Chem. Listy *111*, 772–776 (2017) Referát

COMPOUND MANAGEMENT – SPRÁVA KNIHOVEN CHEMICKÝCH LÁTEK PRO TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY S VYSOKOU PROPUSTNOSTÍ

MARTIN POPR, DAVID SEDLÁK a PETR BARTŮNĚK

CZ-OPENSCREEN, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
bartunek@img.cas.cz

Došlo 4.8.17, přijato 2.10.17.

Klíčová slova: správa knihoven chemických látek, testování biologické aktivity, laboratorní automatizace, reformátování, chemická biologie, příprava vzorků, skladování vzorků, DMSO

Obsah

1. Úvod
2. Základní cíle a principy správy sloučenin
3. Typické pracovní postupy
4. Využití automatizace
   4.1. Automatizovaná zařízení pro skladování vzorků
   4.2. Automatizované stanice pro přenos kapalin
5. Zajištění a kontrola kvality
   5.1. Zajištění kvality procesů
   5.2. Kontrola kvality vzorků
6. Využití cheminformatických nástrojů ve správě sloučenin
7. Závěr

1. Úvod

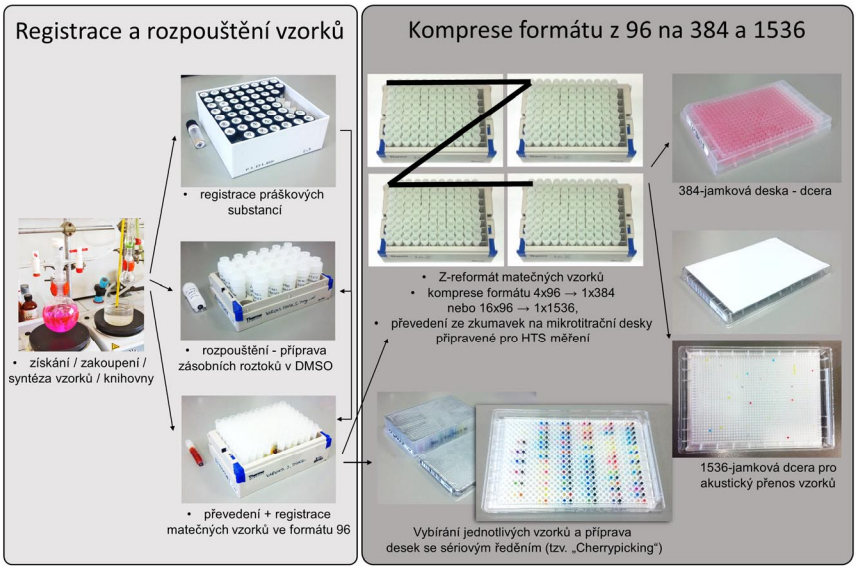
Správa knihoven chemických vzorků (CM – Compound Management) pro účely testování na biologickou aktivitu s vysokou propustností (HTS – High Throughput Screening) je mezioborovou vědeckou disciplínou, která se vyvinula v průběhu posledních dvaceti let[1]. Hlavní motivací pro vznik a rozvoj CM byla rostoucí potřeba subjektů zabývajících se vývojem nových léčiv (primárně farmaceutické a biotechnologické společnosti) efektivně spravovat rychle se rozrůstající sbírky vzorků chemických látek. Běžné kolekce malých organických molekul pro HTS čítají od desítek tisíc po několik milionů vzorků, a proto bylo nutné zavést účinné postupy pro jejich skladování, nakládání s nimi, jejich kontrolu kvality a správu celkové logistiky těchto souborů chemických substancí. Expanzi množství dostupných látek pro biologické testování umožnily především přístupy výpočetní a kombinatoriální chemie[2]. Stěžejními nástroji CM jsou v dnešní době laboratorní robotické systémy, které umožňují bezobslužné zpracování tisíců vzorků denně, a pokročilé cheminformatické nástroje sloužící pro organizaci a nakládání s inventárními daty.

