

出國報告（出國類別：實習）

美國密蘇里科技大學化學系研習腦神經核醫藥物設計與研製

服務機關：核能研究所

姓名職稱：張剛瑋 副工程師

派赴國家：美國

出國期間：102年11月4日~102年12月2日

報告日期：102年12月27日

摘 要

阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, AD) 是現今普遍好發於老年人口中的神經性退化疾病，據美國流行病學統計，目前全美罹患人數超過百萬人次。許多的研究均證明 AD 病患中老化的神經病變 (如老化斑塊 (senile plaques (SPs)) 與神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles (NFTs)) 均與癡呆現象息息相關。

目前臨床的診斷方式依然是沿襲上個世紀的神經心理學評量方與腦部神經病理學的染色方式進行鑑別。但是仍有許多的缺失，如：當依據評量檢測出罹患 AD 時，通常病患已發展至腦部神經病變已發生至嚴重階段，對於病患的治療已無功效，且此類評量對於腦部 $A\beta$ 的累積狀況並無法得知故對於病患並無明顯助益。針對 AD 的早期診斷技術開發，將可提升早期病徵之有效治療並提高治療藥物臨床試驗的效率。

新藥開發是生物科技工業中產值最龐大、獲利最豐厚、研發技術密集最具代表性的產業，但卻也是一個極為耗費人力、物力與財力的過程，本研究期許透過電腦分子模擬計算研究，利用虛擬藥物篩選計算搜尋新型的核醫藥物前驅物，以建立、發展新的藥物開發模式。

過去針對 $A\beta$ 蛋白斑塊的核醫分子影像示蹤劑均以染色劑結構修飾為主 (如 Thioflavin-S 類、Congo red 類)。此次公差將以電腦輔助藥物設計方式電腦輔助藥物設計是應用量子力學、分子力學、構效關係等基礎理論數據及模擬方法研究藥物對酵素、受體等的作用的藥效模型，針對蛋白質與活性化學分子之複合體的三維結構的交互作用力 (如：電子作用力、疏水作用力、氫鍵作用力、 $\pi - \pi$ 作用力) 篩選最適當之藥效基團的候選藥物，再進行後續的生物活性驗證。

目 次

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	4
三、心 得	6
三、建 議 事 項	24

圖 表 說 明

(頁碼)

圖一、出國人員行程、工作內容預算需求表	4
圖二、國外公差時期實際工作內容	5
圖三、電腦分子模擬計算可進行貢獻圖	9
圖四、電腦分子模擬於新藥開發之角色圖	10
圖五、電腦分子模擬於分子結構圖	11
圖六、電腦分子模擬分子軌域及鍵結圖	11
圖七、電腦分子模擬分析流程圖	12
圖八、電腦分子模擬 (Discovery Studio) 程式圖	14
圖九、分子模擬阿茲海默氏症異樣蛋白圖	14
圖十、分子模擬異樣蛋白可能結合區域圖	15
圖十一、利用網路設尋可能化合物結構式	15
圖十二、利用 DS 進行可能化合物之 Docking 比對	16
圖十三、體外培養細胞屏障示意圖	17
圖十四、體外細胞屏障進行藥物吸收試驗流程圖	18
圖十五、體外培養細胞屏障耗材圖	18
圖十六、利用 NACA 進行細胞 hCMEC/D3 細胞通透性	19
圖十七、電阻抗信號操作流程圖	20
圖十八、電阻抗信號所使用耗材示意圖	21

一、 目的

本次公差之目的，為建立藉由電腦虛擬藥物篩選 (in silico virtual screening) 取代過去經由實體的藥物篩選需要建構大規模的化合物資料庫，在電腦上進行模擬計算，將沒有設限的針對所有化合物作進行篩選，並對化合物可能的活性作出預測，從而達到藥物設計之目的，以降低藥物開發的成本。

電腦輔助藥物設計是應用量子力學、分子力學、構效關係等基礎理論數據及模擬方法研究藥物對酵素、受體等的作用的藥效模型。藉由電腦虛擬藥物篩選 (in silico virtual screening) 取代過去經由實體的藥物篩選需要建構大規模的化合物資料庫，在電腦上進行模擬計算，將沒有設限的針對所有化合物作進行篩選，並對化合物可能的活性作出預測，從而達到藥物設計之目的，以降低藥物開發的成本。

癡呆症已成為全球的醫學和衛生政策的主要挑戰。其中阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, AD) 是在新的世紀中癡呆神經退行性疾病中的最常見之癥狀 (Brendza et al., 2005, Lee et al., 2003, Nakamura S et al., 2001)。該疾病是由德國心理學醫師 Dr. Alzheimer 于 1906 年所發現與命名，臨床上造成記憶和認知功能的障礙，是屬於老年人之神經退行性腦部疾病 (Brendza et al., 2005; Kung et al., 2004; Lee et al., 2003)。

阿茲海默氏症廣泛的影響包括言語和非言語的腦部記憶空間體，造成語言和語義知識的認知障礙、行為功能和空間能力障礙，目前臨床神經心理學也藉評量與問卷評估是否罹患該疾病 (Nakamura S et al., 2001)。但此功能性的障礙，是導致於何種細胞病理學、基因缺陷抑或是環境影響，目前研究尚不清楚 (Kung MP et al., 2002)。

阿茲海默氏症是一個漸進式神經退行性障礙疾病，導致漸進性的失憶和認知功能衰退，其病理特徵為彌漫性 A β 蛋白 (澱粉樣蛋白, β -amyloid) 之退化性神經斑塊 (Senile plaque, SPs) 與過度磷酸化之 tau 蛋白 (hyperphosphorylated tau protein) 導致的神經纖維糾結 (Neurofibrillary tangles, NFTs) (Kung MP et al., 2004A, Kung MP et al., 2004B, Kulkarni PV et al., 2005)。其中

A β 之生成原因是因爲體內 APP (A β precursor protein) 蛋白酶退化，導致 β -切割酶 (β -secretase) 和 γ -切割酶 (γ -secretase) 改變 APP 分解代謝反應，導致過多的 A β 蛋白的產生 (Routtenberg A., 1997)。而過多的 A β 蛋白，導致許多正常與不正常的機制，可能是造成神經退行性之起始點 (Routtenberg A., 1997)。

阿茲海默氏症歸屬於老年癡呆症之中，爲美國的最常見老人疾病，主要影響 80 歲以上的老人 (罹患率約 40 - 60%) (Routtenberg A., 1997, Ye L et al., 2006)。美國於 1990 年的流行病學統計顯示，約有 400 多萬美國人罹患 AD，在目前上對此疾病無治療方法下，預估於 2040 年將會增加至少五倍以上 (Kulkarni et al., 2005, Lockhart A., 2006, Nakamura S et al., 2001)。老化人口影響下，全球約有 2 千六百萬人次與 5 百多萬的美國人口的罹患率。於亞洲的流行病學統計，在亞洲人口比例快速增加情況下意味著於 20 年後，亞洲地區 AD 病患族群的大小將成爲全球最大的族群。也因此相對需要更多的醫療照顧用在此疾病上。於臺灣地區，老年人的比例已增至迅速從 7.03 % (1993 年) 增至 10.4 % (2006 年)，此增加比例屬於全球增加最多族群中之一員。據估計台灣地區二千三百萬居民中約有 14 萬人罹患阿茲海默氏症，而到 2050 年將會增加至二十萬人次。

在醫療水準增進的時代下，老年人口年齡的提高，也導致將來需要花費更多的經濟和社會價值於治療或照顧阿茲海默氏症病患身上 (Kung HF et al., 2003)。無論是患者之家庭成員和病患照料人員都直接面對患者認知功能無法恢復的漸進性退化。據統計每年針對 AD 患者護理部分的直接和間接照料費用即接近 1000 億美元 (Kung HF et al., 2003)。

