

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Adéla Rázková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Validace metod syntézy oligonukleotidů ve scale 200 nmol  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Rázková**  
Osobní číslo: **C23320**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Validace metod syntézy oligonukleotidů ve scale 200 nmol**  
Téma práce anglicky: **Validation of Oligonucleotide Synthesis Methods at The 200 nmol Scale**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- 1) Oligonukleotidy a jejich syntéza
- 2) Analytické metody využívané pro ověření kvality syntézy
- 3) Validace procesu syntézy

### Experimentální část:

- 1) sestavení plánu validace, výběr sekvencí pro validaci syntéz a stanovení cílů
- 2) syntéza oligonukleotidů ve scale 200 nmol
- 3) spektrofotometrické stanovení výtěžku nasyntetizovaných oligonukleotidů a analýza MALDI
- 4) HPLC analýza nasyntetizovaných oligonukleotidů
- 5) statistické zpracování dat

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Cavaluzzi, M. J., & Borer, P. N. (2004). Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, 32(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gnh015>

Gerstein, A. S. (2003). Nucleotides, Oligonucleotides, and Polynucleotides. In *Molecular Biology Problem Solver* (pp. 267–289). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471223905.ch10>

Hughes, R. A., & Ellington, A. D. (2017). Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(a023812). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023812>

Tataurov, A. V., You, Y., & Owczarzy, R. (2008). Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry*, 133(1–3), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.12.004>

Vedoucí diplomové práce: **PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.**  
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Ústav klinické  
biochemie a diagnostiky

Konzultant diplomové práce: **PharmDr. Filip Kostelanský, Ph.D.**  
GENERI BIOTECH s.r.o.

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

**prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Validace metod syntézy oligonukleotidů ve scale 200 nmol jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2025

Bc. Adéla Rázková v.r.

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. za vstřícnost, odborné rady, cenné připomínky a trpělivost, kterou mi věnoval po celou dobu zpracování této práce. Mé poděkování dále patří také PharmDr. Filipovi Kostelanskému, Ph.D, odbornému konzultantovi, za jeho cenné rady, podněty a metodickou pomoc při řešení praktické části. Dále děkuji pracovníkům GENERI BIOTECH s.r.o. za umožnění realizace praktické části práce a za ochotu při poskytování odborné pomoci. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině za jejich trpělivost, podporu a povzbuzení během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zaměřuje na validaci syntézy oligonukleotidů délky 60 až 82 bp ve scale 200 nmol, s cílem porovnat účinnost syntézy mezi třemi výrobci pevné fáze a identifikovat faktory ovlivňující kvalitu syntézy. Využívá analytické metody jako MALDI, HPLC, tritylmonitor a spektrofotometrie k hodnocení výtěžků, čistoty a stability syntézy. Teoretická část práce pokrývá chemické syntetické metody a metody validace procesu syntézy (IQ, OQ, PQ). Výsledky přispívají k optimalizaci syntézy oligonukleotidů pro hromadnou výrobu i výzkum.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Validace syntézy , oligonukleotidy, pevná fáze, chemická syntéza, MALDI, HPLC, Tritylmonitor, výtěžnost, kvalita

## **TITLE**

Validation of methods for oligonucleotide synthesis at 200 nmol scale

## **ANNOTATION**

This thesis focuses on the validation of oligonucleotide synthesis at the 200 nmol scale, with the aim of comparing the synthesis efficiency between three solid phase producers and identifying factors affecting the quality of the synthesis. It uses analytical methods such as MALDI, HPLC, tritylmonitor and spectrophotometry to evaluate yields, purity and stability of the synthesis. The theoretical part of the thesis covers chemical synthesis methods and synthesis process validation methods (IQ, OQ, PQ). The results contribute to the optimization of oligonucleotide synthesis for mass production and research.

## **KEYWORDS**

Synthesis validation , oligonucleotides, solid phase, chemical synthesis, MALDI, HPLC, Tritylmonitor, yield, quality

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM GRAFŮ .....	12
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	16
ÚVOD .....	18
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>19</b>
1.1. OLIGONUKLEOTIDY .....	19
1.1.1. <i>Chemická syntéza oligonukleotidů</i> .....	20
1.1.1.1. <i>Fosforamiditová syntéza</i> .....	21
1.1.1.1.1. <i>Detritylace</i> .....	22
1.1.1.1.2. <i>Coupling</i> .....	22
1.1.1.1.3. <i>Capping</i> .....	22
1.1.1.1.4. <i>Oxidace</i> .....	22
1.1.1.2. <i>H-fosfonátová syntéza</i> .....	23
1.1.1.3. <i>Pevné a rozpustné fáze, na kterých probíhá syntéza</i> .....	23
1.1.1.4. <i>Schéma přístroje</i> .....	25
1.2. ANALYTICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ PRO OVĚŘENÍ KVALITY SYNTÉZY .....	27
1.2.1. <i>Měření absorbance</i> .....	27
1.2.2. <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC</i> .....	28
1.2.3. <i>Hmotnostní spektrometrie</i> .....	30
1.3. VALIDACE PROCESU SYNTÉZY .....	30
1.3.1. <i>Instalační kvalifikace (IQ)</i> .....	32
1.3.2. <i>Provozní kvalifikace (OQ)</i> .....	32
1.3.3. <i>Kvalifikace výkonu (PQ)</i> .....	33
1.3.4. <i>Kritéria pro přijatelnost</i> .....	33
1.3.4.1. <i>Čistota syntetizovaných oligonukleotidů</i> .....	34
1.3.4.2. <i>Výtěžnost syntetizovaných oligonukleotidů</i> .....	34
1.3.4.3. <i>Profil nečistot</i> .....	35
<b>2. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
2.1. CÍLE .....	36
2.2. METODY .....	36
2.2.1. <i>Vážení vzorku</i> .....	36
2.2.2. <i>Syntéza</i> .....	37
2.2.3. <i>Deprotekce</i> .....	38
2.2.4. <i>Analytické metody</i> .....	39
2.2.4.1. <i>MALDI-TOF</i> .....	39
2.2.4.2. <i>HPLC</i> .....	39
2.2.4.3. <i>Spektrofotometrické stanovení absorbance</i> .....	39
2.2.5. <i>Statistické zpracování dat</i> .....	39
2.3. VÝSLEDKY .....	40
2.3.1. <i>Trityl monitor (TRM)</i> .....	40
2.3.2. <i>MALDI TOF</i> .....	44
2.3.3. <i>HPLC</i> .....	45
2.3.4. <i>Spektrofotometrie</i> .....	50
2.3.5. <i>Vyhodnocení sledovaných parametrů</i> .....	51
2.4. DISKUSE .....	52
2.4.1. <i>TRM</i> .....	52

2.4.2.	<i>MALDI-TOF</i>	53
2.4.3.	<i>HPLC</i>	53
2.4.4.	<i>Spektrofotometrie</i>	54
2.4.5.	<i>Technické parametry syntézy</i>	55
<b>ZÁVĚR</b> .....		<b>56</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....		<b>57</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....		<b>64</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1 Struktura oligonukleotidu .....	19
Obr. 2 Obecné schéma fosforamiditové syntézy .....	21
Obr. 3 Schéma syntetizátoru oligonukelotidu.....	26
Obr. 4 DNA/RNA syntetizátor KaA H-8-SE.....	26
Obr. 5 Průvodce krok za krokem k úspěšné kvalifikaci instalace .....	32