2. Základní cíle a principy správy sloučenin

Základním všeobecným principem CM je zajištění dostupnosti správného vzorku v požadovaném formátu a konkrétním čase pro umožnění provedení biologického nebo biochemického experimentu[3]. Tento požadavek je nutné zajistit v rozsahu několika málo vzorků až po několik milionů, s důrazem na maximální možnou přesnost, správnost a reprodukovatelnost. Dalším z prioritních cílů CM je zajištění a monitorování integrity všech vzorků v kolekci a přijetí opatření pro dosažení maximální stability látek v čase. Jelikož univerzálním rozpouštědlem pro chemické knihovny je dimethylsulfoxid (DMSO), a to zejména díky vysoké rozpouštěcí schopnosti pro většinu malých organických molekul, jsou jedním z hlavních problémů ohrožujících integritu sbírky sloučenin jeho hygroskopické vlastnosti[4]. Neméně důležitým pilířem CM je nutnost vypořádat se se správou dynamické sbírky látek. Počet vzorků zpravidla narůstá v průběhu času, ale stejně tak dochází k jejich spotřebovávání. Z hlediska logistiky a udržení kompaktní knihovny látek bez nežádoucí fragmentace bývá dosažení tohoto cíle vcelku náročné. Dalším významným požadavkem je udržování dostupnosti a integrity inventárních dat. Dosažení tohoto cíle bývá zajištěno používáním laboratorního informatického systému pro správu dat (LIMS – Laboratory Information Management System). LIMS standardně využívá databázových funkcí pro skladování a přístup ke všem potřebným datům týkajících se vzorků a materiálů[5].

3. Typické pracovní postupy

Pracovní postupy v CM jsou navrženy s ohledem na minimalizování pravděpodobnosti vzniku chyb a nepřesností. Typický pracovní postup pro HTS měření začíná obdržením vzorků a končí připravenými mikrotitračními deskami ve formátu 384 nebo 1536 jamek (obr. 1). První krok tzv. „workflow“ CM spočívá v obdržení vzorků nebo celých knihoven vzorků, což může být realizováno zakoupením od komerčního dodavatele, vlastní syntézou, nebo získáním formou služby / spolupráce. Vzorky musí být dodány s jednoznačně identifikovatelným označením a kompletními průvodními daty, jako jsou jméno vzorku, dodavatel, navážka, strukturní vzorec / molekulová hmotnost, atd. Dalším krokem je registrace vzorků do LIMS, jejich rozpuštění v DMSO (zpravidla v 10 mM koncentraci) a převedení do matečných zkumavek, umístěných ve stojánku formátu 96 a označených unikátním 2D Data-



Obr. 1. **Schématické znázornění typického pracovního postupu CM pro registraci a rozpouštění vzorků a následné převedení na mikrotitrační destičky využívané v samotném HTS experimentu**

Matrix (ISO/IEC 16022:2006) kódem. Zbytky práškových substancí jsou převedeny do skleněných vialek, označených taktéž čárovým kódem, a zaregistrovány do LIMS.

Další fází typického pracovního postupu CM je transfer rozpuštěných látek z mateřských zkumavek na cílové – dceřiné mikrotitrační destičky (ARP – assay-ready plates), které jsou později využity v HTS experimentu pro přenos chemických látek na destičky, na kterých probíhá samotné biologické stanovení (AP – assay plates) (obr. 1). Tento proces bývá běžně označován jako reformátování a cílem je komprese formátu z 96 na 384 nebo 1536. Dceřiné destičky se opět označují pomocí čárového kódu, běžně se připravují v několika kopiích a typicky obsahují pouze malé objemy vzorků (4–25 µl) na jamku. Díky tomu lze ARP využívat jako spotřební materiál, kdy se po spotřebování nebo opotřebení nahradí další kopií v sérii. Organizace inventárních dat v LIMS společně s unikátním způsobem označování všech vzorků a destiček zaručuje zaznamenání kompletní historie a přesnou lokalizaci v jakémkoliv čase.

Pro následné experimenty (tzv. „hit validation") je zapotřebí vytvořit dedikované destičky s vybranými vzorky, které v primárním screeningu vykazovaly určitou aktivitu. Tento proces se běžně označuje jako tzv. „cherrypicking" (aktivní vzorky jsou označovány jako hits, cherries). Aktivní látky jsou pipetovány z mateřských zkumavek do formátu 384 nebo 1536 za vytvoření ředící série. Díky tomu lze v následném experimentu zjistit závislost biologické odpovědi na koncentraci chemické látky.