新藥開發是生物科技工業中產值最龐大、獲利最豐厚、研發技術密集最具代表性的產業，但卻也是一個極爲耗費人力、物力與財力的過程，如此耗時及高成本的發展方法，無疑無法滿足未來市場對新藥的鉅大需求，因此藥物開發研究者無不致力發展新的藥物開發模式。

電腦硬體發展的突破配合電腦軟體的研發，近年來電腦模擬已經被廣泛地

運用在各個領域，且有相當不錯的成果，電腦虛擬藥物篩選(*in silico* virtual screening)因此也成為開發先導化合物中非常重要的一環。由於實體的藥物篩選需要建構大規模的化合物資料庫，提取或培養大量實驗所需要的靶酶或靶細胞，並且需要複雜的設備來取得這些數據，所以，進行實體的藥物篩選需要投入巨額的資金。相反地，電腦虛擬藥物篩選是將藥物篩選的過程在電腦上進行模擬計算，針對幾乎沒有範圍限制的化合物作篩選，並對化合物可能的活性作出預測，進而對比較有可能成為藥物的化合物進行有目標性的實體篩選及執行體外 (*in vitro*) 試驗，結合理論計算與實驗驗證於新藥開發上的新策略，將可以大幅地降低藥物開發的成本。

二、 過程

(一)行程：公差主要行程與內容如下表

核能研究所出國人員行程、工作內容預算需求表

姓名	張剛璋		出國期間	自 102 年 11 月 04 日 至 102 年 12 月 02 日 計 29 天		預算 來源	20-01						
出國 事由	赴美國密蘇里科技大學化學系所進行腦神經核醫藥物設計與研製研究實習					預算 金額	新台幣 175,728 元						
行 程			公差地點		工 作 內 容	預算需求 (幣別：美金)					備 考		
月	日	星期	地 點 出 發 抵 達		國 名	地 名		生活費	交通費	公費	其他	合計	
11	04	一	台北	洛杉磯	美國	密蘇里州	去程	US 190×0.4 x2				US 152	
11	05	二	洛杉磯 達拉斯	達拉斯 聖路易	美國	密蘇里州	去程	US 190				US 190	
11	06-18	三~一	密蘇里州	密蘇里州	美國	密蘇里州	腦神經核醫藥物設計 與研製研究實習	US 190×12				US 2280	
11	19-30	二~日	密蘇里州	密蘇里州	美國	密蘇里州	腦神經核醫藥物設計 與研製研究實習	US 1,100 ×(12/30)				US 440	
12	01-02	一~二	密蘇里州	洛杉磯	美國	加州	回程	US 1,100×(2 /30)×0.4				US 29.33	
											Sevis 申 請經費	US180	
											綜合補 助費	US 150	請參見 說明 4
											保險費	NT 588	
											美國簽 證費	NT 5,500	
											總計	NT 175,728	請參見 說明 5

圖一、出國人員行程、工作內容預算需求表

(二) 公差歷程：

1. 11 月 04 日(週一)至 11 月 05 日(週二)：由台北→洛杉磯→達拉斯→聖路易。
2. 11 月 06 日(週三)至 11 月 30 日：美國密蘇里科技大學化學系，腦神經核

醫藥物設計與研製研究實習。

3. 12月01日(週一)至12月02日(週二)-行程，由聖路易→洛杉磯→台北。

(三) 實際工作內容：

1. 綠色部分：分子模擬(十天)，紅色部分：實驗室(七天)，藍色部分：假日(十天)。

日	一	二	三	四	五	六
	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30

圖二、國外公差時期實際工作內容

三、心得

(一) 簡介分子模擬技術 (Introduction Molecular-Dynamics Simulation Technique)

1. 原理課程

分子動力學 (MD) 模擬是計算一個經典的多體系統的平衡和輸運性質的技術。這個詞的古典意味的組成粒子 (如原子或偽原子) 的運動服從經典力學 (如 $\dot{r}_x \ i = v_i$, $\ddot{r}_x \ i = a_i$) 的法律。這是一個合理的, 往往優秀的近似範圍廣泛的系統和性能。在這種情況下, 每一個現象, 每一個屬性可以追溯到成分顆粒, 因為感興趣的系統是由原子構成的。儘管各種各樣的現象和性質, 所有的負責組分粒子具有與貢獻不超過它們的質量更, 坐標和速度。換句話說, 明確鏈接系統 (原子質量, 坐標和速度) 的原子尺度的細節和現實利益 (如溫度, 壓力, 輸運係數, 狀態方程) 和數學, 定量表述的宏觀性能之間存在這些鏈接都屬於統計力學的領域。從使用模型系統和計算機算法的原子坐標和速度的產生和利用代表一個相對較新的研究方法通常被稱為分子模擬。

分子動力學是一個重大的分子模擬技術。其基本思想是數值積分經典力學運動方程為在一個模型系統中每一個粒子。直接的結果是坐標以及所有可移動的粒子的速度在許多時刻, 或者在同一個樂團等同許多微觀。因此, MD 之間的橋樑, 並補充了理論和實驗方法。這是特殊的價值時, 多體系統太複雜, 由第一原則或分析研究時的條件是實驗研究太難了。在一般情況下, 醫師已被應用, 以確定分子起源, 檢驗假設, 估計丟失或不可靠的數據, 並表徵的因素和參數的相對重要性。

由於模擬算法和計算機電源繼續增長, 分子動力學正在成為一個更加強大和日益重要的工具, 用於工程和科學研究。相平衡的簡單分子 (氫氣) 的第一個直接模擬是略高於十年前進行的。如今, 相態的計算工程重要性的多組分混合物不再是令人驚訝的, 固體的相變模擬的壓力和溫度極端條件下是可行的現在, 對潤滑油的 engine-like 條件下的流變響應的研究也越來越普遍, 和大的聚合物分子的結構和熱力學性質可以是可靠地從模擬來確定。分子模擬在最近幾年取得了

巨大的進步，並逐漸成爲在科學和工程的許多領域一個無處不在的工具。這部分是由於計算機的不斷增加的速度，也許到一個較大的程度上，用於模擬複雜的流體和材料的新方法的發展。化學工程師一直負責許多分子模擬的發展和應用。以這個角度來看，這一領域的地位簡要回顧，以及一些持有作未來發展的最大承諾的範疇。的分子模擬通常由計算機實現在實際的分子構型是用來提取結構，熱力學和動力學信息制度。術語“配置”表示對所有構成一個系統的原子或分子的一組笛卡爾坐標的。此信息的質量在很大程度上依賴於可用於隨後的分析不相關的配置的數量。在分子模擬的心臟騙來生成它們的方法。在分子動力學，牛頓運動方程進行整合，以產生一軌跡爲感興趣的系統。在蒙特卡洛方法，通過統計力學支配的概率分佈函數進行採樣，以產生不同的配置。

本文側重於模擬的古典力場描述的系統，並指出，激烈的研究領域是關注的橋接經典和量子描述之間的差距，甚至在量子 and 宏觀模型。它也集中在蒙特卡羅（MC）方法，而不是分子動力學（MD）方法，MC 方法並不像廣泛使用的工程社區醫師，但持有或許是最大的潛在影響。