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Molární absorpční koeficienty pro každou bázi [27].....	28
Tabulka 2 Sledované parametry .....	36
Tabulka 3 Souhrn syntetizovaných oligonukleotidů .....	37
Tabulka 4 Seznam použitých chemikálií .....	38
Tabulka 5 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě hodnot TRM total yield a délkou, poté mezi hodnotou TRM total yield a výrobcem pevné fáze. len = délka sekvence, support = pevná fáze, position = pozice na syntetizátoru, residuals = reziduum (rozdíl mezi skutečnou hodnotou a hodnotou předpovězenou modelem), Df = stupeň volnosti (počet hodnot, které mohou být měněny aniž by ovlivnily ostatní), Sum Sq = součet čtverců (měří variabilitu dat), Mean Sq = střední čtverec (průměrná variabilita), F value = F-statistika (poměr mezi středními čtverci mezi skupinami a uvnitř skupin), Pr(>F) = p-hodnota (pravděpodobnost náhody, čím nižší hodnota, tím významnější rozdíl) .....	41
Tabulka 6 Porovnání grafu TRM s náhlým propadem hodnot pod 50 % či hodnota TRM total yield nižší než 70%. Dále jsou uvedeny hodnoty výtěžku vzorku ze spektrofotometrické analýzy. Tato tabulka byla vytvořena na základě mé hypotézy o nízké hodnotě TRM total yield a vysokém výtěžku. Tato hypotéza nebyla potvrzena, jelikož v tabulce vidíme hodnoty výtěžku pod sledovaným parametrem validace (V02742) nebo které jsou těsně nad sledovaným parametrem (V02759), rozhodně je nelze považovat za nadprůměrné hodnoty. ....	44
Tabulka 7 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě výtěžku a délky sekvence, poté mezi výtěžkem a výrobcem pevné fáze. Jsou viditelné i slabé faktory na základě délky a pevné fáze, poté i na délce, pevné fázi a pozici. Vysvětlivky zkratk najdete pod Tabulkou 5. ....	47
Tabulka 8 Průměrné hodnoty pevné fáze Glen (AUC 57,26 %, výtěžek 120,75 nmol), Sigma (AUC 49,86 %, výtěžek 111,12 nmol), LGC (AUC 55,83 %, výtěžek 106,15 nmol). ....	49
Tabulka 9 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě výtěžku a výrobcí pevné fáze, poté na základě výtěžku na délce a výrobcí pevné fáze. Vysvětlivky zkratk najdete pod Tabulkou 5.....	50
Tabulka 10 Celkové výsledky syntéz z MALDI TOF analýzy, HPLC analýzy a spektrofotometrie. Světle modrou barvou jsou označeny vzorky, které jsou graficky znázorněny v této práci. V sloupcích AUC % a výtěžek je heat mapa, která barevně zobrazuje hodnoty AUC a výtěžku. Pokud jsou hodnoty pod sledovaným parametrem validace, jsou vyznačeny červenou barvou, pokud se hodnoty pohybují okolo sledovaného parametru, tak jsou zobrazeny žlutě a pokud jsou hodnoty nad sledovaným parametrem neboli jsou nadprůměrné, tak jsou zobrazeny zeleně. ....	66
Tabulka 11 Souhrnné vyhodnocení sledovaných parametrů validace. 1=splnil dané parametry, 0=nesplnil parametry. Pokud vzorek splnil všechny parametry, tak v souhrnném hodnocení nese označení 1, pokud alespoň jeden parametr vzorek nesplnil, tak nese hodnotu 0. Výrobce Glen má 29 vzorků, které splnily sledované parametry. Výrobce Sigma jich má pouze 14 a výrobce LGC má 22 vzorků, které splnily všechny sledované parametry. ....	75

## SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1 Záznam tritylmonitoru vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s konstantní hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). Protože nedošlo k žádné změně přenosu tritylu, celková výtěžnost TRM zůstává na 100 %. .....41
- Graf 2 Záznam tritylmonitoru vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s mírně klesající hodnotou TRM total yield až na hodnotu 80. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 80%. .....41
- Graf 3 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze na základě hodnot TRM total yield (%). Na ose x jsou výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty TRM total yield (%). Nižší hodnoty TRM total yield jsou viditelné u výrobce Sigma. U zbylých dvou výrobců je rozdíl patrný jen v rozptylu hodnot. ....42
- Graf 4 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě hodnot TRM total yield. Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Největší rozptyl hodnot je pozorovatelný u výrobce LGC u ID sekvence 77. Tento rozptyl pozorujeme i u výrobce Glen, ale je mnohem menší. U výrobců LGC a Sigma je viditelný pokles hodnot TRM total yield se zvyšující se ID sekvencí. Mírný propad můžeme vidět u ID sekvence 67 a 74 u výrobce Glen. ....42
- Graf 5 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě hodnot TRM total yield (%). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Na grafu nejsou viditelné propady hodnot vlivem pozice na syntetizátoru. Nejvyšší hodnoty TRM total yield má výrobce pevné fáze Glen, naopak nejnižší hodnoty má výrobce Sigma. ....43
- Graf 6 zobrazuje korelaci hodnot TRM total na základě hodnot AUC jednotlivých výrobců pevné fáze. Na ose x jsou hodnoty AUC (%), na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Výrobce pevné fáze Glen má  $R=0,64$ , výrobce LGC má  $R=0,59$  a výrobce Sigma má  $R=0,16$ . R hodnota je korelační koeficient a udává sílu a směr lineární závislosti mezi AUC (%) a TRM total yield. Čím více se koeficient blíží hodnotě 1, tím silnější je přímá korelace mezi dvěma hodnotami. Hodnota R nad 0,4 se dá považovat za středně silnou pozitivní korelaci. Pokud je hodnota R nad 0,7, je tato korelace silně pozitivní. ....43
- Graf 7 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s viditelným píkem o hodnotě 19 205,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....44
- Graf 8 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s viditelným píkem o hodnotě 25 245 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....45
- Graf 9 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s retenčním časem 8,12 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty. ....46

Graf 10 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s retenčním časem 8,28 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty. ....	46
Graf 11 Porovnání výrobců pevné fáze na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou jednotliví výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty AUC (%). Nejvyšších hodnot AUC (%) dosahuje výrobce pevné fáze Glen, poté LGC a nejnižší hodnoty má výrobce Sigma. ....	47
Graf 12 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y jsou hodnoty AUC (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. . S rostoucí ID sekvencí, klesá u výrobců LGC a Sigma hodnota AUC (%). Nejvyšších hodnot dosahují ID sekvence 60 a 62. Tyto dvě ID sekvence mají absolutně nejvyšší hodnotu AUC (%) u pevné fáze Glen. Propad hodnot AUC (%) pozorujeme u ID sekvence 67 a 74 u výrobce Glen, tyto propady nepozorujeme u zbylých dvou výrobců .....	48
Graf 13 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y jsou hodnoty AUC (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Nejvyšších hodnot AUC (%) dosahuje výrobce pevné fáze Glen, nejnižších dosahuje výrobce Sigma. Pevná fáze od LGC mají nejmenší rozptyly hodnot AUC nehledě na pozici na syntetizátoru.....	48
Graf 14 Porovnání výrobců pevné fáze na základě výtěžku (nmol). Na ose x jsou výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty výtěžku vzorků (nmol). Je viditelný nejvyšší výtěžek u výrobce pevné fáze Glen, naopak nejnižšího výtěžku dosahuje pevná fáze LGC. ....	50
Graf 15 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě výtěžku. Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y jsou hodnoty výtěžku vzorků (nmol) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Oligonukleotid s ID sekvencí 82 má v rámci skupiny vyšší výtěžky u pevné fáze Glen než u LGC a Sigma. Propad jako je u ID sekvence 82 u pevné fáze LGC nepozorujeme ani u Sigmy ani u Glena. ....	51
Graf 16 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě výtěžku vzorků (nmol). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y jsou hodnoty výtěžku (nmol) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Nepozorujeme výrazný pokles na žádné pozici ani u jednoho výrobce pevné fáze. ....	51
Graf 17 Znázornění počtu vzorků, které splnily dané sledované parametry. Od jednoho výrobce bylo syntetizováno 32 vzorků. Na ose x jsou vyznačeny výrobci pevné fáze, na ose y jsou počty vzorků splňující parametry. Glen má nejvyšší počet zastoupených vzorků splňující parametry, konkrétně je to 32 vzorků z 32 z analýzy MALDI-TOF i výtěžku, 29 vzorků splňuje podmínky AUC. Sigma má 32 vzorků splňující parametry MALDI-TOF, ale pouze 15 jich splnilo podmínky AUC, lépe je na tom s výtěžkem, u kterého prošlo 30 vzorků. LGC má 32 vzorků splňující parametry MALDI-TOF, 27 vzorků splňující podmínky AUC a 24 vzorků, které splnily podmínky výtěžku. Celkem splnilo všechny sledované parametry validace 65 vzorků z 96 syntetizovaných vzorků, což odpovídá že 67,7% počtu vzorků splnilo sledované parametry validace. Konkrétněji sledované parametry u výrobce Glen splnilo 29 vzorků (90,6 %), u Sigmy 14 vzorků (43,8 %) a u LGC 22 vzorků (68,8 %). ....	52
Graf 18 Záznam tritylmonitoru vzorku V02707 s pevnou fází Sigma a délkou 62 bp s mírně klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%).V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 79%. ....	66

Graf 19 Záznam tritylmonitoru vzorku V02710 s pevnou fází Sigma a délkou 82 bp s klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 67%. .....	66
Graf 20 Záznam tritylmonitoru vzorku V02739 s pevnou fází LGC a délkou 62 s konstantní hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 92%. .....	67
Graf 21 Záznam tritylmonitoru vzorku V02742 s pevnou fází LGC a délkou 82 s klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 66%. .....	67
Graf 22 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02707 o délce 62 bp na pevné fází Sigma s viditelným píkem o hodnotě 19169,9 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....	68
Graf 23 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02710 o délce 82 bp na pevné fází Sigma s viditelným píkem o hodnotě 25236,6 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....	68
Graf 24 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02739 o délce 62 bp na pevné fází LGC s viditelným píkem o hodnotě 19149,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....	69
Graf 25 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02742 o délce 82 bp na pevné fází LGC s viditelným píkem o hodnotě 25236,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty. ....	70
Graf 26 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02707 s délkou 62 bp na pevné fází Sigma s retenčním časem 8,19 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty. ....	71
Graf 27 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02710 s délkou 82 bp na pevné fází Sigma s retenčním časem 8,35 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty. ....	72
Graf 28 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02739 s délkou 62 bp na pevné fází LGC s retenčním časem 8,2 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty. ....	72
Graf 29 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02742 s délkou 82 bp na pevné fází LGC s retenčním časem 8,36 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě	

detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty.  
.....73

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A	Adenin
ACN	Acetonitril
AMA	Methylamin : hydroxid amonný
AMD	Amidity
AUC	Plocha pod křivkou
bp	Párů bází
C	Cytosin
Cap A	Capping činidlo A
Cap B	Capping činidlo B
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CPG	Sklo s kontrolovanými póry
CPV	Průběžné ověřování procesu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMT	4,4'-dimethoxytrityl
DMT <sup>+</sup>	( <i>E</i> )-{(4 <i>E</i> )-4-[(4-Methoxyfenyl)(fenyl)methylen]-2,5-cyclohexadien-1-yliden}(methyl)oxonium
DVB	Divinylbenzen
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA
G	Guanin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IE-HPLC	Iontoměničová vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP-HPLC	Iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP-RP-HPLC	Iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
IP-HPLC-ESI-MS	Iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
IP-RP	Iontový pár s reverzní fází
IQ	Instalační kvalifikace
IWA	Deionizovaná