4. Využití automatizace

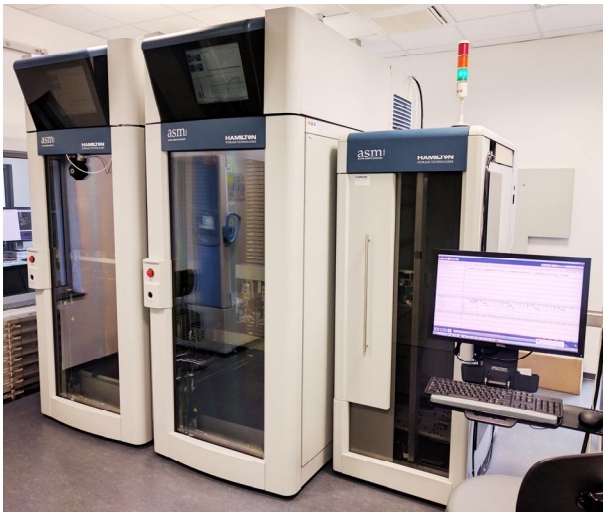
Pro přesné a efektivní zpracování obrovského množství vzorků v HTS je naprosto fundamentální využití laboratorní automatizace[6–8].

4.1. Automatizovaná zařízení pro skladování vzorků

Základem moderního CM je automatizované zařízení pro skladování vzorků v kontrolovaném prostředí. Skladování vzorků v optimálních podmínkách může zásadně ovlivnit kvalitu a integritu knihovny. Mezi obecné požadavky pro skladování vzorků v automatizovaném zařízení se řadí: snížená teplota (typicky –20 °C až –80 °C), nulová relativní vlhkost, atmosféra s nízkou koncentrací kyslíku (typicky < 1 %) a zamezení přístupu světla. Hodnoty výše uvedených parametrů bývají zpravidla zaznamenávány a ukládány. Jednodušší systémy se skládají z manuálně přístupných polic umístěných v mrazícím zařízení, které je vybavené systémem pro záznam hodnot (tzv. „data log"). Pokročilé skladovací zařízení mívají modulární design s integrovanými čtečkami čárových kódů destiček a zkumavek, rozmrazovací stanicí, robotickým systémem polic a manipulačním ramenem pro transport destiček a stojánků se zkumavkami (obr. 2). V současné době se výrobou a prodejem automatizovaných skladovacích zařízení zabývá celá řada komerčních subjektů[9–12].

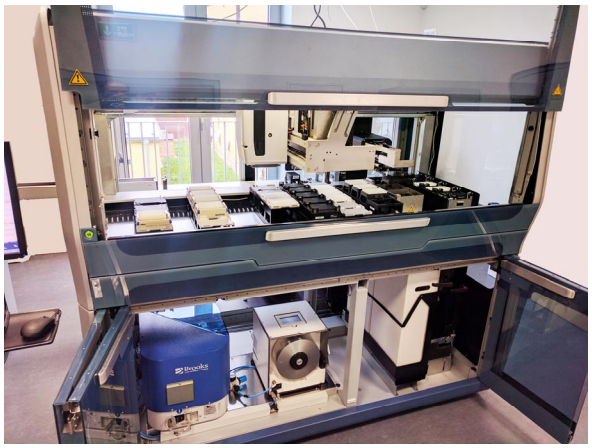
4.2. Automatizované stanice pro přenos kapalin

Vedle pokročilých skladovacích možností je důležitou součástí CM, pro dosažení vysoké propustnosti při reformátování vzorků, robotická platforma pro přenos kapalin (tzv. „liquid handling workstation"). V současnosti jsou komerčně dostupné automatizované stanice, které mohou být plně integrované s dalšími přístroji, jako jsou skladovací zařízení, čtečky a tiskárny čárových kódů, centrifugy, zatavovací zařízení pro destičky nebo zařízení pro sejmutí a opětovné našroubování víček z mateřských zkumavek (obr. 3)[13–16]. K samotnému přenosu kapalin slouží