經典 MD 方法是相對穩健和一般。這些特性導致了商業和公共領域的軟件 MD 模擬的廣泛普及。這些計算遵循一個系統的自然動態，以及由此產生的軌跡一般持續幾十納秒，不幸的是，對工程重要性的液體或材料，許多有趣的現象發生在更長的時間尺度。氣體通過聚合物的玻璃擴散係數是 10^{-13} 平方厘米/秒，順序這意味著，平均而言，在一納秒長的模擬氣體分子將只能行駛的埃 - 太小的一小部分上距離產生任何有意義的統計信息。雖然一些“加速”技術已被提出，在過去數年，許多數量級必須橋接之前，醫師可以用來研究微或毫秒的進程。蒙特卡羅方法通常依賴於接受/拒絕的算法。從初始配置開始，提出了（例如，通過執行關於它們的原始位置的原子中的隨機位移）的系統的隨機擾動。按“接受”只有部分所產生的隨機配置，可以構建那些根據能量，溫度，以及其他相關的熱力學變量的定義良好的函數分佈的合奏（這些功能是由統計力學的支配）。蒙特卡羅方法不具有 MD 的多用途的吸引力，趨於系統特定的。MC 算法變化很大，取決於所關心的系統上，並且它們不適合用於并時間依賴性過程的研究。這

些技術的目的是在平衡採樣系統的代表微觀（快照或配置）；宏觀性質被發現的微觀量測過的快照合奏的平均值。在一般情況下，MC 是一樣有效的採樣這樣的微觀 1 的能力。取樣配置空間的挑戰是最好的“蛋白質折疊”的問題，其中一個算法必須以某種方式能夠識別折疊狀態的數量有限出無數的配置例子。

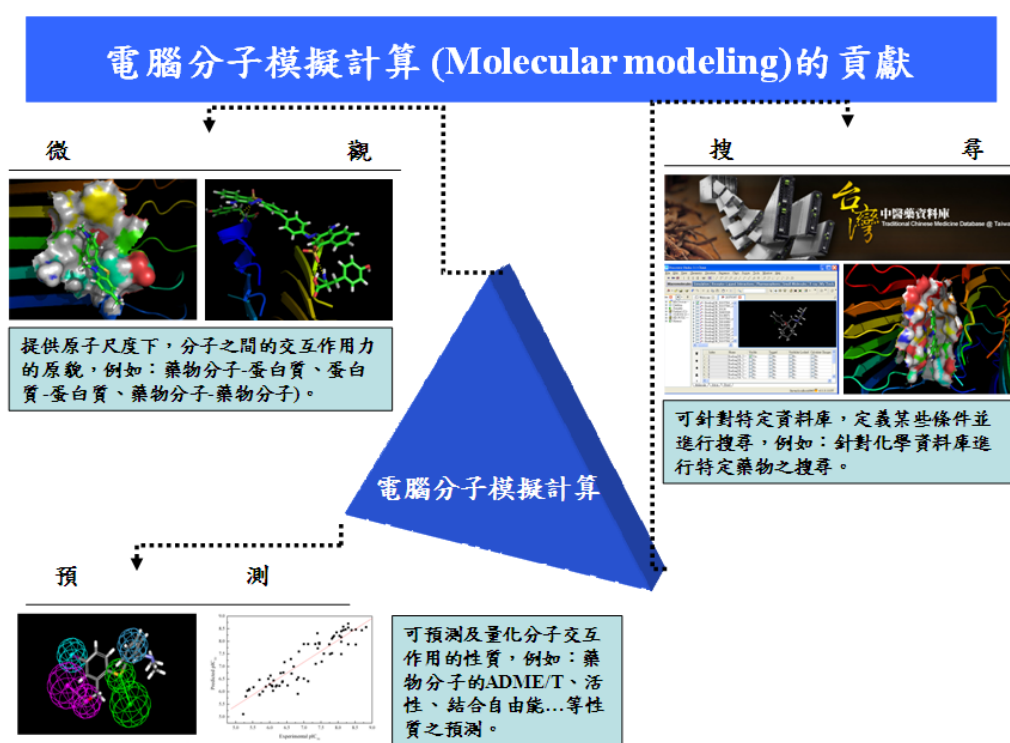
未來分子模擬功效（Where do we go from here）？

正如流體力學，其中分析理論已經由能夠描述更爲複雜的情況的數值解已經逐漸超越，類似的趨勢是發生在統計力學，其中數值解（即分子模擬方法）正逐漸成爲首選技術描述 everincreasing 現實和複雜的系統。發現驅動的，而不是數據驅動，模擬可能有改進或新技術的發展影響最大。分子模擬未來應用的挑戰，作爲一個“偽實驗”數據生成器或搜索工具，在於開發能夠處理日益增加的複雜性和系統的尺寸更複雜的算法。在此背景下，量身定做，智能 MC 方法看起來比全功能的 MD 技術更有前途。僅在十年前，它會一直難以預期，相平衡複雜的，多組分混合物，可以準確地從模擬預測。這樣的計算仍然是苛刻的，但他們不再認爲是與眾不同的。曾經被認爲是一種新的預測相行爲方式已經成爲模擬一個更傳統的應用程序。

在化學工程，分子模擬，將有可能影響到傳統領域和新興領域。的確，正如之前所討論的，分子模擬可以在生物分子工程日益增長的字段和在納米科學和技術，其中設備尺寸巧合成爲與那些適合於仿真相稱發揮重要的作用。化學工程師歷來分子轉換的業務。科學和工程給了我們前所未有的能力來操縱小的結構，甚至單個分子。這種能力將帶來新的機遇和新的問題。分子模擬有得天獨厚的優勢，以幫助回答這些問題，並幫助指導新穎，分子尺度過程的設計。準確的力場將仍然是必要的，並且在某些情況下（例如，在化學反應的研究），這將是必要借助描述的量子力學的水平。但計算方法，現在似乎是牽強可能很快成爲模擬的日常應用。

在真正的宏觀系統的研究，不同的挑戰在於開發“多尺度”的方法，可以

集成能夠描述一個系統在很寬範圍的長度和時間尺度。我們已經看到在固體和非牛頓流體的多尺度建模的重要進展。隨著不斷的進步，其中一些方法將成為商業軟件的標準，執業工程師最終將能夠使用這些對未來的化工過程的開發，設計和操作。