LPOS	Syntéza oligonukleotidů v kapalně fázi
MALDI-TOF	Matrix asistovaná laserová desorpce/ionizace
MF	Mobilní fáze
MPPS	Makroporézní polystyren
MS	Hmotnostní spektrometrie
MW	Molekulová hmotnost
NMI	N-methylimidazol
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OSN	Nanofiltrace organickým rozpouštědlem
OQ	Provozní kvalifikace
PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
PQ	Kvalifikace výkonu
RNA	Ribonukleová kyselina
RP-HPLC	Reverzní fáze vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RPM	Otáčky za minutu
RT	Retenční čas
SEC	Velikostní vylučovací chromatografie
SF	Stacionární fáze
T	Thymin
TCA	Kyselina trichloroctová
TET	5-(4-nitrofenyl)-1H-tetrazol
THF	Tetrahydrofuran
TRM	Tritylmonitor
U	Uracil
UPLC	Ultra výkonná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové

## ÚVOD

Oligonukleotidy jsou krátké řetězce nukleových kyselin, které mají široké uplatnění v biotechnologii, výzkumu a diagnostice. Jejich syntéza hraje klíčovou roli v různých oblastech, od vývoje diagnostických nástrojů po výrobu terapeutických produktů. V posledních letech se stále více zaměřujeme na zajištění vysoké kvality syntézy oligonukleotidů, zejména v kontextu hromadné výroby pro komerční účely. Tento proces vyžaduje nejen vysokou účinnost, ale i zajištění stability, čistoty a reprodukovatelnosti výsledků.

Cílem této práce je validace syntézy oligonukleotidů v délce 60 až 82 bp ve scale 200 nmol. Tato studie porovnává účinnost syntézy mezi třemi různými výrobci pevné fáze a identifikuje faktory, které mohou ovlivnit kvalitu syntézy. Dále se zaměřuje na zjištění, zda je syntéza v tomto vůbec validní a zda splňuje požadavky pro kvalitní a reprodukovatelné výsledky.

Pro zajištění vysoké kvality syntézy budou použity různé analytické metody, jako je MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), tritylmonitor a měření výtěžků na spektrofotometru. Tyto metody umožní komplexní hodnocení různých aspektů kvality syntézy, včetně čistoty, výtěžnosti a stability výsledného produktu.

Význam této práce spočívá v potenciálu pro aplikaci výsledků v hromadné výrobě oligonukleotidů. Validace syntézy v tomto rozsahu by mohla znamenat zásadní krok k optimalizaci výrobních procesů, a to jak pro komerční výrobu, tak pro výzkumné účely. Naopak, pokud se ukáže, že syntéza v tomto scale není validní, práce přispěje k dalšímu vývoji a zdokonalení syntetických metod.

V teoretické části práce se nejprve zaměříme na základní charakteristiku oligonukleotidů, poté se budeme zabývat různými metodami chemické syntézy, konkrétně H-fosfonátovou a fosforamiditovou syntézou. Dále bude popsána řada analytických metod, které budou použity k validaci procesu syntézy, včetně metod IQ (Installation Qualification), OQ (Operational Qualification) a PQ (Performance Qualification). Následuje praktická část práce, která obsahuje experimentální analýzu a vyhodnocení výsledků syntéz mezi různými výrobci.

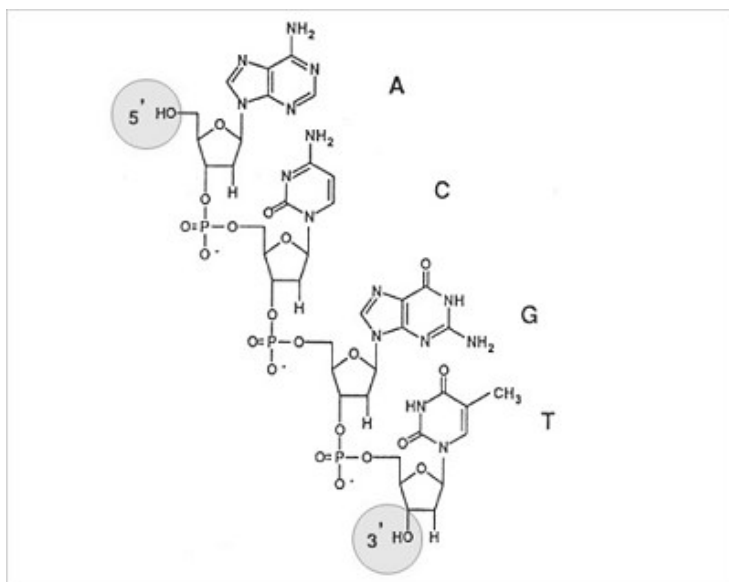
# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Oligonukleotidy

Oligonukleotidy jsou krátké, dvouvláknové nebo jednovláknové molekuly DNA či RNA [1]. Ať už jsou oligonukleotidy přirozeně se vyskytující nebo syntetické, nasedají na komplementární cíle, jako je genomová DNA. Malé oligonukleotidy s 12–25 páry bází (známé jako oligomery) se používají v široké řadě aplikací molekulární genetiky a mohou být chemicky modifikovány nebo nemodifikovány [2, 34].

Nukleosidmonofosfátové monomery se skládají ze tří důležitých složek. První složkou je báze (purinová nebo pyrimidinová báze), druhá složka je pentózoový cukr (ribóza pro RNA a deoxyribóza pro DNA) a třetí složkou je fosfátová skupina. Jednotlivé nukleotidy jsou se sousedním nukleotidem spojeny prostřednictvím fosfátových skupin a tvoří s cukernými skupinami páteř nukleové kyseliny. Každý řetězec nukleové kyseliny směřuje od 5'-konce ke 3'-konci. Při chemické syntéze dochází k syntéze řetězce od 3'-konce k 5'-konci [2, 34].

Při komplementárním párování bází mezi nukleotidy ve dvouvláknové DNA musí být vlákna orientované v opačném směru. Základní nukleotidy živých organismů se dělí na puriny a pyrimidiny. Mezi puriny patří adenin (A) a guanin (G). Mezi pyrimidiny řadíme cytosin (C), thymin v DNA (T) a uracil v RNA (U). Komplementarita bází se vyskytuje mezi adeninem a thyminem (v DNA) nebo uracilem (v RNA). Guanin a cytosin se vážou navzájem. Báze jsou párovány specifickou vodíkovou vazbou. Nukleotidy mohou být seskupeny do mononukleotidů, dinukleotidů, oligonukleotidů a polynukleotidů [2, 34].



Obr. 1 Struktura oligonukleotidu [3]

Oligonukleotidy mají rozmanité způsoby použití např. terapeutické, ty mohou zasahovat do různých biomolekul zapojených do centrálního dogmatu molekulární biologie. Jedním z nich jsou i stérické blokátory, které inhibují funkci RNA/DNA, tím že blokují interakci s jinými biomolekulami [35]. Oligonukleotidy jsou také užitečné při studiu genové exprese [36], dále pak pro mikročipové analýzy [37], in situ hybridizace [38] nebo aplikací biosnímání [39].

Používají se především jako primery pro sekvenování DNA. Konvenční sekvenační techniky používají DNA polymerázy, stejně jako PCR, které vyžadují existující DNA k zahájení elongace. Oligonukleotidy jsou navrženy tak, aby nasedly na specifickou cílovou sekvenci, a proto se používají jako primery pro PCR při genetických vyšetřeních nebo pro sekvenování [2, 34].

### 1.1.1. Chemická syntéza oligonukleotidů

Syntéza na pevné fázi je široce používána k syntéze peptidů, oligonukleotidů, oligosacharidů a kombinatorické chemii. Byla vynalezena v 60. letech 20. století Brucem Merrifieldem a měla takový význam, že mu byla v roce 1984 udělena Nobelova cena za chemii [6]. První chemicky syntetizované modifikované oligonukleotidy byly methylfosfonáty. Jsou to nenabitě oligomery, ve kterých je nemůstkový atom kyslíku nahrazen methylovou skupinou [4]. V roce 1986 bylo představeno první použití enzymu Taq polymerázy tzv. enzymatická syntéza. Tato syntéza se ale v praxi používá jen velice málo [7].