Obr. 2. **Příklad automatizovaného zařízení pro skladování vzorků v kontrolovaném prostředí**

standardně dva typy pipetovacích nástrojů: 1) pipetovací hlava s 96, případně 384 nástavci pro špičky a 2) 4 nebo 8 nezávislých pipetovacích kanálů s variabilní roztečí. Pipetovací nástroje jsou běžně vybavené funkcí detekce hladiny kapaliny pomocí vodivostní technologie (vodivé černé špičky s obsahem uhlíku) nebo využívají detekci založenou na měření tlaku. S použitím takto pokročilé instrumentace je možné dosáhnout zpracování několika tisíc vzorků denně, a to bez nutnosti přítomnosti nebo zásahu operátora. Mezi další používané pipetovací nástroje patří tzv. „pin tool“, neboli jehlicový nástavec, s jehož pomocí lze přenášet objemy v řádu jednotek nanolitrů až mikrolitrů[17]. Objem přenesené kapaliny je u tohoto nástroje definován velikostí zářezů na konci jehlic, v nichž ulpí přesně definovaný objem kapaliny. Značnou nevýhodou jehlicového nástavce je fakt, že musí být po každém provedeném přenosu důkladně vyčištěn sérií oplachů a sušení. Přesto nelze při jeho použití zcela eliminovat nežádoucí kontaminaci předchozím přenosem (tzv. „carry over“). Alternativou jehlicového nástavce může být přístroj využívající jednorázové nízkoobjemové pipetovací špičky / kapiláry, jako je např. přístroj Mosquito s rozsahem 25 nl až 5 µl (cit.[15]). Pro přenos nejnižších objemů se hodí technologie založená na piezoelektrickém jevu (tzv. „inkjet dispensing technology“), která funguje na podobném principu jako běžná inkoustová tiskárna a s jejíž pomocí lze docílit transferu až pikolitrových objemů[18].



Obr. 3. **Příklad plně integrovaného automatizovaného systému pro přenos kapalin**

Významným milníkem na poli HTS a CM byl příchod technologie akustického přenosu kapalin (ADE – acoustic droplet ejection)[19–21]. Nástup ADE technologie umožnil vypořádat se s požadavkem rychlého a přesného přenosu velmi malých objemů kapalin v řádu jednotek nanolitrů až po mililitry. Technologie je založena na schopnosti fokusovaného paprsku ultrazvukových vln, který je přes tzv. „transducer“ přiveden zespodu jamky mikrotitrační destičky, uvolnit z povrchu kapaliny kapičky o přesně definovaném objemu. Tyto kapičky jsou vystřelovány do jamky na cílové destičce, která je umístěná nad zdrojovou destičkou a orientovaná dnem nahoru. Akustická vlna se tvoří přímo v transduceru z energie radiofrekvenčních vln o vlnové délce v řádu MHz (cit.[1]). Typický objem jedné uvolněné kapičky je 2,5 nl a vyššího objemu je docíleno opakovaným vystřelením většího množství kapiček. Největší výhodou ADE je fakt, že se jedná o bezkontaktní metodu přenosu kapalin a tudíž nehrozí žádné znečištění vlivem dříve přenášených vzorků. Nespornou výhodou je také možnost přenášet vzorky z libovolné jamky na zdrojové destičce na jakoukoliv jamku na cílové destičce. Pozitivní je stejně tak fakt, že k přenosu není zapotřebí další spotřební materiál, jako jsou pipetovací špičky, případně rozpouštědla na omývání pipetovacích jehel. V ADE leží dozajista budoucnost manipulace s kapalinami v CM a HTS.

5. Zajištění a kontrola kvality

Kvalita testovaných látek v HTS má zásadní dopad na kvalitu výsledků, a proto se v oboru CM klade nekompromisní důraz na zajištění kvality testovaných látek a knihoven vzorků. Kvalitou látek v CM se rozumí především jejich identita, čistota a koncentrace. Dále můžeme kontrolu kvality rozdělit na dvě základní oblasti: 1) zajištění kvality procesů a procedur (QA – quality assurance) a 2) analytická kvalita samotných vzorků (QC – quality control).

5.1. Zajištění kvality procesů

Při zajišťování nejvyšší možné kvality pracovních postupů v CM je nutné dodržování správné laboratorní praxe. To je realizováno uplatňováním standardizovaných procedur pro nakládání a operace se vzorky v kombinaci s důkladnou dokumentací a archivací všech kroků v LIMS. Každý vzorek v knihovně může být potenciálně identifikován v HTS experimentu jako aktivní látka, tudíž je nutné přistupovat k registraci a označování, stejně tak jako při

práci s daty v LIMS, s maximální možnou péčí. Primární důraz je kladen na minimalizaci možnosti záměny vzorků a vzniku diskrepancí mezi elektronickými daty a fyzickými vlastnostmi vzorků. Čtyři hlavní faktory, které zásadně ovlivňují kvalitu CM procesů, jsou vážení, rozpouštění, přenos kapalin a skladovací podmínky[1]. Ačkoliv na trhu se v poslední dekádě objevily první automatizované vážící stanice[22–24], zůstává vážení pevných vzorků jedním z posledních obtížně automatizovatelných procesů v CM. Obecně platí, že pro dosažení nejvyšší možné přesnosti je zapotřebí při manuálním vážení použít analytické váhy s přesností 0,1–0,01 mg. Váhy musí být, stejně jako automatické pipety pro přidávání DMSO, v pravidelných intervalech kalibrovány. Neméně důležité je také zajištění přesnosti přenosu kapalin na automatizované pipetovací stanici. To je opět realizováno pravidelnou kalibrací pipetovacích zařízení. Omezení plýtvání pipetovaným materiálem je dosaženo snížením mrtvých objemů pomocí vhodného nastavení pipetovacích parametrů a použitím optimálních spotřebních materiálů.

5.2. Kontrola kvality vzorků

Fungující QC v oblasti správy vzorků pro HTS poskytuje informace o identitě, čistotě a koncentraci látek v čase. Tyto informace jsou nesmírně důležité, protože s jejich využitím je možné omezit zbytečné časové a finanční výdaje při provádění experimentů s látkami, jejichž čistota nebo identita klesla pod požadovanou úroveň. Ke změnám v úrovni výše uvedených analytických parametrů může dojít na všech úrovních nakládání se vzorky. Hlavním zdrojem snížené stability látek ve formě roztoků v DMSO je hydratace (přijímání vzdušné vlhkosti při expozici vzorků atmosférickému prostředí)[25]. Hydratace může mít za následek snížení rozpustnosti látky, její precipitaci z roztoku a snížení koncentrace. Dalším negativním dopadem hydratace je potenciální rozklad cestou hydrolýzy. Pro monitorování parametrů kvality se standardně využívá moderních HPLC systémů s UV/VIS a MS detekcí vybavených automatickým vzorkovačem (tzv. „autosampler“), které jsou schopné analyzovat a vyhodnotit stovky vzorků denně v bezobslužném provozu, vzorkováním přímo z mikrotitračních destiček. Ověření čistoty a identity látek se provádí typicky po rozpuštění a registraci práškových vzorků jako vstupní kontrola, a dále pak v případě látek identifikovaných v HTS experimentu jako hity.

6. Využití cheminformatických nástrojů ve správě sloučenin

Nezbytnou součástí efektivního CM je využívání cheminformatických nástrojů pro nakládání s inventárními daty a jejich správu. Hlavním LIMS nástrojem pro správu dat je v infrastruktuře CZ-OPENSCREEN webově založená aplikace ChemGen DB (obr. 4)[5]. CM také rutinně využívá služeb externích aplikací, jako jsou různé databáze sloučenin a jejich vlastností. Jedním z hojně využívaných softwarových nástrojů je také analytická platforma KNIME[26], která umožňuje provádět operace s chemickými daty, jako jsou např. převody mezi různými formáty zápisu struktur látek, normalizace struktur apod.

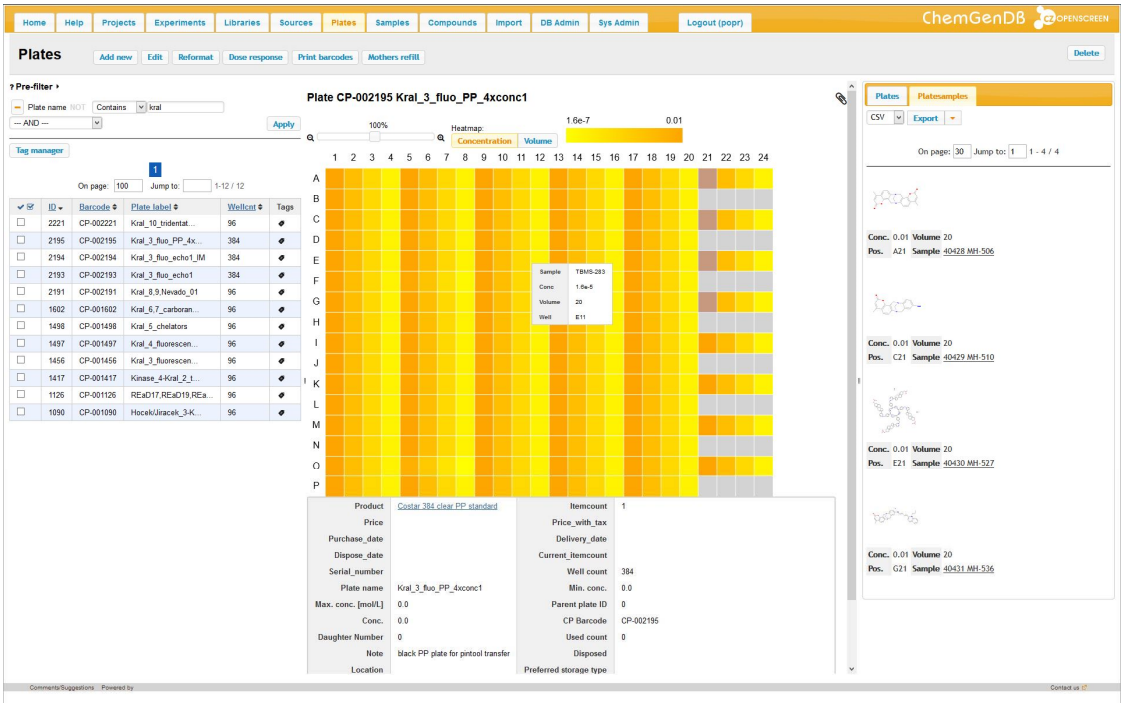
7. Závěr

Správa knihoven chemických vzorků je dynamicky se rozvíjejícím oborem, u kterého lze jen těžko odhadovat, s jakými požadavky se bude muset v budoucnosti vypořádat. Díky tomu lze s jistotou tvrdit, že jednou se zásadních výzev CM je schopnost flexibilně reagovat na nové požadavky. Díky neustále narůstajícímu počtu vzorků, které je třeba spravovat a zpracovávat, je zřejmým trendem ve vývoji CM stále větší míra využití moderní automatizace a upouštění od manuálních operací se vzorky. Dále si lze povšimnout směřování k miniaturizaci objemů vzorků a používaní destiček s vyšším počtem jamek. Nesporným přínosem pro obor CM je také vznik a vývoj nových výpočetních technologií a informatických nástrojů zaměřených na práci s chemickými daty. S jejich pomocí je možné sofistikovaně vybírat pro HTS experimenty úzce zaměřené okruhy látek a dosáhnout tak značné finanční i časové úspory.

Tento článek vznikl za podpory MŠMT v rámci Národního programu udržitelnosti I projekt LO1220 (CZ-OPENSCREEN).

LITERATURA

1. Wigglesworth M., Wood T.: *Management of Chemical and Biological Samples for Screening Applications*. J. Wiley, Weinheim 2012.
2. Gordon E. M., Barrett R. W., Dower W. J., Fodor S. P. A., Gallop M. A.: J. Med. Chem. *37*, 1385 (1994).
3. http://www.ddw-online.com/p-148416, staženo 18. 5. 2017.
4. Engeloch C., Schopfer U., Muckenschnabel I., Le Goff F., Mees H., Boesch K., Popov M.: J. Biomol. Screen. *13*, 999 (2008).
5. Müller T.: Chem. Listy *111*, 766 (2017).
6. Chapman T.: Nature *421*, 661 (2003).
7. Sutherland J. D., Tu N. P., Nemcek T. A., Searle P. A., Hochlowski J. E., Djuric S. W., Pan J. Y.: J. Lab. Autom. *19*, 176 (2014).
8. Markin R. S., Whalen S. A.: Clin. Chem. *46*, 764 (2000).
9. https://www.liconic.com/page.php?id=512, staženo 23. 5. 2017.
10. https://www.hamiltoncompany.com/products/automated-sample-storage, staženo 23. 5. 2017.
11. http://www.brooks.com/products/life-science/storage-systems/biostore-minus-80c-automated-sample-storage, staženo 23. 5. 2017.
12. http://ttplabtech.com/sample-management/compound/, staženo 30. 5. 2017.
13. https://www.hamiltoncompany.com/products/automated-liquid-handling/liquid-handling-workstations, staženo 26. 5. 2017.
14. http://lifesciences.tecan.com/products/



Obr. 4. **Náhled do LIMS databáze ChemGen DB – sekce destičky**

liquid_handling_and_automation, staženo 30. 5. 2017.
15. http://ttplabtech.com/liquid-handling/, staženo 30. 5. 2017.
16. http://www.beckman.com/liquid-handling-and-robotics, staženo 26. 5. 2017.
17. Cleveland P. H., Koutz P. J.: ASSAY Drug Dev. Technol. *3*, 213 (2005).
18. Lemmo A. V., Rose D. J., Tisone T. C.: Curr. Opin. Biotechnol. *9*, 615 (1998).
19. Ellson R., Mutz M., Browning B., Lee L., Miller M. F., Papen R.: JALA J. Assoc. Lab. Autom. *8*, 29 (2003).
20. Dawes T. D., Turincio R., Jones S. W., Rodriguez R. A., Gadiagellan D., Thana P., Clark K. R., Gustafson A. E., Orren L., Liimatta M., Gross D. P., Maurer T., Beresini M. H.: J. Lab. Autom. *21*, 64 (2016).
21. Sackmann E. K., Majlof L., Hahn-Windgassen A., Eaton B., Bandzava T., Daulton J., Vandenbroucke A., Mock M., Stearns R. G., Hinkson S., Datwani S. S.: J. Lab. Autom. *21*, 166 (2016).
22. http://www.ddw-online.com/enabling-technologies/p146749-automation-of-solid/powder-dispensing:much-neededbut-cautiously-used!-summer-09.html, staženo 31. 5. 2017.
23. Wong S. K.-F., Lu Y., Heineman W., Palmer J., Courtney C.: J. Biomol. Screen. *10*, 524 (2005).
24. http://www.gerstel.com/en/automated-weighing.htm, staženo 31. 5. 2017.
25. http://www.ddw-online.com/p-148346, staženo 31. 5. 2017.
26. https://www.knime.org/, staženo 1. 6. 2017.

M. Popr, D. Sedlák, and P. Bartůněk *(CZ-OPENSCREEN: National Infrastructure for Chemical Biology, Institute of Molecular Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Compound Management – Maintenance of Chemical Compound Libraries for Use in High Throughput Screening**

Historically, the Compound Management (CM) has emerged to fulfill the needs of High Throughput Screening (HTS) and other drug discovery processes for maintaining large collections (typically more than hundreds of thousands) of small organic molecules. High quality of the individual chemical compounds as well as of the whole library is substantial for achieving reliable HTS results. Identity of the compounds is guaranteed by observing standard operating procedures for registration and handling. Every sample in the library is labeled with 2D DataMatrix barcode to allow automated tracking of the complete history and precise sample localization at any timepoint. Long-time stability of the chemical samples is ensured by optimum storage (–20 °C, inert atmosphere) and, in case of liquids, by effective handling (limiting of freeze-thaw cycles, minimizing exposure to atmosphere, etc.), both realized by employing automated robotic systems. CM makes a use of dedicated Laboratory Information Management System (LIMS) which integrates various cheminformatics tools to ensure accessibility and integrity of the inventory data. The ultimate goal of CM is providing the suitable compounds of uncompromised quality and in desired format (384- or 1536-well microtiter plates) for the biological HTS experiment.