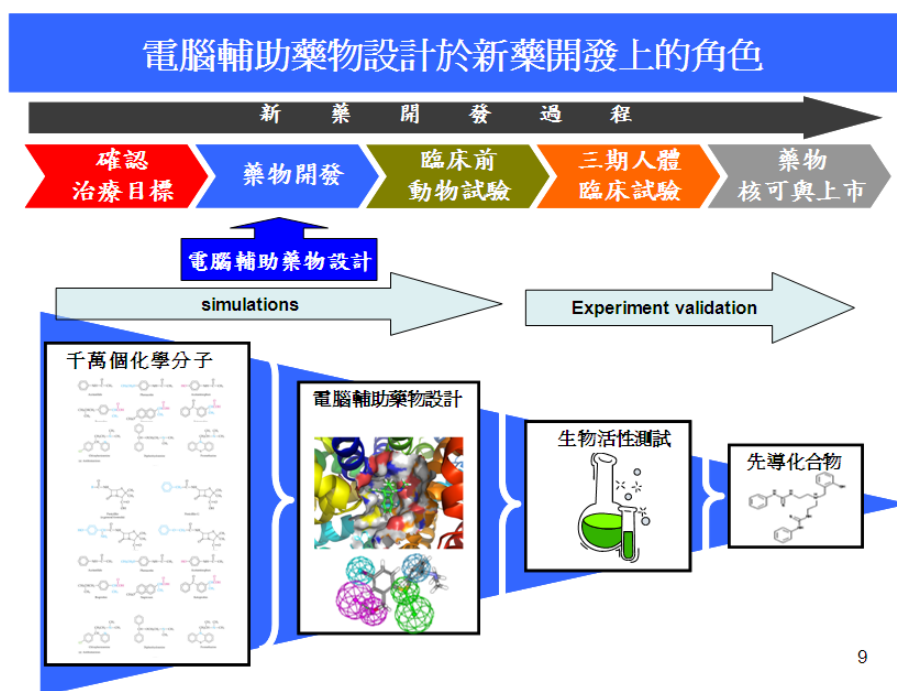
圖三、電腦分子模擬計算可進行貢獻圖

2. 使用功能

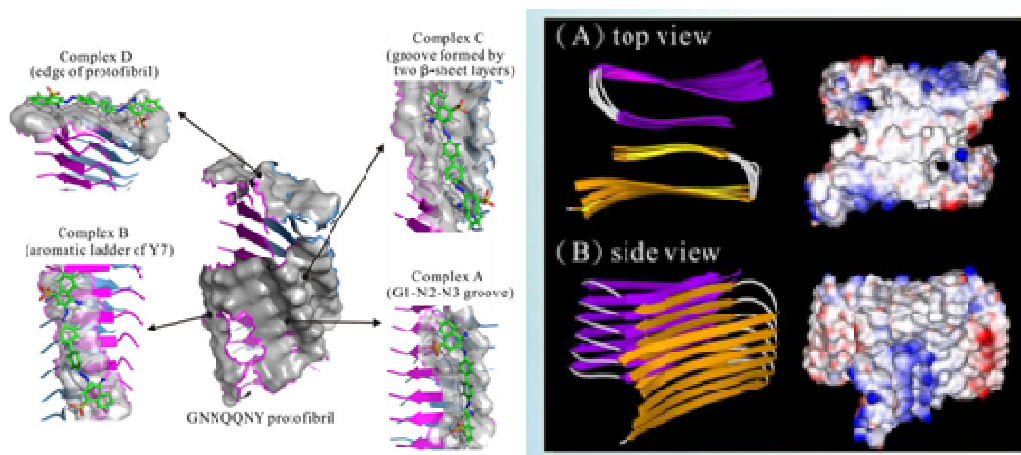
電腦輔助藥物設計是應用量子力學、分子動力學、構效關係等基礎理論數據研究藥物對酶、受體等的作用的藥效模型，從而達到藥物設計之目的。

傳統上，大量合成或萃取出化合物(或利用組合化學的方法)，然後再進行生物試驗，這是土法煉鋼、亂槍打鳥的方法，因此成功率低。但利用電腦模擬計算的方式，在程序上事先利用電腦硬體發展的突破配合電腦軟體的研發，近年來電腦模擬已經被廣泛地運用在各個領域，且有相當不錯的成果，電腦虛擬藥物篩選(in silico virtual screening)因此也成為開發先導化合物中非常重要的一

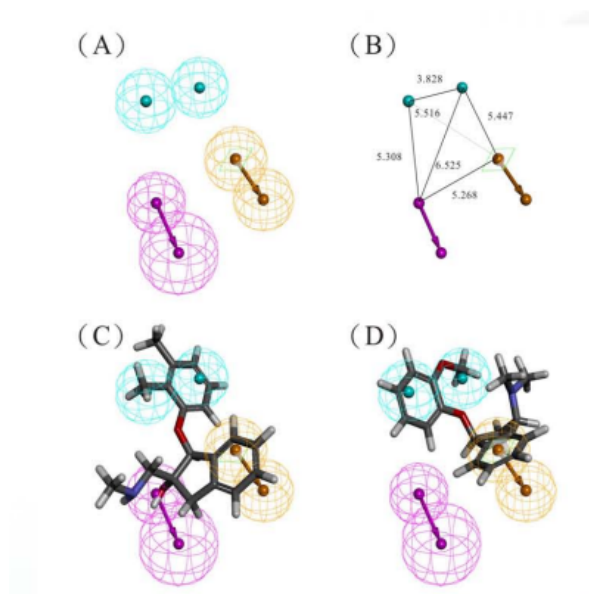
環。由於實體的藥物篩選需要建構大規模的化合物資料庫，提取或培養大量實驗所需要的靶酶或靶細胞，並且需要複雜的設備來取得這些數據，所以，進行實體的藥物篩選需要投入巨額的資金。相反地，電腦虛擬藥物篩選是將藥物篩選的過程在電腦上進行模擬計算，針對幾乎沒有範圍限制的化合物作篩選，並對化合物可能的活性作出預測，進而對比較有可能成為藥物的化合物進行有目標性的實體篩選及執行體外（in vitro）試驗，結合理論計算與實驗驗證於新藥開發上的新策略，將可以大幅地降低藥物開發的成本。



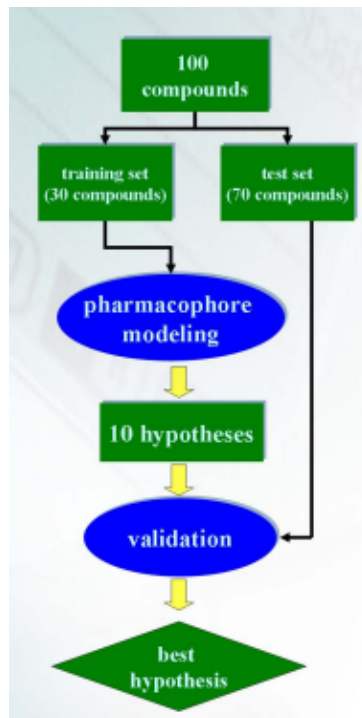
圖四、電腦分子模擬於新藥開發之角色圖



圖五、電腦分子模擬於分子結構圖



圖六、電腦分子模擬分子軌域及鍵結圖



圖七、電腦分子模擬分析流程圖

3. 國內利用電腦輔助藥物設計開發新藥的案例

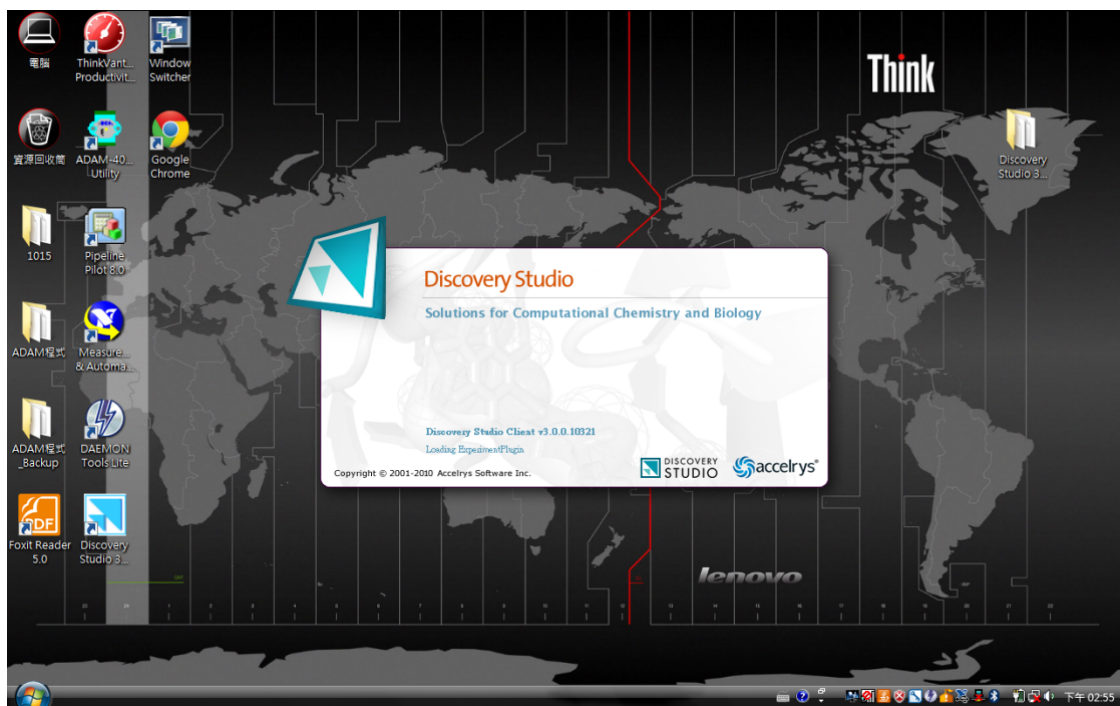
「零流感」是應用於流行性感冒治療的神經胺酸酵素抑制劑，此藥物來自中央研究院基因體研究中心的授權。它是一種環己烯磷酸鹽的化合物，分子結構與羅氏藥廠的「克流感」近似。零流感將克流感化學結構內的羧酸基團 (carboxyl) 以磷酸基團 (phosphonate) 取代，在體外實驗中，能有效抑制 H1N1 及 H5N1 流感病毒。為一個利用以蛋白質結構為基礎之藥物設計的成功案例。

(二) 軟體分析 (Discovery Studio, 3.0 版)

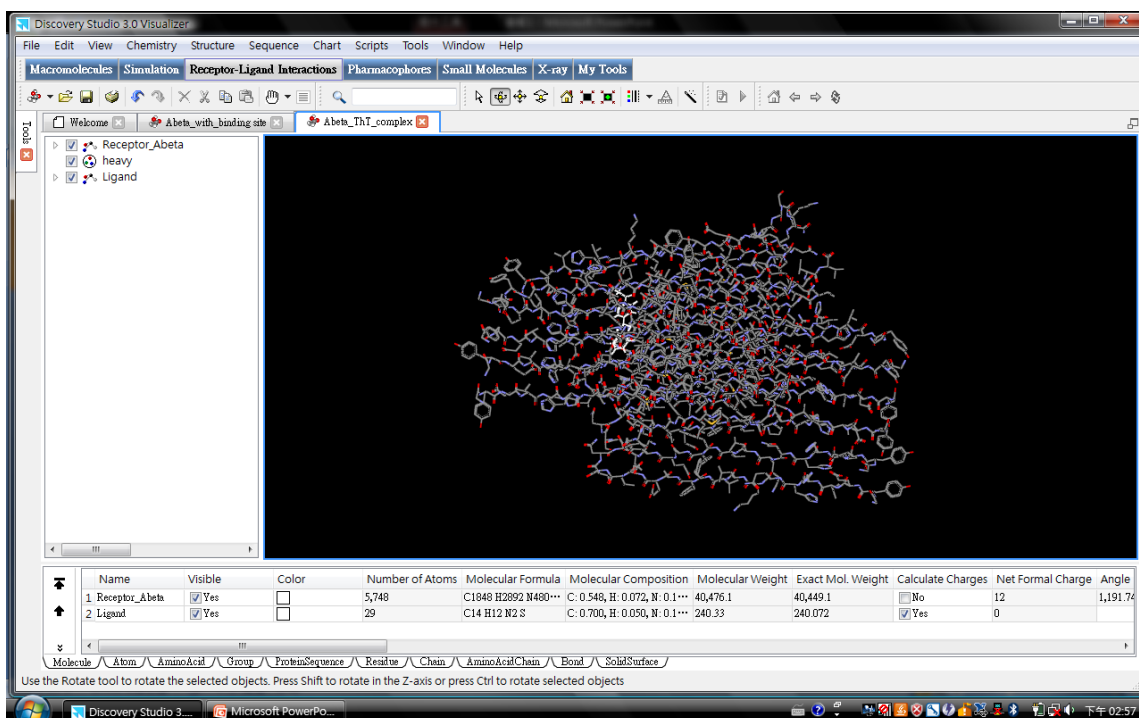
1. 軟體介紹

Discovery Studio(DS)為美商 Accelrys 公司針對生命科學領域，所開發的專業性研究軟體。DS 可讀取多種不同格式之檔案，並具客製化之功能，DS 使用介面提供使用者明瞭、易懂的操作環境，加速生命科學領域研究之發展。其功能包含：

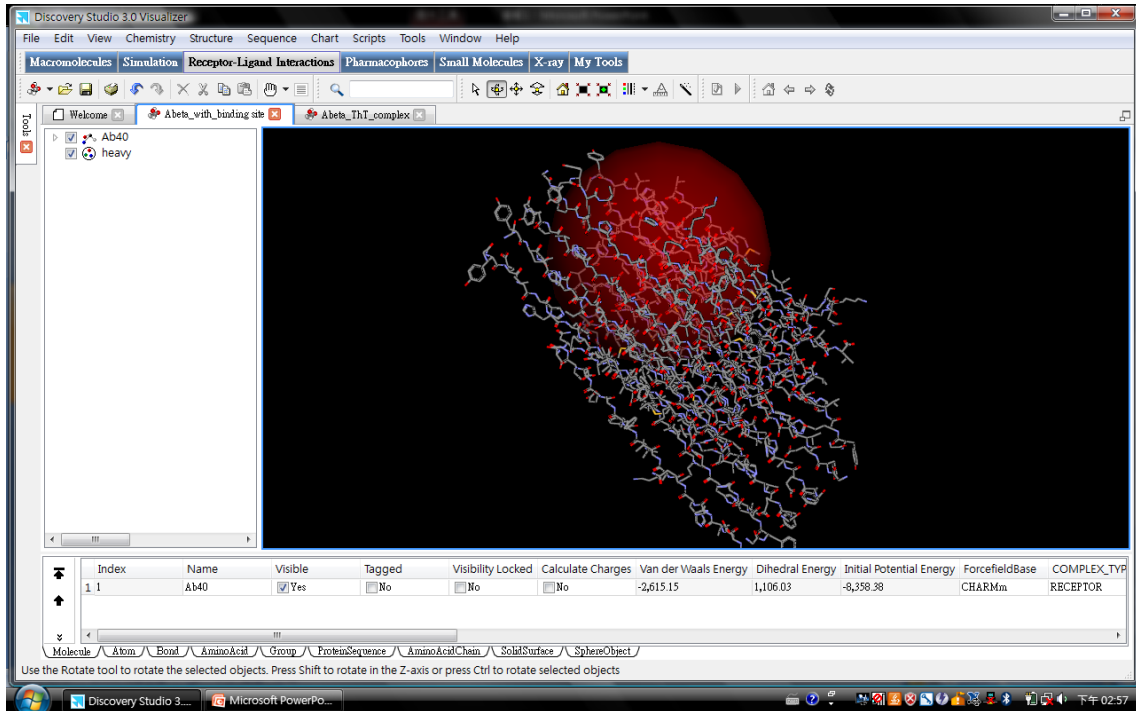
- (1) 比較蛋白質間之序列，並根據序列的相似程度，推測蛋白質之功能。
- (2) 建構和修改核酸、蛋白質以及多胜肽之結構，可計算分子表面之靜電力場和溶媒能。
- (3) 根據同源蛋白質之 3D 結構，自動、快速地進行目標蛋白質結構之建模。
- (4) 藉由同源蛋白之序列與結構訊息，了解目標蛋白質之功能與分類，並進一步製做樹狀圖，進行物種演化之分析。
- (5) 透過 CHARMM 進行古典力學與分子動力學之計算，研究大、小分子的能量與變化性。CHARMM 可與 DS 之其它模組搭配，完成各種模擬計算，例如：蛋白質、小藥物對接程式 CDOCKER。
- (6) 利用小片段資料庫，配合蛋白質結構資訊，設計新的藥物或對已存在之藥物進行結構改造，篩選出具有潛力之藥物小分子後再進行合成。
- (7) 可將小藥物分子與受體的活性口袋進行對接，了解對接位向。搭配小分子資料庫與平行化計算技術，可進行藥物結合可能性之高速篩選 (Virtual High-Throughput Screening)。
- (8) 預測小藥物分子的吸收、分佈、代謝路徑、分泌以及毒性。
- (9) 預測蛋白和蛋白結合位向。



圖八、電腦分子模擬 (Discovery Studio) 程式圖




圖九、DS 模擬阿茲海默氏症異樣蛋白圖



圖十、DS 模擬異樣蛋白可能結合區域圖

The screenshot shows the ZINC 12 website homepage. The page features a navigation menu with options like 'About', 'Search', 'Subsets', 'Help', and 'Social'. A search bar is located at the top right. The main content area includes a 'Molecule of the Hour' section with a chemical structure and a 'Quick Links' section with various search options. The footer includes contact information and a thank you message to NIGMS.

圖十一、利用網路設尋可能化合物結構式

Dock Ligands (CDOCKER) 	
Parameter Name	Parameter Value
Input Receptor	Abeta_with_binding site:Ab40m2_1_t4_Num116
Input Ligands	C:\For Wilson\work-INNER\130819_電腦分子模擬計算之操作SOP\交接資料\d...
Input Site Sphere	-16.95, 0.687659, -5.25573, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Top Hits	50
Pose Cluster Radius	
<input checked="" type="checkbox"/> Random Conformations	10
Dynamics Steps	1000
Dynamics Target Temperature	1000
Include Electrostatic Intera...	True
<input checked="" type="checkbox"/> Orientations to Refine	10
Maximum Bad Orientations	800
Orientation vdW Energy T...	300
<input checked="" type="checkbox"/> Simulated Annealing	True
Heating Steps	2000
Heating Target Temperature	700
Cooling Steps	5000
Cooling Target Temperature	300
<input checked="" type="checkbox"/> Advanced	
Forcefield	CHARMm
Use Full Potential	False
Grid Extension	8.0
Ligand Partial Charge Method	CFF
Random Number Seed	314159
Final Minimization	Full Potential
Final Minimization Gradi...	0
<input checked="" type="checkbox"/> Parallel Processing	True
Batch Size	25
<input checked="" type="checkbox"/> Server	localhost
Processes	2
Preserve Order	True

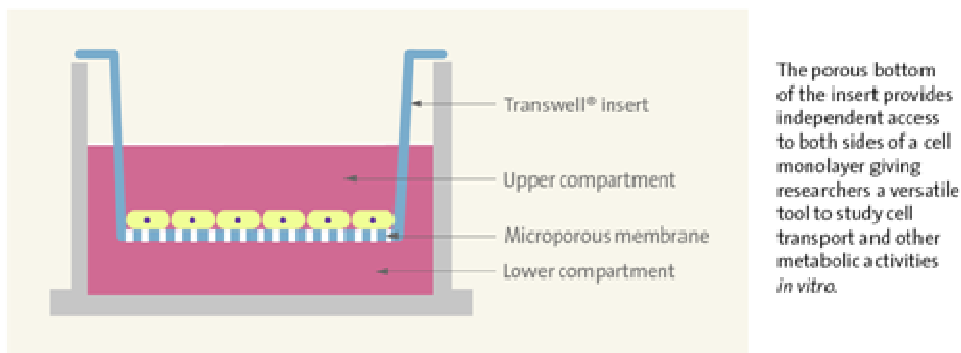
圖十二、利用 DS 進行可能化合物之 Docking 比對

(三) 腦中樞通透性試驗 (BBB permeability study)

1. 原理

將細胞 A 種於上部，細胞 B 種於下部，可以研究細胞 B 分泌或代謝產生的物質對細胞 A 的影響。其作用方式為飼養底層的一張有通透性的膜，而飼養方式其餘部分的材料與普通的孔板是一樣。這層膜帶有微孔，孔徑大小有 0.1–12.0 μm ，根據不同需要可用不同材料，一般常用的是聚碳酸酯膜 (polycarbonate membrane)。為了有效地發揮其功能，需要一個穩定的內環境，這一內環境穩定性的維持依賴於內層細胞層作為屏障。

以視網膜動物實驗為例，在動物體內許多實驗已經得出血視網膜內屏障中，視網膜 Müller 膠質細胞 (RMGC) 與 RMEC 之間存在多種形態和功能學上的聯系，但這些因素受到動物個體差異、種群差異及其它神經組織的影響，於是就需要建立一種簡化的內層血視網膜屏障 (iBRB) 的體外模型。我們採用原代培養的 RMGC 與 RMEC 建立體外 iBRB 模型，並研究 RMGC 對於屏障的作用。



圖十三、體外培養細胞屏障示意圖

Drug Absorption Assay Protocols

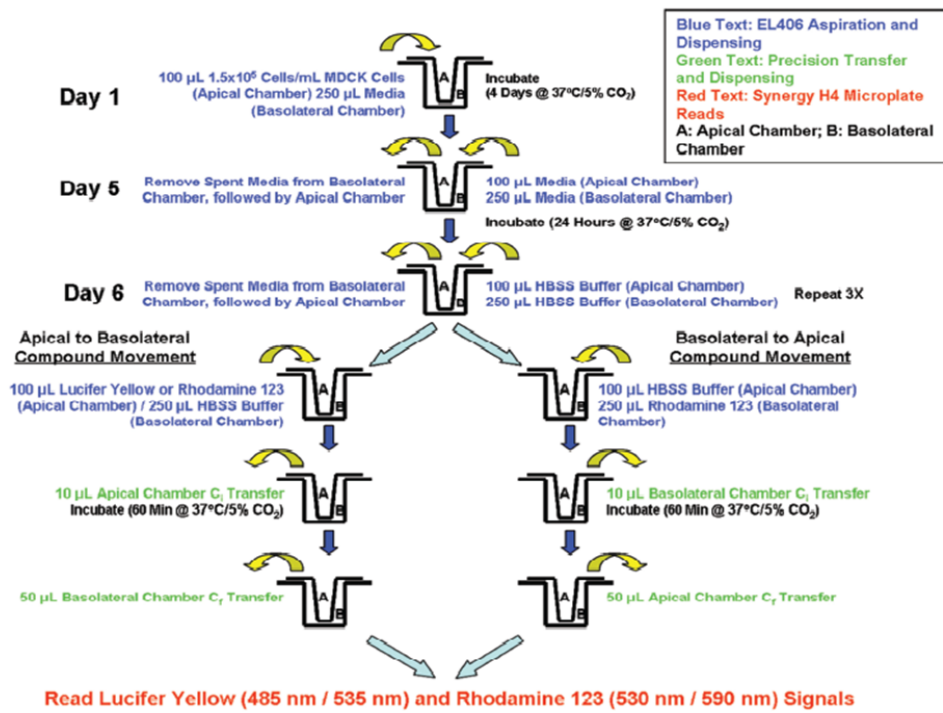
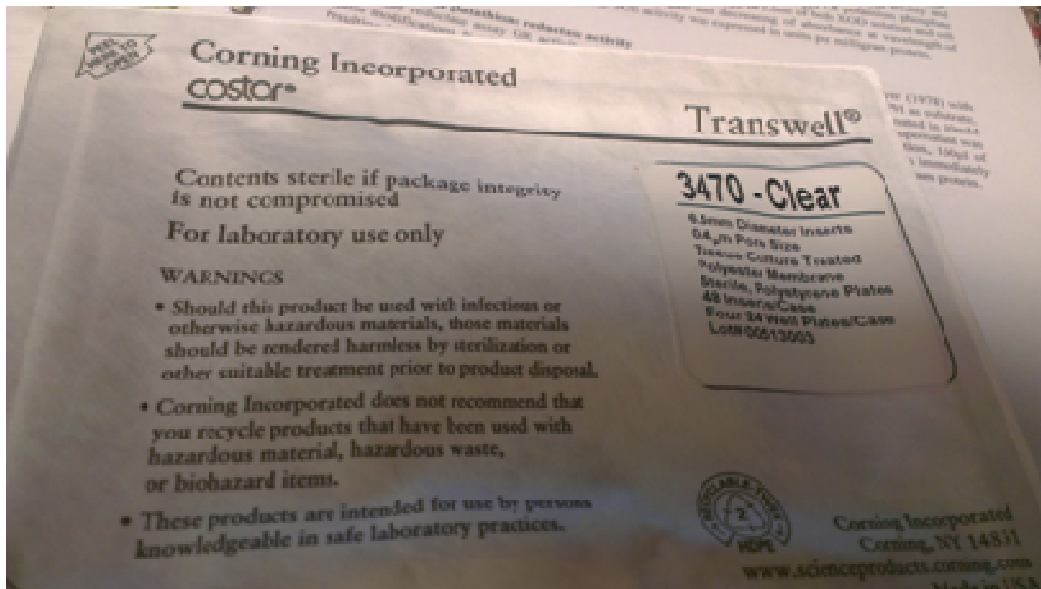
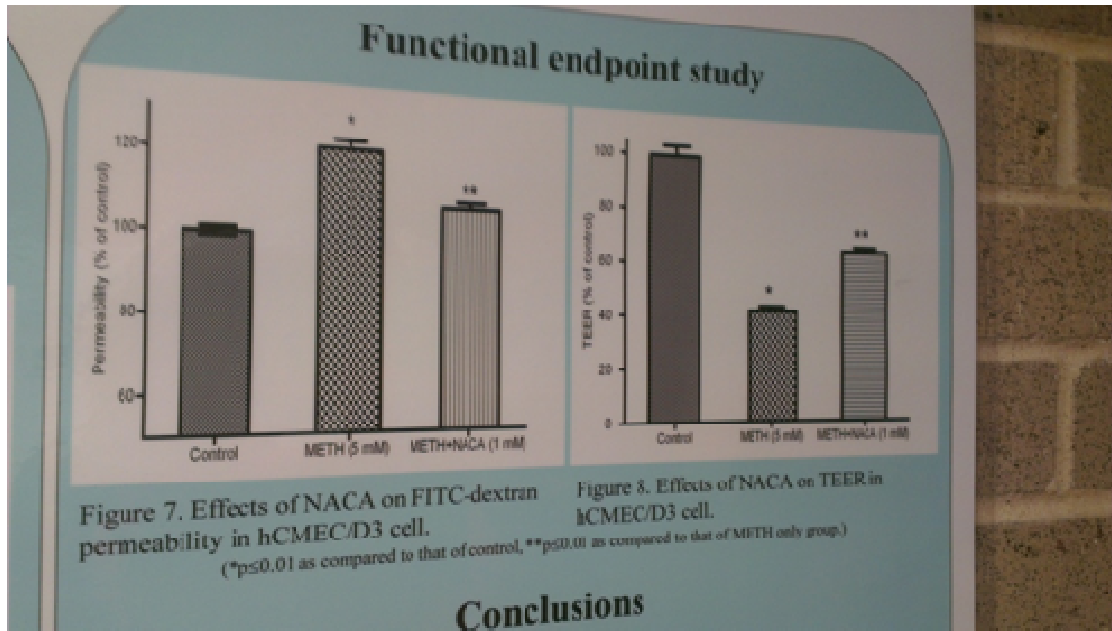


Figure 1 – MDCK Cell Preparation and Assay Protocol.

圖十四、體外細胞屏障進行藥物吸收試驗流程圖



圖十五、體外培養細胞屏障耗材圖



圖十六、利用 NACA 進行細胞 hCMEC/D3 細胞通透性

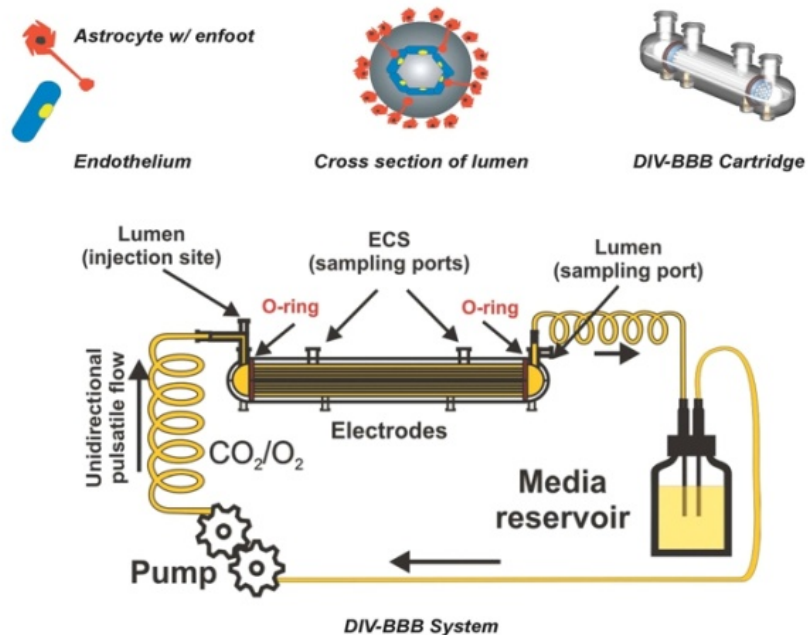
(四) 電阻抗信號 (Electrical Impedance Singal) 測量

1. 原理：

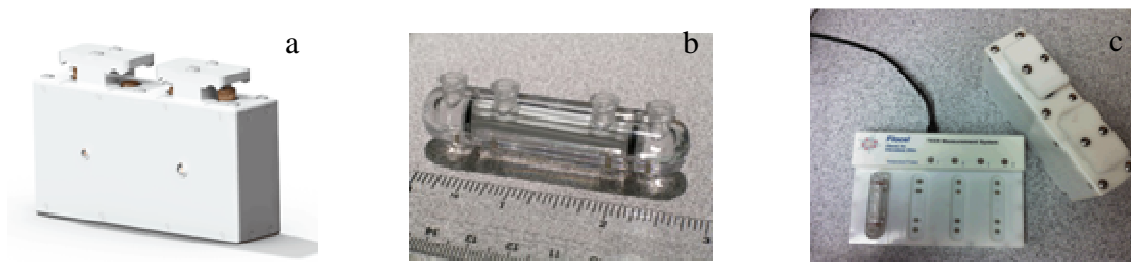
電阻抗信號 (Electrical Impedance Signal) 的量測，對於臨床醫學與生物醫學的研究室一向非常有用的工具。其量測之原理是基於生物組織既有的電器特性或頻率響應 (Frequency Response)，以間接定量或觀測各物種間特徵行為的差異性。因而使得電阻分析技術 (Electrical Impedance Analysis, EIA) 成為現今生物響應監測的一種有效方法。

此一生物電阻抗特性 (Bio-Impedance Characteristic) 係藉由物種間，不同的電器特性與量測技術 (阻抗、導納、相角與頻率響應) 所獲取的特性響應，以定性或定量化生物物種的特徵行為。

現今，電阻抗分析技術已廣泛的應用於各項研究與應用中，如藥品開發、細胞計數、血容比的量測、毒品檢測、細胞培養與環境的監測上。同時許多不同的電阻抗分析技術或微小電極陣列的應用，已提供一個相當簡易的分析介面，對於不同生物樣本電活性或電阻抗特性的監測。



圖十七、電阻抗信號操作流程圖



圖十八、電阻抗信號所使用耗材示意圖，a. in vitro cell culture cartridges，
b. computer-controlled perfusion system，c. trans-endothelial electrical
resistance (TEER) measurement module

2. 實驗方法：

使用人腦血管周細胞與人類星形細胞依不同比例與人腦微血管內皮細胞共培養，並利用周細胞條件化培養基及星形細胞條件化培養基共培養建立出生體外人類血腦屏障(blood-brain barrier, BBB)模型。

研究發現當人腦血管周細胞與人類星形細胞比例為 1: 2，並利用周細胞與星形細胞條件化培養基比例為 1: 1 與人腦微血管內皮細胞共培養 7 天後 transendothelial electrical resistance (TEER)值提高為 $319 \pm 16.67 \Omega \times \text{cm}^2$ 、propidium iodide 穿透率下降為單層培養之 39%，且 P-醣蛋白活性與人腦血管周細胞與人類星形細胞比例為 1: 1 及 1: 6 的培養模型相較之下提高 84%與 104%，使得體外模型更近似生體內血腦屏障。

(五) 本所進行電腦模擬之優缺點分析

SWOT 分析	
優勢(Strength)	劣勢(Weakness)
<p>1. 本所擁有國內衛生署GMP/cGMP核醫製藥認證。國內放射藥理實驗室及micro-PET/CT、micro-SPECT /CT、Autoradiograph等核心設施。</p> <p>2. 醫用放射性同位素核醫藥物生產及影像物理儀器技術，專業人員素質優良。</p> <p>3. 新穎示蹤劑將以電腦模擬方式進行篩選，較於過去染色劑修飾結構方式，將得到更優秀之產品。</p> <p>4. 核研所已開發成功腦多巴胺轉運體造影劑鎳-99m-TRODAT-1，並進行腦多巴胺D2/D3 受體造影劑碘-123-IBZM、及腦血清素轉運體造影劑碘-123-ADAM之研製，而國外尚無法同時研製與應用這三種神經造影劑來探究腦中樞神經病變。</p> <p>5. 國內醫界運用核研所研製的神經造影劑來進行腦中樞神經病變之人體臨床研究已奠定良好基礎，居國際領先優勢。</p>	<p>1. 國內相關研究經費與資源有限，橫向整合不易，較不利於研發。</p> <p>2. 國外針對阿茲海默氏症核醫藥物已有多家廠家製作，且已核准上市，將不利於本計劃未來藥物之推動。</p>
機會(Opportunity)	威脅(Threat)
<p>1. 全球約 1,500 萬名阿茲海默氏症病患將造成保險資源與社會極大負擔，亟需開發精確診療技術。</p>	<p>1. 國際放射藥物大廠新產品開發能力強、資源充足，對國內核醫製藥競爭壓力大。部份診斷用核醫藥物可能面臨超</p>

<p>2. 新穎之示蹤劑將設計為具備高親和力以期達到早期診斷之功效。</p> <p>3. 國內目前針對腦中樞核醫藥物尚無全本土化之成果，將有助於國內核醫藥物之產業開拓與經濟價值成果。</p>	<p>音波等非核醫方法競爭。</p> <p>2. 腦中樞神經造影劑之臨床研究國外已急起直追，國內若不加強整合，領先優勢很快就會喪失。</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------

四、建議事項

(一) 模擬系統的整合：

所內在研發核醫藥物的過程中，多為參考國外文獻或經由已知的前驅物修飾而成。但分子模擬程式的進步，將可跳脫過去的框架，創新找尋新穎的專一性標的藥物。雖說，分子模擬的正確性是否足夠仍待商榷。但經由體外以至於體內的初步試驗，將可作為篩選的依據，應可相對減少『亂槍打鳥』的作法。以 MST 大學為例，模擬缺乏實驗數據、實驗缺乏理論根據，都造成其期望進一步與核研所建立合作研究等。目前已將初步篩選之藥物，進行『專有程式』的分子比對，以期更能加速研發速度提前完成相關研發。

該校也期望進一步與核研所建立合作研究、技術、人才交流及人員訓練…等，核研所宜早日規劃相關研發合作議題，進一步進行相關合作之討論。以便減少傳統大量合成或萃取出化合物(或利用組合化學的方法)，然後再進行生物試驗，而更改為電腦模擬計算的方式，以減少進行實體的藥物篩選需要投入巨額的資金。

電腦硬體發展的突破配合電腦軟體的研發，近年來電腦模擬已經被廣泛地運用在各個領域，且有相當不錯的成果，電腦虛擬藥物篩選(*in silico* virtual screening)因此也成為開發先導化合物中非常重要的一環。電腦虛擬藥物篩選是將藥物篩選的過程在電腦上進行模擬計算，針對幾乎沒有範圍限制的化合物作篩選，並對化合物可能的活性作出預測，進而對比較有可能成為藥物的化合物進行有目標性的實體篩選及執行體外 (*in vitro*) 試驗，結合理論計算與實驗驗證於新藥開發上的新策略，將可以大幅提高藥物開發的成功率，並降低藥物開發的成本。

(二) 人員資產的養成：

化工之領域需要電機、物理、數學的專有人才，目前同位素組所擁有的人才大多為：生物、化學等，在進行分子模擬上，尚有不足。與國外學者的經驗交換與共同合作，是可以增進此項缺失，但如何建立組內專有人才，這需要特別的考量。所以人員的培育工作應針對特定工作的需要，進行人才的廣增。在國外的研究機構，其資金與規模是國內所無法比擬的，也正由於此國內較多的研發人員均為碩士資歷，在問題的解決與新知的搜尋較國外是明顯不足的，所以培育人才成為所內的資產是所內所必須進行投資的工作，再此趟國外參訪的過程中，與國外學者的經驗交換與實驗細節的討論，這是所內人士一向缺乏的經驗。

其實在國內也有許多的學者在不同的領域上也有其可學習的部分，如腦中樞神經方面：腦中風動物模式、巴金森氏症動物模式、憂鬱症動物模式的建立，在國內均有學者專精於此。所以人員的培育工作，可以針對工作的需要，由所內

與國內外的學者取得該次的合作管道，將一些經驗與技術帶回所內，除了人員的能力增長外，也擴充了所內技術的累積進一步增加所內的國際競爭力。

系統部分，無論所內或國內均有管道可供利用，故於硬體設施而言，以此軟體分析硬體設備將不成問題。

（三）核能研究所優勢：

所內目前無論在硬體設備或是經費的寬裕程度，在國際與國內的研究機關而言均是充足且足夠的。所以唯有善用自己的優勢並針對缺乏的部分進行補足，才是所內每位研發人員須有的態度與眼光。相較於國外，國內的研究風氣是略居下風，可是相差並不像想像中的多，所以肯定自己的作為一定是往前邁進的方向。

所內目前無論診斷用核醫藥物的研發：腦中樞神經藥物的開發與體內腫瘤位置的判斷，均會遭遇到人體實際的差異性，此時運用電腦模擬的方式可初步進行，如腫瘤的原生位置與動物的差異、腦中樞神經系統的整體拮抗作用，均是可減少利用實際動物試驗。未來，將模擬出的化合物與動物實驗結合，並進一步產生新穎藥物，相信對於醫個核醫藥物的研發不至於推廣至臨床才發覺不足之處，必定有所助益。

（四）世界趨勢：

國際阿茲海默氏症在診斷方面，全球積極開發新法並全力探究相關病理基礎，國內開發相關核醫分子影像藥物，宜注意世界發展趨勢，尋求最新之核醫藥劑，以免落入選藥不慎，浪費人力物力，最終放棄的厄運，新核醫藥物之選擇，宜全方面了解國際現況及需求，同時了解相關競爭現況，審慎考量相關投資效益，選擇最優之藥物並與國際及國內合作之方式進行，確實做有效研發，加速上市時程，以求銷售利基，希望不久將來能找到一個標誌效率高又可以運送較遠距離之核醫藥物，以滿足全世界各個角落之需求。

影像醫學將來在醫藥研發應用上的重要性，核能研究所應利用此機會積極開發國際合作，整合國內資源，以提供核醫影像藥物，協助國內醫療研究單位進行相關核醫分子影像研究。