Syntéza oligonukleotidů je chemický proces, kde jsou nukleotidy specificky spojeny a tím vzniká požadovaný syntetizovaný produkt. Pro získání požadovaného produktu je klíčová ochrana a deprotektce určitých funkčních skupin (hydroxylových, amino, karboxylových, atd.) na molekule substrátu. Produkt syntézy se oddělí od pevné fáze chemickým štěpením vazby mezi ním a pevnou fází. Syntéza na pevné fázi typicky zahrnuje použití polymeru nebo skleněných specializovaných částic, které nejsou ovlivněny reakčními podmínkami. Tyto částice jsou obsaženy v kolonách, kterými protékají reaktanty, činidla a rozpouštědla. Funkcí kuliček je působit jako platforma, na kterou jsou kovalentně navázány molekuly substrátu, na kterých probíhá chemická reakce. Nejčastěji používaný materiál v pevné fázi je makroporézní polystyren (MPPS) a sklo s kontrolovanými póry (CPG) [7].

Syntéza na pevné fázi umožňuje rychlé získání vyčištěného produktu, jelikož nečistoty a nezreagované látky jsou postupně vymývány během jednotlivých kroků syntézy. Celá syntéza je řízená s počítačovým zařízením a může být automatizována. Syntéza na pevné fázi je nejběžnější metodou používanou pro zakázkovou výrobu oligonukleotidů i peptidů [7]. Navzdory výhodám je tato metoda obtížně použitelná pro syntézu dlouhých oligonukleotidů ve vysokých výtěžcích. S rostoucím řetězcem klesá účinnost couplingu, kumulují se malé chyby. Dále to může být způsobeno neúplnou deprotektí, kdy dojde k neúplnému odstranění 5'-4,4'-dimethoxytrityl (DMT) chránící skupiny [40]. V takových případech je vhodnější použít přístup enzymatické ligace v tandemu s chemickou syntézou, aby se získal oligomer požadované délky [6].

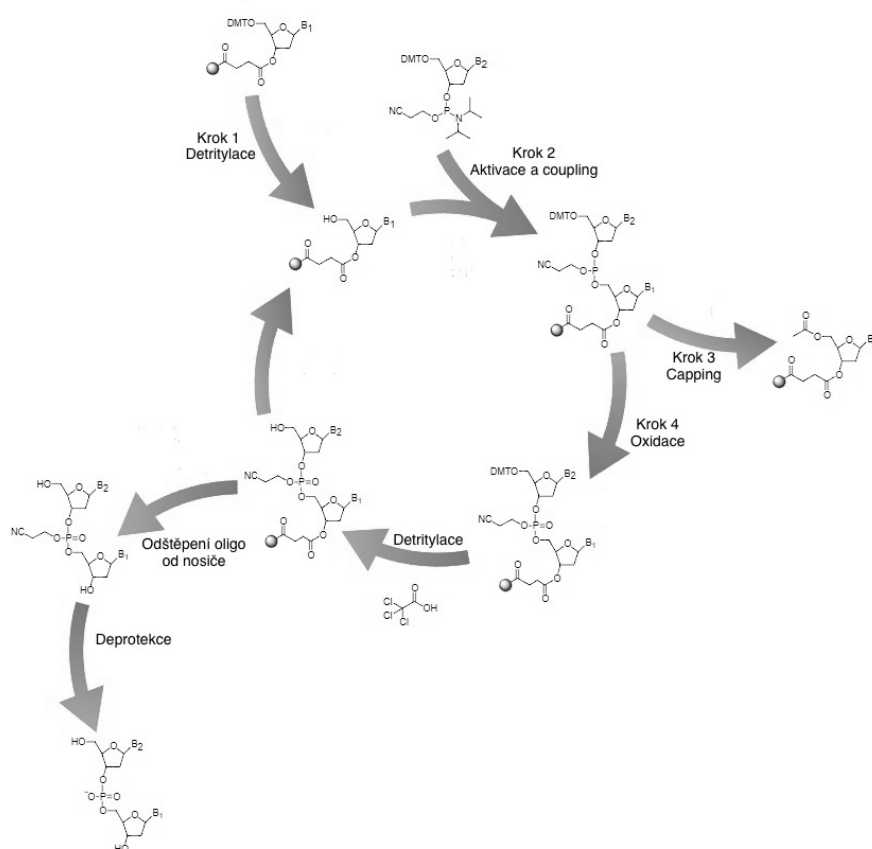
Většina základních kroků syntézy v kapalně fázi se podobá syntéze na pevné fázi. Hlavním rozdílem je, že k syntéze dochází v roztoku nebo v kapalně fázi a není fixována na žádný povrch. Protože tento proces stále probíhá v cyklech, existuje několik doprovodných metod pro odstranění nezreagovaných činidel při zachování prodlouženého oligonukleotidového produktu. Jednou z metod jsou filtrace, promývání, precipitace, chromatografie, dialýza [7].

### 1.1.1.1. Fosforamiditová syntéza

Fosforamiditová metoda byla vynalezena na počátku 80. let 20. století. Za vývojem fosforamiditů stojí Marvin Caruthers. Metoda je vylepšena aplikací technologie pevné fáze a automatizací. Syntéza oligonukleotidů probíhá ve směru 3' až 5' (opačně než u biosyntézy DNA) [5,13].

Fosforamidit je základním prvkem v procesech syntézy oligonukleotidů a přispívá ke stabilitě, účinnosti a přesnosti syntézy vlastních sekvencí DNA a RNA [14]. Ke stabilitě přispívá struktura fosforamiditu, která obsahuje atom fosforu, dva atomy kyslíku, aminoskupinu a alkylovou skupinu. Tato struktura je méně reaktivní než ostatní sloučeniny s fosforem a tím je i sníženo riziko nežádoucích reakcí. Vysoká účinnost je zajištěna díky automatizaci syntézy, kdy je minimalizována chyba při syntéze [30]. Při fosforamiditové syntéze je fosforamidit začleněn do fosforamiditové části, která je klíčovou složkou stavebních bloků používaných k vytváření sekvencí DNA a RNA. Podobně při syntéze oligonukleotidů na pevné fázi je fosforamidit nezbytný pro aktivační a deproteční kroky, které jsou součástí tvorby oligonukleotidů na pevných nosičích [14].

Za cyklus syntézy se přidá jeden nukleotid. Cyklus fosforamiditové syntézy DNA se skládá ze čtyř kroků naznačených na obrázku Obr. 2. Fosforamiditové monomery jsou přiměřeně stabilní v inertní atmosféře a lze je připravit ve velkých množstvích a skladovat je jako suché pevné látky několik měsíců až let před použitím. K protonaci dochází smícháním s aktivátorem (5-ethylthiotetrazol), pouze poté se fosforamiditové monomery stávají reaktivními [5].



Obr. 2 Obecné schéma fosforamiditové syntézy [5]

Na začátku syntézy je první chráněný nukleosid připojen k pevné fázi a operátor vybere pevnou fázi s univerzálním linkerem nebo se používá pevná fáze s již navázanou první bazí. Nukleosid navázaný na nosič má chránící skupinu DMT, její úlohou je zabránit polymeraci a tato chránící skupina musí být z nosiče odstraněna detritylací [5].

#### 1.1.1.1.1. Detritylace

Deprotekce kyselinou trichloroctovou v dichlormethanu je rychlá a kvantitativní. Některé menší komerčně dostupné syntetizátory DNA mají hardware pro měření a záznam výtěžku tritylu pro každý cyklus, takže účinnost syntézy může být monitorována na začátku cyklu v reálném čase [5]. Měření tritylového výtěžku udává, jak účinně probíhá coupling fosforamiditu během každého cyklu přidávání nukleotidů. Sledováním hodnoty absorbance tritylu mohou výzkumní pracovníci vyhodnotit úspěšnost couplingu v procesu syntézy. Nízký výtěžek tritylu může naznačovat problémy, jako je neúplná detritylace nebo coupling, což může ovlivnit kvalitu konečného oligonukleotidového produktu [15].

#### 1.1.1.1.2. Coupling

Po detritylací je nukleosid navázaný na pevné fázi připraven reagovat s další bazí, která je přidána ve formě fosforamiditového monomeru. Velký přebytek roztoku fosforamiditu se smíchá s aktivátorem (5'-ethylthio-1'-H-tetrazol) při dávkování do syntetických kolonek. Fosfitový triester je modifikován na fosfodiesterovou vazbu tak, aby byl lépe odstupitelný a usnadnil pozdější chemické reakce. Rychle se vytěsňuje a vznikne nová vazba fosfor-kyslík, čímž se vytvoří na nosič navázaný fosfitový triester [5].

#### 1.1.1.1.3. Capping

Přebytek fosforamiditu posouvá výrazně rovnováhu reakce směrem k produktu. 100% účinnost couplingu není možná a na pevné fázi vždy zůstává několik volných 5'-hydroxylových skupin. Tyto skupiny by reagovaly až s fosforamiditem v dalším kroku a výsledný oligonukleotid by postrádal jednu bázi a odpovídal by deleční mutaci požadovaného oligonukleotidu. Pokud by takové deleční mutace byly ponechány bez kontroly, hromadily by se s každým následným cyklem a konečným produktem by byla složitá směs oligonukleotidů s nesprávnou sekvencí. Na syntetizátoru se používají dva uzavírací roztoky: CAP A (acetanhydrid, lutidin a THF) a CAP B (*N*-methylimidazol – NMI, pyridin a THF). Tato dvě činidla se smíchají před dodáním do syntetické kolony. Pro každý typ syntetizátoru se může lehce lišit složení roztoků, či koncentrace jejich složek. Po acetylaci jsou 5'-hydroxylové skupiny inertními vůči následným reakcím [5].

#### 1.1.1.1.4. Oxidace

Fosfit-triester vytvořený v konjugačním kroku je nestabilní vůči kyselině a musí být převeden oxidací fosfitu na fosfát před dalším krokem detritylace pomocí kyseliny trichloroctové (TCA). Stabilitu dosáhneme oxidací jódem v přítomnosti vody a pyridinu. Výsledný fosfotriester je

chráněný 2-kyanoethylou skupinou, která zabraňuje nežádoucím reakcím na hydroxylové skupině fosfátu během následujících cyklů syntézy. Na některých syntetizátorech DNA je po oxidaci jódem druhý krok uzavření. Účelem toho je vysušit pevnou fázi, protože zbytková voda z oxidační směsi může inhibovat další couplingovou reakci. Přebytek vody reaguje s acylačním činidlem za vzniku kyseliny octové, která se vymyje ve směsi rozpouštědel THF/pyridin [5].

V dalším cyklu se na začátku odštěpuje DMT chránící skupina z 5'-konce řetězce DNA vázaného na pevné fázi, aby primární hydroxylová skupina mohla reagovat s dalším nukleotidovým fosforamiditem. Cyklus se opakuje jednou pro každou bázi, aby se vytvořil požadovaný oligonukleotid [5]. Počet opakovaných cyklů se rovná požadovanému počtu bází. Syntetizujeme oligonukleotidy od 2 do více jak 120 bází [8].

#### 1.1.1.2. H-fosfonátová syntéza

První použití H-fosfonátů bylo na začátku 50.let 20.století Sirem A. Toddem, kterému tento objev přinesl Nobelovu cenu za chemii. O třicet let později byli H-fosfonáty použity k syntéze oligonukleotidů, přesněji k syntéze 2'-deoxynukleosid H-fosfonátových diesterů aktivací H-fosfonátových monoesterů několika činidly, např. difenylchlorfosfát, pivaloylchlorid a 2,4,6-tri-isopropylbenzensulfonylchlorid. H-fosfonáty jsou zařazeny do kategorie tervalentních fosforových sloučenin obsahují fosforylovou skupinu a atom vodíku na fosforovém centru. Atom fosforu je elektrofilní a chybí mu elektronový pár, proto je odolnější vůči oxidaci než ostatní sloučeniny fosforu [48].

Prvním krokem syntézy je odstranění 5'-dimethoxytritylové chránící skupiny kyselinou fluorovodíkovou. Následuje krok kondenzace, kdy se přidá chráněný 2'-deoxy H-fosfonát monoester a aktivační činidlo (pivaloylchlorid). Reakcí vzniká směsný anhydrid fosfonokarboxylové kyseliny, tento anhydrid je atakován 5'-hydroxyem nukleosidu za vzniku H-fosfonátového diesteru. Tato vazba je stabilní v kyselém prostředí, které je důležité pro odstranění 5'-dimethoxytritylové skupiny, proto není nutná oxidace v každém cyklu syntézy. Prodlužování řetězce bez nutnosti oxidace se proto skládá pouze ze dvou kroků. Oxidace na fosfodiester probíhá za použití vodného roztoku jódu a je dokončena po syntéze oligonukleotidu [48].

Tento druh syntézy oligonukleotidů je alternativou k fosforamiditové syntéze RNA a analogů oligonukleotidu, které jsou nestabilní v kyselém prostředí. Při syntéze DNA nastávají problémy jako je např. dvojitá aktivace a acylace fosforu. Tyto problémy nejsou tak zřetelné při syntéze RNA při použití ribonukleosidů s 2'-chránící skupinou [48].

#### 1.1.1.3. Pevné a rozpustné fáze, na kterých probíhá syntéza

Pevná fáze má několik zavedených termínů, jedním z nich jsou support a nosič, termín support se používá v běžné mluvě. Syntéza na pevné fázi je široce používána v syntéze peptidů, oligonukleotidů, oligosacharidů a kombinatorické chemii. Nejlépe probíhá syntéza na nebobtnajících nebo málo bobtnajících pevných fázích. Syntéza na pevné fázi má řadu výhod. Jedna z nich je, že nečistoty a přebytky činidel jsou vymyty a tudíž není nutné čištění meziprojektu po každém kroku. Další výhodou je izolace produktu z pevné fáze, kde je potřeba čištění [10]. Proces je přístupný automatizaci na počítačem řízených syntetizátorech [5]. Jediný

automatizovaný syntetizátor dokáže standardní fosforamiditovou chemií vyrobit téměř jakýkoli oligonukleotid opravdu rychle a reprodukovatelně, čímž se eliminuje jakákoli lidská chyba při výrobě [9]. Jednou z nevýhod je, že při vyšším zatížení (např. při výrobě velkého množství oligonukleotidů najednou nebo při syntéze delší sekvence) může docházet ke sterickému rušení a ovlivní to účinnost. Sterické rušení znamená interakce mezi reaktanty a pevnou fází, což snižuje dostupnost aktivních míst pro reakci. To může zpomalit nebo zhoršit kvalitu syntézy. [10].

Pevné fáze jsou nerozpustné částice o průměru 50-200  $\mu\text{m}$ , na které se oligonukleotid váže během syntézy [5]. Alternativy k nativní (nemodifikované) fázi CPG, se týkají kopolymerů styrenu a divinylbenzenu (DVB) jako zesítujících činidel [10]. Jako nejužitečnější se ukázaly CPG a polystyren [5]. MPPS je vysoce zesítovaný polystyren, který získáme polymerací DVB, styrenu a 4-chlormethylstyrenu [11].

CPG je tuhé a s hlubokými póry, ve kterých probíhá syntéza oligonukleotidů. Skleněné fáze s póry 500  $\text{\AA}$  (50 nm) jsou mechanicky robustní a používají se při syntéze krátkých oligonukleotidů. Na pevné fázi o velikosti pórů 500  $\text{\AA}$  se nejlépe syntetizují krátké oligonukleotidy do délky 40 bází, poté výtěžnost s délkou oligonukleotidů klesá. Pevná fáze CPG 1000  $\text{\AA}$  je dostatečná pro syntézu oligonukleotidů až do délky 100 bází a pro delší oligonukleotidy se používá 2000  $\text{\AA}$  nosiče či větší [5].

Vysoce zesítované polystyrenové kuličky mají výhodu v dobrých vlastnostech vylučování vlhkosti a umožňují velmi účinnou syntézu oligonukleotidů, zejména v malém měřítku (např. 40 nmol) [5]. Další výhodou polystyrenových supportů je snazší manipulace s malými množstvími syntetizovaného materiálu, tím se snižují i manipulační ztráty produktu. Mezi nevýhody patří často zmiňovaný pokles výtěžnosti v důsledku prodlužujícího se řetězce a kumulace nedokonalostí při syntéze. S prodlužujícím se řetězcem nastává i problém s čištěním produktu od nepotřebných chybných sekvencí [31].

Univerzální pevné fáze se staly klíčovými od přelomu druhého tisíciletí díky rozvoji vysoce výkonných syntetizátorů DNA. Tyto fáze nahrazují tradiční syntetické fáze, protože mají navázaný univerzální linker, což umožňuje připojení jakéhokoli požadovaného nukleotidu na začátku syntézy. Tímto způsobem lze použít jednu pevnou fázi pro všechny syntézy, což zjednodušuje proces a minimalizuje riziko chyb při výběru typu pevné fáze. Vysoká efektivita syntézy a možnost dosáhnout až 95% výtěžku požadovaného oligonukleotidu jsou dalšími výhodami této technologie [12, 41].

Pevné fáze můžeme dělit např. dle velikosti pórů (500 $\text{\AA}$ , 1000 $\text{\AA}$ , 1400 $\text{\AA}$ , 2000 $\text{\AA}$ ) nebo typu modifikátoru (biotin, rhodamin) [12]. Porozita je důležitým faktorem při výběru pevných fází, znamená přítomnost pórů nebo dutin v materiálu, které mohou ovlivnit přístupnost rostoucího oligonukleotidového řetězce pro vstupující činidla a schopnost odstraňovat vedlejší produkty během procesu syntézy. Volba velikosti pórů a typu pevné fáze by měla vycházet z požadavků procesu syntézy oligonukleotidů, včetně délky a složitosti oligonukleotidu, požadované čistoty, výtěžnosti a rozsahu syntézy [16].

Syntéza oligonukleotidů v kapalně fázi (liquid-phase oligonucleotide synthesis - LPOS) je využívána ve farmaceutickém průmyslu. Její výkon není ovlivněn rozsahem syntézy a lze ji provádět v konvenčních vsádkových reaktorech používaných při výrobě současných aktivních farmaceutických složek. Nečistoty se nemusí vymývat po každém kroku. Mezi nevýhody patří

nutná pečlivá manipulace a monitorování během celého procesu syntézy a náchylnost ke kontaminaci [10]. LPOS založená na nanofiltraci organickým rozpouštědlem (OSN) má velice nízký výtěžek syntézy (9-merový oligonukleotid s výtěžkem pouze 39%), což není vhodné pro průmyslovou výrobu. Řešením jsou kaskádové membrány, které vrací ztracený oligomer z první membrány aniž by to ovlivnilo finální čistotu produktu. Pro snížení nákladů a zkrácení doby procesu lze snížit počet diafiltrací v každém cyklu. LPOS má vysokou spotřebu rozpouštědel a proto je vhodné používat kombinaci OSN s jednotkou pro zpětné získávání rozpouštědel [47].

Vzhledem k vysoké spotřebě rozpouštědel při syntéze oligonukleotidů je důležité optimalizovat procesy, což zahrnuje počáteční velikost syntézní reakce, která je přesně definována a vyjadřuje se v jednotkách mikromol [ $\mu\text{mol}$ ]. Rozsah požadavku na vlastní syntézu se myslí počáteční velikost syntézní reakce. Stupnice syntézy jsou přesně definované množství, protože víme, kolik složek budeme vkládat do reakcí. Obecně uvádíme měřítko syntézy v  $\mu\text{mol}$  [11]. Mezi často používané scale patří 20 nmol, 40 nmol, 200 nmol, 1  $\mu\text{mol}$  a 10  $\mu\text{mol}$ . Množství výsledného produktu se bude pohybovat okolo zadané scale. Množství produktu může ovlivnit typ purifikace nebo výtěžek syntézy, který se snižuje s délkou produktu [49].

#### 1.1.1.4. Schéma přístroje

Syntetizátory jsou tvořeny komplexním systémem komponent, které společně zajišťují efektivní průběh syntézy. Základem je systém pro řízení tekutin, zahrnující ventily pro amidity (AMD) a reagentie, které regulují přívod aktivovaných nukleotidů (A, C, G, T) a chemikálií (acetonitril, oxidační činidla, TCA apod.) do reakčního systému. Součástí tohoto systému je také přívod plynů, kdy argon vytváří inertní prostředí, zatímco stlačený vzduch z kompresoru zajišťuje tlakové řízení procesů. Oba tlakové přívody jsou kontrolovány a řízeny regulátory [68,69].

Mechanické propojení jednotlivých částí zajišťují vrchní a spodní luer adaptéry, které napojují syntetické kolony na fluidní systém, a hlavní valveblock neboli centrální uzel syntetizátoru. K valveblocku jsou připojeny hadičky reagentů, amiditů a plynů, a jeho funkcí je distribuce těchto tekutin a plynů do syntetických kolon. Samotné syntetické kolony slouží k fixaci pevné fáze, například CPG, na níž probíhá syntéza oligonukleotidového řetězce. Každá kolona je nezávislá, což umožňuje paralelní syntézu více sekvencí [68,69].

Zásobníky reagentů a amiditů tvoří nedílnou součást přístroje. Amiditové lahve obsahují aktivované nukleotidy včetně jejich modifikovaných variant, zatímco reagenční lahve uchovávají kritické složky jako TET aktivátor, Cap A a B, TCA nebo acetonitril (ACN). Průtoková cesta syntetizátoru je optimalizována pro minimalizaci ztrát amiditů a reagentů díky přesnému dávkování. Důležitou součástí je recirkulační smyčka, která umožňuje opakovaný průtok reakční směsi přes kolonu, čímž se zvyšuje účinnost [68,69].



Celý proces je řízen softwarem, který koordinuje časování syntézy, reguluje tlak a teplotu, a monitoruje klíčové parametry v reálném čase. Tekutiny a plyny jsou distribuovány přes valveblock do reakčních kolon, přičemž recirkulační smyčka a regulace tlaku zajišťují vysokou účinnost syntézy (>98 % na krok) a minimalizaci chyb. Podrobnějšímu popisu softwaru a spuštění samotné syntézy se budeme věnovat v praktické části [68,69].

## 1.2. Analytické metody využívané pro ověření kvality syntézy

Analytické metody mají zásadní význam při ověřování kvality syntézy oligonukleotidů a zajišťují výrobu vysoce kvalitních oligonukleotidů pro různé aplikace v molekulární biologii. Jednou z používaných metod je trityl monitor u kterého můžeme sledovat výtěžek tritylu pro každý cyklus. Což znamená, že monitorujeme účinnost syntézy v reálném čase [15]. Trityl monitor poskytuje počáteční odhad výtěžku a čistoty produktu oligonukleotidu [45]. Principem je měření vodivosti tritylového kationtu, který se uvolňuje v každém cyklu syntézy po přidání báze [67, 46]. Vodivé vlastnosti tritylového kationtu umožňují kvantifikaci v reálném čase jeho integrací celkové vodivosti proudu během kroku detritylace. V syntetizátoru za kolonou je umístěna vodivostní cela, která zpracovává signál vodivosti a zobrazuje ho jako aktuální postupný výtěžek i jako celkový výtěžek [46].

Absorbance je alternativní metodou pro kvantifikaci množství uvolněného tritylu během syntézy DNA [65]. Tradičně se měření tritylového kationtu provádělo zachycováním tritylového výtoku pomocí frakčního sběrače, následným ředěním kyselým roztokem a kvantifikací pomocí UV/VIS spektroskopie [66]. V současnosti se pro sledování účinnosti spojování během syntézy oligonukleotidů používá tritylové monitorování, které zahrnuje měření absorbance tritylového kationtu vznikajícího odštěpením tritylové části z rostoucího oligonukleotidového řetězce. Koncentrace tritylu se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 498 nm, což umožňuje efektivní sledování a kontrolu kvality syntézy [67].

Další používanou metodou je sledování koncentrace pomocí absorbance spektrofotometricky. Pro stanovení čistoty používáme vysokouúčinnou kapalinou chromatografii (HPLC), pro její citlivost a rozlišení [19]. Pro stanovení molekulové hmotnosti používáme LC-MS nebo MALDI-TOF, ten dokáže přesně měřit hmotnost sekvencí DNA či RNA [22]. Existuje mnoho dalších metod pro ověření kvality syntézy např. elektroforéza, ale v této práci se budeme zabývat výše zmíněnými.

### 1.2.1. Měření absorbance

Měření absorbance syntetických oligonukleotidů lze provést rychle a přímo pomocí spektrofotometrů, které jsou snadno kalibrovatelné. Využívá se měření ve formátu destičky, která nesmí být vyrobena z materiálu, který absorbuje při 230 – 280 nm. Při tomto měření musíme zohledňovat např. konus hladiny, výšku hladiny a její stanovení vyšší vlnovou délkou. Přímé měření absorbance nukleových kyselin probíhá při 260 nm. Poměr absorbance 260 nm/280 nm poskytuje míru čistoty vzorků. Většina vzorků je natolik čistá, že nepotřebují purifikaci před samotnou kvantifikací. Spektrofotometry mají významné výhody v použití malého množství cenných vzorků, měření jsou rychlá a vyžadují minimální přípravu vzorků [17].

Koncentrace oligonukleotidů v roztoku se stanovuje pomocí spektrofotometrů na základě absorpce světla o vlnové délce 260 nm (absorpční maximum oligonukleotidů/DNA/nukleovýchází). K absorpci světla dochází díky delokalizovaným vazbámází. Protože nukleotidy absorbují část UV světla, intenzita procházejícího UV světla je snížena. Absorbance se určuje podle následujícího vzorce:

$$A_{260} = \log \frac{I_0}{I}$$

$A_{260}$  = absorbance při 260 nm;  $I_0$  = intenzita dopadajícího světla;  $I$  = intenzita procházejícího světla [18].

Po odečtení absorbance použijeme Lambert-Beerův zákon, který dá do souvislosti hodnotu absorbance s koncentrací absorbujících oligonukleotidů následovně:

$$c = \frac{A_{260}}{\varepsilon_{260} \cdot l}$$

$A_{260}$  = absorbance při 260 nm,  $\varepsilon_{260}$  = molární absorpční koeficient oligonukleotidu při 260 nm v L/mol·cm,  $c$  = koncentrace v mol/L,  $l$  = délka dráhy v cm [18].

Molární absorpční koeficient je zásadní součástí Lambert-Beerova zákona a udává, jak silně absorbující nukleotid snižuje intenzitu UV světla během jeho průchodu. Protože absorbance každého nukleotidu je odlišná, počet jednotlivýchází a délka sekvence ovlivní konečnou absorbanci konkrétního oligonukleotidu, který kvantifikujeme. Proto se dosáhne největší přesnosti, když se molární absorpční koeficient vypočítá pro každý oligonukleotid [18].

V Tabulka 1 jsou uvedeny hodnoty molárního absorpčního koeficientu pro každouází [27]. K používaným metodám stanovení koncentrace pro přesné měření koncentrací oligonukleotidů jsou absorbance, digitální PCR a vazba fluorescenčního barviva. Absorbance je z těchto metod nejjednodušší, nejrychlejší, nejméně náročná a poskytuje spolehlivé výsledky [44].

Báze	$\varepsilon_{260}$ [l/mmol/cm]
A	15,4
C	7,3
G	11,7
T	8,8

Tabulka 1 Molární absorpční koeficienty pro každouází [27]

### 1.2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

Chromatografické techniky jsou považovány za nejvýznamnější techniky používané pro detekci, charakterizaci a identifikaci různých nečistot a degradačních produktů jako jsou např. oxidační produkty nebo produkty hydrolýzy. Stopové množství nečistot a produktů degradace je velmi obtížné plně charakterizovat [19]. HPLC zůstává nejrozšířenější analytickou

technologií, zejména pro stanovení čistoty a porovnání jednotlivých šarží sloučenin připravených pro farmaceutické použití. Nejmodernější v separacích RNA oligonukleotidů je v současnosti kapilární gelová elektroforéza (CGE) a HPLC ve spojení s iontově párovou reverzní fází (IP-RP) nebo s módy výměnou iontů (IEX) [20, 43].

HPLC je technologie sloupcové kapalinové chromatografie, která využívá vysokých tlaků k rozdělení vzorku na základě rozdílů v relativní afinitě. HPLC se obecně skládá z kolony, která obsahuje stacionární fázi (SF), pumpu, která pohání mobilní fázi (MF) přes kolonu, a detektoru, který detekuje signál molekul [25]. Kapalná MF nese směs sloučenin kolonou naplněnou částicemi, sloučeniny v MF interagují se SF v různé míře a jsou v procesu odděleny [20]. Retenční čas je doba, za kterou se určitý analyt eluuje. Retenční čas je ovlivněn interakcemi mezi SF, analyzovanými molekulami a použitou MF. Analyzované vzorky se přidávají v malých množstvích do proudu MF a jsou zpomalovány chemickými nebo fyzikálními interakcemi se SF [25].

HPLC s reverzními fázemi (RP-HPLC), iontově výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (IE-HPLC) a ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC) poskytují kvantitativní hodnocení čistoty oligonukleotidů [21].

RP-HPLC je obecně založena na rozdílu v hydrofobnosti mezi molekulami/sloučeninami. Pro analýzu a separaci oligonukleotidů se používá IP-RP HPLC, kde se využívá tvorby iontových párů pro separaci sekvencí plné délky a kratších sekvencí (neobsahují tritylové skupiny). Rozlišení je vynikající pro analýzu až 50 bází, v některých případech až na 80 bází. RP-HPLC je výkonná technika pro separaci široké škály molekul [21].

IE-HPLC je založena na počtu nabitých skupin (fosfátů) v oligonukleotidovém skeletu. Aniontová výměnná metoda zahrnuje použití MF s gradientem soli na kvartérní amoniové SF. Rozlišení je vynikající pro analýzu až 40 bází. Primárním důvodem pro použití IE-HPLC na rozdíl od RP-HPLC je analýza oligonukleotidů s významnou sekundární strukturou, která se typicky nachází v sekvencích s vysokým obsahem guaninu a cytosinu. IE-HPLC je pro takové oligonukleotidy účinná, protože MF má vysoce alkalické pH (NaCl a KCl pro úpravu iontové síly, KOH a NaOH pro alkalické pH, organická rozpouštědla pro lepší eluci analytů), které narušuje vodíkové vazby a tím i sekundární strukturu [21].

Pokroky v oblasti částicové chemie, která se zabývá vývojem SF, přeměnily standardní HPLC na ultravýkonné přístroje. Tato chemie se týká pokroku ve vývoji SF, které jsou tvořeny částicemi s přesně definovanými vlastnostmi. UPLC umožňuje účinnou separaci krátkých a dlouhých oligonukleotidů v rozlišení jedné báze. Účinnost přístroje umožňuje kratší separační doby, čímž se zkracuje celková doba analýzy [21]. UPLC používá menší částice SF než HPLC, to umožňuje vyšší účinnost separace, ostřejší píky i čas celkové analýzy. Další výhodou oproti HPLC je ve vyšší citlivosti analýzy, tím můžeme detekovat i sloučeniny s nízkým obsahem, stopové prvky a nečistoty. Vyšší citlivost může být daná např. menšími částicemi SF, vyšším provozním tlakem nebo optimalizovaným rozměrem kolon. UPLC nabízí řadu výhod, včetně nižší spotřeby rozpouštědel a vyšší účinnosti separace, což je zvláště důležité při analýze složitých biologických vzorků. Jedním z příkladů takových vzorků jsou oligonukleotidy s vysokým obsahem G a C, které mají tendenci tvořit stabilní sekundární struktury. Pro tyto typy molekul se často používá IE-HPLC, která umožňuje efektivní separaci i těch nejkompexnějších struktur. [32].

### 1.2.3. Hmotnostní spektrometrie

Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace - hmotnostní spektrometrie doby letu (MALDI-TOF MS) je rychlá, přesná a citlivá technika pro poskytování informací o molekulové hmotnosti sloučenin, jako jsou proteiny, peptidy, oligonukleotidy, nukleové kyseliny a sacharidy. Je to cenná technika díky její relativně vysoké toleranci vůči kontaminacím (solím) [22]. Díky této technice můžeme charakterizovat oligonukleotidy o délkách pod 50 bází [24]. Rozsah molekulových hmotností, které lze rutinně analyzovat pomocí MALDI-TOF MS, se pohybuje od cca. 100 Da - 150 000 Da [22]. Kvalita výsledků MALDI-TOF MS je závislá na zvolené MALDI matici, a proto vybíráme vhodnou matici pro konkrétní typ analytu [23].

Pro rychlé a spolehlivé ověření identity a kvality velkého množství oligonukleotidů, jako jsou PCR primery pro hromadnou výrobu, je MALDI-TOF MS ideální analytickou technikou. Tato metoda umožňuje rychlé zajištění a dodání oligonukleotidů zákazníkům s garancí jejich správnosti. Nevýhodou MALDI-TOF MS je, že účinnost ionizace i rozlišení postupu, rychle klesá při sekvencích větších než 50 bází (>13 kDa). Zdroj laseru použitý pro generování náboje může být škodlivý pro analýzu modifikovaných oligonukleotidů, které jsou fotosenzitivní. Lze použít hmotnostní spektrometrii s ionizací elektrosprejem (ESI-MS), abychom se vyhnuli těmto omezením [24]. ESI-MS funguje v režimu kontinuálního průtoku oproti MALDI-TOF MS, která vyžaduje přípravu a krystalizaci vzorku. ESI-MS je také více citlivá a vhodná pro analýzu biomolekul [33].

MALDI-TOF MS využívá laserové světlo (334 nm) ve spojení s chemickou maticí k ionizaci vzorku [22]. Molekuly matrice absorbují energii a přenášejí tuto energii na sledované molekuly za přidání protonu (proteiny a peptidy) nebo sodíkového iontu (sacharidy) [24]. Poté se molekuly urychlují rozdílem napětí mezi destičkou na vzorek a drátem mřížky [22]. Všechny ionty dostávají stejné množství energie, a proto doba letu k detektoru koreluje s poměrem  $m/z$  iontu [22]. Doba letu TOF je přímo úměrná hmotnosti molekuly a má rozlišení přibližně 0,03 %, tj. +/- 3 Da na 10 kDa oligonukleotidu [24]. Pro výpočet molekulové hmotnosti ( $MW$ ) z tohoto poměru  $m/z$  je třeba vzít v úvahu náboj vytvořeného iontu:

$$x = \frac{M + n}{n}$$
$$y = \frac{M + n + 1}{n + 1}$$

$M$  = molekulová hmotnost,  $n$  = náboj vytvořeného iontu [22, 26].

### 1.3. Validace procesu syntézy

Zvýšený výzkum v oblasti genomiky a komerční aplikace vyvolaly potřebu velkého množství DNA, RNA a syntetických oligonukleotidů. Pro oba typy vzorků DNA a RNA jsou k dispozici dvě primární platformy nukleových kyselin pro syntézu syntetických oligonukleotidů: chemická syntéza na pevné fázi a enzymově asistovaná syntéza na mikročipech. V této práci se zabýváme pouze chemickou syntézou oligonukleotidů na pevné fázi s následným použitím např. pro ligaci. Metody kontroly kvality pro oba typy vzorků zahrnují posouzení relativní čistoty vzorku, přibližného množství a sekvence [28].

Validace procesu je důležitou součástí návrhu kvality podle FDA i nedílnou součástí správné výrobní praxe [50]. Pro tři kroky validace procesu používáme tyto zkratky: Instalační kvalifikace (IQ), Provozní kvalifikace (OQ) a Výkonnostní kvalifikace (PQ). Tyto kvalifikace zajišťují, že jakékoli zařízení, které používáte k výrobě požadovaných produktů, bude vždy fungovat tak, jak má. I jedna porucha ve výrobním procesu může mít zničující následky [51].

Při validaci musí být zaveden postup, který zajistí, že validovaný proces je pravidelně přezkoumáván a že proces konzistentně produkuje materiál splňující jeho specifikace. Pravidelné ověřování procesu lze aplikovat buď na celý proces nebo jen na jednotlivé části procesu. Údaje z validací by měly být hodnoceny podle plánu CPV, aby se vyhodnotila schopnost správného fungování procesu, včetně vytváření produktů a meziproductů odpovídající kvality [50].

Validace procesu zahrnuje shromažďování a vyhodnocování dat, od návrhu procesu až po výrobu, která vytváří důkazy, že proces je schopen kontinuálně dodávat kvalitní produkt. K dokončení validace procesu, musí výrobci provést a zdokumentovat všechny tři fáze (IQ, OQ a PQ) na zařízení, které budou používat k výrobě produktů. Každá fáze ověřuje jiné aspekty zařízení a souvisejících procesů. Fáze validace procesu musí probíhat v pořadí IQ, OQ a PQ. Provozní kvalifikace tedy nemůže nastat, dokud není zařízení správně nainstalováno [51].

Pro validaci procesu je nutné identifikovat všechny faktory, které mohou ovlivnit kvalitu produktu, jsou to např. výrobní zařízení, kvalita surovin a činidel, zařízení, školení personálu atd. V případě výroby oligonukleotidů existuje několik jedinečných parametrů, které souvisejí s procesem. Musí být dobře pochopeny a kontrolovány, aby byla zajištěna konzistentní kvalita oligonukleotidového produktu. Automatizované syntetizátory DNA dodávají činidla, rozpouštědla a nukleosidové fosforamiditidy do reakční nádoby pod kontrolou počítače. Systém je řízen počítačem a skládá se z několika hlavních komponent jako je reakční nádoba s náplní v pevné fázi, zásobníky syntetických činidel, zásobníky fosforamiditových monomerů, dodávky činidel a rozpouštědel, regulační ventily, ovládání počítače a softwaru, nádrže na suchá rozpouštědla a odpadní rozpouštědla. Testy IQ a OQ ověřují správnou instalaci a provoz softwarově řízeného ovládání ventilů, zařízení pro regulaci tlaku, průtoků a všech ventilů reaktoru. PQ testy ověřují, že provoz systémů je konzistentní. Kontrolu lze provést syntézou specifické oligonukleotidové sekvence. Může být použita testovací sekvence ze všech čtyř nukleosidových monomerů, aby byly zapojeny všechny čtyři zásobníky fosforamiditových monomerů. Po syntéze je sekvence analyzována, aby se prokázalo nasyntetizování řetězce o správné MW. Tím se prokáže i funkce počítačem řízené syntézy DNA [52].

Údržba procesu je vyžadována, pokud je zařízení v ověřeném stavu a je licencováno, což zahrnuje splnění všech potřebných regulačních požadavků a oficiální schválení příslušnými autoritami pro provoz. Do této fáze procesní validace jsou zařazeny např. zajištění kvality, procesní kontrola, výroba, kontrola kvality a validace. Dále jsou zavedeny monitorovací programy pro sledování vstupních a výstupních parametrů výrobního procesu. Je poskytnut přehled kritických a nekritických procesních parametrů spojených s chemií oligonukleotidů, výrobním zařízením, vybavením a surovinami, které ovlivňují kvalitu produktu. Nakonec jsou diskutovány problémy, které se jedinečně týkají výroby oligonukleotidů, jako je validace čištění a mikrobiologické kontroly [52].

### 1.3.1. Instalační kvalifikace (IQ)

Cílem IQ je správná instalace zařízení. Instalační kvalifikace musí být provedena v souladu s požadavky výrobce. Před testováním, zda zařízení funguje správně, musíte vědět, že bylo správně dodáno, nainstalováno a nakonfigurováno. IQ je dokumentovaný proces, který ověřuje zařízení a všechny jeho součásti podle kontrolního seznamu specifikací od výrobce [51].

V IQ jsou často zahrnuty tyto kroky: porovnání obsahu balíku s balicím listem, kontrola poškození zařízení, kontrola instalace jednotlivých součástí zařízení na správném místě, kontrola připojení k jiným zařízením, ověření instalace pomocného zařízení, ověření napájení zařízení, kontrola, jestli provozní podmínky a prostředí odpovídají specifikacím výrobce, záznam kalibrace a data ověření pro zařízení používaná v IQ, uspořádání příruček, certifikátů a další potřebné dokumentace [51]. Vadné zařízení nebo problémy zjištěné během procesu jsou přidány na seznam nedodělků projektu. Položky seznamu nedodělků se také nazývají instalační problémy [53].



Obr. 5 Průvodce krok za krokem k úspěšné kvalifikaci instalace [29]

### 1.3.2. Provozní kvalifikace (OQ)

Cílem provozní kvalifikace je zjistit, zda vše správně funguje, jaké jsou provozní limity zařízení a snížit pravděpodobnost provozních poruch. Během provozní kvalifikace bude zařízení testováno, aby se určily limity řízení procesu, možné způsoby selhání, a případy nejhoršího scénáře. OQ zajišťuje, že zařízení funguje v souladu s požadavky uživatele a v provozním rozsahu specifikovaném výrobcem zařízení [51]. Úspěšnost provozu je definována jako fyzický systém fungující podle návrhu. A veškeré nedostatky budou zapsány na seznam oprav projektu [53].

Provozní kvalifikace zahrnuje testování všech různých funkcí zařízení a stanovení provozních parametrů zařízení, které mohou zahrnovat: displeje a provozní signály, regulace kolísání teploty, systémy měření a regulace vlhkosti, otáčky ventilátoru nebo motoru, regulátory vzduchových klapek, přístup ke kartě a čtečce, časovače a spouštěče aktivity [51].

### 1.3.3. Kvalifikace výkonu (PQ)

Cílem PQ je zjistit, zda je přístroj bezpečný a jestli produkuje konzistentní přijatelné výsledky za normálních provozních podmínek. Výkonnostní kvalifikace se podobá provozní kvalifikaci, ale PQ se používá k ověření konzistentních správných výsledků. To znamená, že PQ by mělo být prováděno ve skutečném zařízení s vyškoleným personálem, s využitím nástrojů, vybavení, kontrolních postupů a výrobního procesu, které budou použity k výrobě produktu [51].

Do této fáze validace je zapojena výroba, procesní věda, validace, zajištění kvality a regulační záležitosti. Operace jsou dokumentovány pomocí schválených PQ protokolů. Z hlediska konzistence a splnění kritérií přijatelnosti jsou analyzovány vstupní a výstupní parametry, chromatogramy, doby procesu a integrita přenosu produktu. Regulační diagramy se používají pro analýzu konzistence vstupu a výstupu. Také se analyzuje konzistence vybavení a personálu. Fáze výkonnostní kvalifikace končí dokončením dokumentace včetně všech procesních validačních studií definovaných hlavním validačním protokolem [52].

FDA doporučuje vytvořit písemný protokol PQ, který obsahuje následující informace: výrobní podmínky, provozní parametry, použité suroviny, plán vyhodnocení dat, provedené testy na zařízení, a kritéria přijatelnosti pro každé z nich, rozsáhlý plán vzorkování poskytující jistotu kvality, kritéria pro rozhodování o účinnosti procesu na základě vědeckých poznatků a rizik, návrh zařízení a kvalifikace a školení personálu, stav validace analytických metod používaných k měření procesu, materiálů a případného produktu, kontrola a schválení protokolu všemi příslušnými odděleními a týmem kvality. Jakmile je protokol zkontrolován a schválen, může PQ začít. Poté výrobce připraví zprávu hodnotící dodržování protokolu, shrnující shromážděná data a řešení případných výrobních neshod [51].

Problémy při kvalifikacích jsou rozděleny do dvou skupin, na okamžité problémy a problémy na seznamu. Okamžité problémy mohou být odstraněny během procesu kontroly a nejsou dokumentovány pro budoucí analýzu. Problémy na seznamu nelze odstranit během kontroly a vyžadují důkladné odstranění chyb a řešení problémů. Dodavatelé jsou o těchto položkách na seznamu informováni, aby mohly provést příslušné opravy. Jakmile jsou identifikované problémy dodavatelem opraveny a znovu potvrzeny kontrolou, jsou předány do provozu [53].

Validační dokumentace je rozsáhlá a zahrnuje validační plány a validační protokoly. Hlavní validační plán je užitečným základem a poskytuje přehled několika dokumentů souvisejících s validací. Validační protokoly jsou také nezbytným základem. Protokol musí uvádět, co se bude provádět, jak se to bude provádět a jaký musí být výsledek, aby byla validace úspěšná [54].

### 1.3.4. Kritéria pro přijatelnost

Kritéria přijatelnosti jsou důležitou součástí protokolu o procesu kvalifikace. Těmito kritérii se rozhoduje, zda je postup úspěšný, či nikoli. Kritéria přijatelnosti by měli dodržovat několik standardů jako je např. informace o odpovídající úrovni přesnosti a spolehlivosti, měly by být pozorovatelné, mít sledovatelný referenční standard, měly by být založeny na specifikacích definovaných prodejcem, musí být jednoznačné, jasné a měřitelné po dokončení zkoušek [55].

#### 1.3.4.1. Čistota syntetizovaných oligonukleotidů

Pro dosažení vysoce kvalitního a čistého oligonukleotidového produktu je důležitá kontrola kvality výchozích fosforamiditových materiálů. Pro testování a identifikaci různých fosforamiditů se používá metoda kapalinové chromatografie s reverzní fází. Analytické metody, které se používají k posouzení čistoty, jsou ztíženy nestabilitou fosforamiditů. