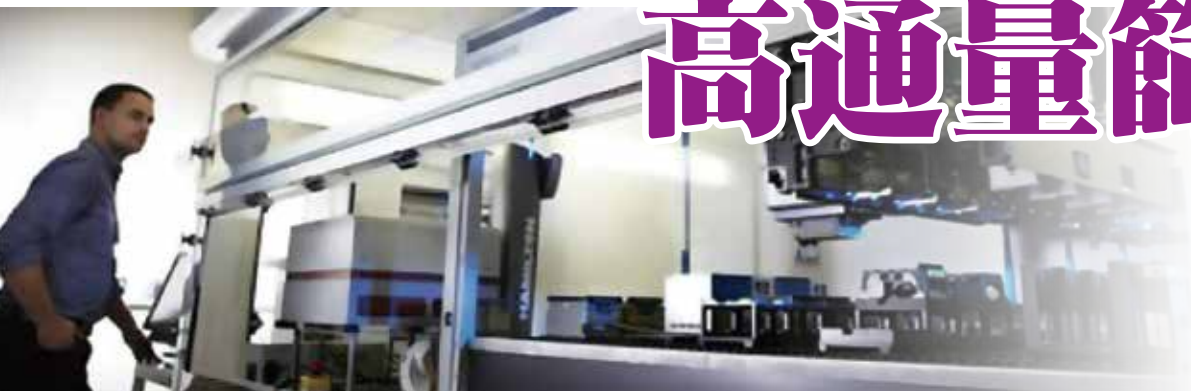


敲開近代新藥開發的大門 - 高通量篩選

撰文：陳廷祺

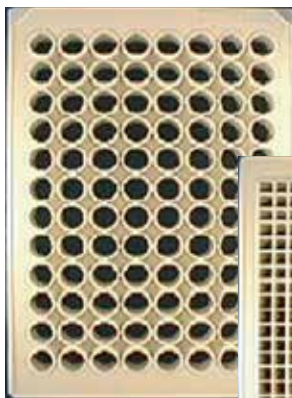


「羅馬不是一天造成的」用來形容一個新藥的誕生最適合不過。從實驗室到上市，整個研發過程長達十年以上，所耗費的經費也是「億來億去」。早期的藥物往往來自於意外發現，如青黴素的發現是因為科學家佛萊明的不愛乾淨。這樣的意外是天上掉下來的禮物，無法穩定地進行藥物發展。因此近代的新藥開發主要是從化學物樣品庫中評選，找出有效的先導藥物 (lead compound) 後進行最佳化改良與後續相關的研究與臨床測試。隨著組合化學的出現、天然藥物的自動化萃取技術進步，化合物樣品庫規模爆炸性地增加。從數量可達上百萬種的化合物樣品庫中找出針先導藥物更加耗時費力。為了加快新藥開發的時程，高通量篩選 (High throughput Screening) 的技術因應而生。所謂的高通量篩選技術是以分生或細胞實驗方法為基礎，微孔盤為載體，自動化系統操作，高靈敏快速判讀儀測量實驗數據，最後針對數據分析處理，達到大量快速篩選出有效先導藥物的目的。

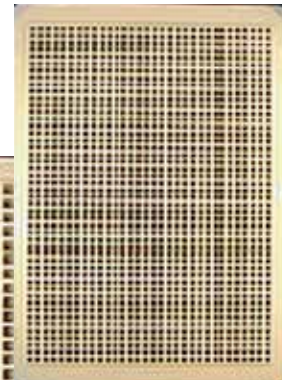
藥篩的第一步是先選擇標的物，這些標的物常常是與特定疾病相關。其中細胞表面受體，主要是 GPCRs，與酵素兩者佔整體標的物的 70% 以上 (J. Applied Pharmaceutical Science 01 (01); 2011: 02-10)。接著選擇篩選方法；實驗主要分兩種，一是非均相分析法 (heterogenous assay)，另一為均相分析法 (homogenous assay)。前者雖可以得到較好的精準度，但由於操作過程繁複，包含洗滌、離心等，所需的時間長且成本高；相比之下均相方法僅需要 1~2 個步驟，縮短實驗時間，具備一定的靈敏度，成本較低，所以大多藥廠或研究機構都採用這種方法。市面上已有許多套組化的均相方法，其使用的原理有偏極化螢光 (Fluorescence polarization)、延遲性螢光共振轉移 (TR-FRET) 與 ALPHA 技術等。偏極化螢光原理操作最簡易，但儀器要求較高；TR-FRET 提供穩定結果，單一標品測量結果的差異較小；ALPHA 技術有最好的靈敏度與判讀範圍。

由於候選化合物的種類大量增加，篩選時不僅考慮速度以縮短開發時程，更要考量開發成本的問題。孔盤的孔數越多，篩選速度越快；相對所需的體積量越少，成本費用也可以降低。因此在孔盤的密度上亦逐漸增加。最早使用 96 孔盤，每個孔的體積大約在 100 微升，每天大約可篩選 10000 種化合物樣品；之後提升到 384 孔盤，每孔體積減少到約 25 微升，每天大約可篩選 40000 種化合物樣品；更提升至 1536 孔盤，每孔體積僅需約 5 微升，每天大約可篩選 10000 種化合物樣品。近年來有文獻報告提到 3456 孔盤，每孔體積縮減到只剩 2.5 微升，大大提升篩選速度與降低成本。

▼ 96孔盤



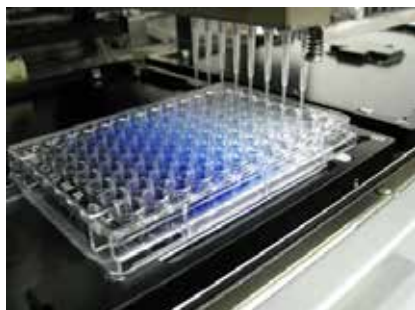
▼ 1536孔盤



▲ 384孔盤



在使用孔盤的密度越來越高的情形下，所使用的體積量越來越少，精準度要求也越顯重要。當樣品數量少的時候，尚可利用人力操作，但當樣品數量極多，同時長時間反覆的操作下，人力不僅無法負荷，亦容易產生誤差，因此自動化系統在高通量篩選扮演重要角色。採用自動分注器一方面提供穩定的分注體積精準度外，更可以減少操作人員本身的操作誤差或是長時間操作疲勞造成的問題。MS Technos 所生產的自動化分注系統 Multi Work 系列，分注體積可達奈升規格，CV 小於1%，適用於 96-1536 孔盤；HT Station 1200 結合疊盤機的一體化設計，除了適用 96-1536 孔盤外，最大疊盤數可達 100 盤，達到大量快速分注與體積精準的效果。



▲ Multi Work 508 小巧，適合小規模藥篩研究

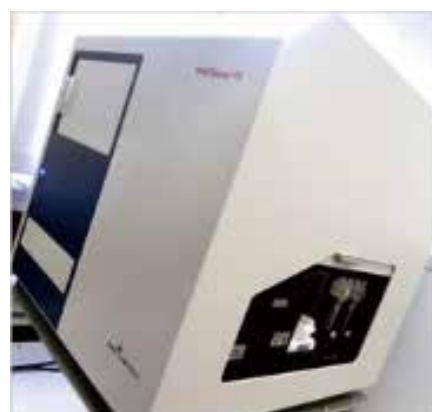


▲ HT1200 工作情形



▲ Multi Work 508 小巧，適合小規模藥篩研究

如果說引擎是汽車的心臟，那一台微量盤判讀儀就是高通量篩選的引擎。建立了分析方法與自動化系統，如果缺少一台高速高靈敏的微量盤判讀儀就像沒了渦輪引擎的波音747。一台優秀的判讀儀，首要的是可以適用 96-1536 孔盤，甚至於 3456 孔盤；第二是提供高速穩定的測量；第三是高靈敏的判讀。如何判定一個良好的分析方法？我們經常使用兩個參數：Delta F% 與 Z 因子。Delta F% 或稱為 assay window，主要是分析實驗方法的判讀濃度範圍，所以有越大的數值代表判讀範圍越大；Z 因子則是鑑定實驗方法的品質好壞。Delta F% 越大越好，Z 因子越接近 1 代表實驗方法的品質越好，所得到的數據越可信賴。這兩個參數不僅是與方法原理有關，所採用的判讀儀也是重要因素。BMG Labtech 的 PHERAstar FS 可適用 96-3456 孔盤，其內部光路徑採用無光纖設計，保留最大的訊號強度；最佳化濾鏡模組不僅提供高靈敏度，測量速度快，同時模組更換方便，操作十分簡單。是國外許多藥廠的藥篩或品管的首選機台。一般而言高通量實驗會採用白盤，主要是因為白盤可以提供加強訊號值，但會提高背景雜訊；而黑盤可以有效降低背景雜訊。PHERAstar FS 是唯一獲得知名高通量試劑廠商 Cisbio 使用 384 孔黑盤認證的機種。



▲ 安裝在高通量篩選工作列上的 PHERAstar FS

	PHERAstar FS	CCD Based HTS reader
Read times (1536)	53 sec	2:12 min
Assay Window	6:1	2:1
Delta F%	490	76
Z Value	0.70	0.24

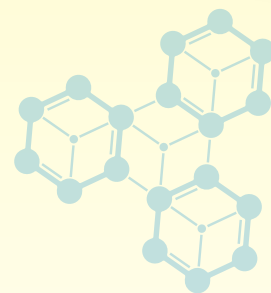
▲ PHERAstar FS 與 CCD 判讀儀比較



在經過一連串的實驗後，可以得到大量的藥效數據。緊接著就是以專業統計學的方式進行分析，找出具有效果的先導化合物(這裡我們稱為“hit-to-lead”)。篩選出來的先導化合物會進行最佳化，針對活性、細胞毒性、副作用等進行修飾改良，調整藥物療效與藥物代謝的特性。而後進入前臨床試驗的階段，此時高通量篩選在藥物篩選的任務也就功成身退。

英國伯明翰大學高通量篩選平台

高通量篩選的 **黃金機種** **PHERAsstar FS**



快速 · 靈敏 · 精準

偵測模式

- 吸收光、偏極化螢光
- 螢光 (含FERT、DLR)
- 冷光 (含BRET)
- TRF (含TR-FERT)
- AlphaScreen/AlphaLISA



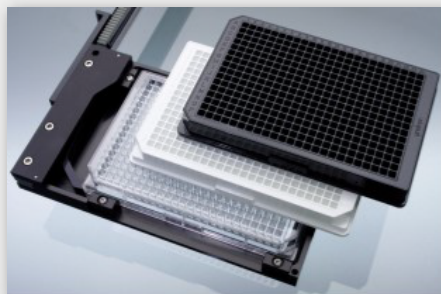
實驗專用光學模組

最佳化的濾鏡搭配，適用各種試劑套組



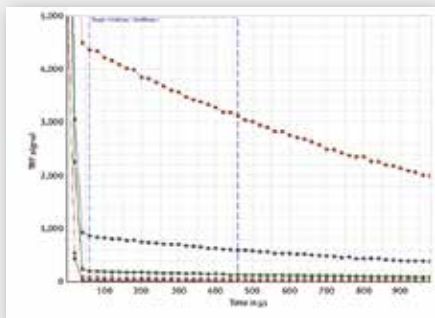
適用6-3456孔盤

適用各種孔盤，應用性廣



TRF螢光衰退曲線監測

針對延遲性螢光的獨特設計，
讓你輕鬆找到實驗條件



輕鬆自動化

疊盤機，機械手臂等
可與市面上的
自動化設備結合



如何快速達到高效能?

高通量細胞株篩選系統

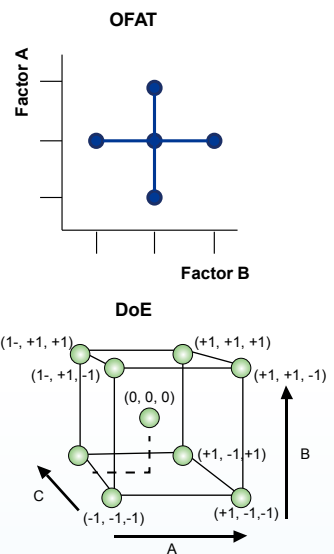
製藥業瞬息萬變，如何以最節省時間節省金錢的方式創造最大效益，永遠是最大課題

掌控細胞生產效能的三大因子：

細胞株挑選 ◆ 培養基最佳化 ◆ 產程調整

製藥業瞬息萬變，如何以最節省時間節省金錢的方式創造最大效益，永遠是最大課題。對抗體、蛋白質藥和相關生物製程而言，如何挑選出最穩定且產值最好的細胞株、調整培養基比例提升細胞數及產量、產程條件的調整等等，每個步驟的測試和比較便決定了未來生產效能與生產成本。經過篩選的組合越多，就越有機會找到最低成本高效能的生產方式。Shaking flask 及 spin tube 是目前常見的條件篩選工具，然而在時間和人力有限之下，實驗組數壓縮很容易成了權宜之計，進而導致未來生產效能受限。

同時節省時間、人力、成本的最好方法: 小體積高通量篩選。



產程條件篩選流程



96 孔深孔盤
(0.5 – 1.0 mL)



spin tube 離心管
(10 - 30 mL)



迷你發酵槽
(250ml-1L)



玻璃發酵槽
(3-7L)

條件數

產程資訊量

讓 Shaker 達到最好的細胞株篩選及培養基最佳化效益 - 96 孔深孔盤震盪培養系統

最常見而普遍的小體積高通量篩選就是實驗室的 96、24 及 6 孔盤，有低價、小體積培養等優點，但若沒有合適的配件，會面臨氣體交換效率差、每個well間蒸散效率不均、混合不完全甚至是互相汙染的問題。Micro-Flask 系統，給多孔盤一個特殊上蓋，讓多孔盤搖身一變成為 96、24 或 6 個低成本的生物反應器/發酵槽。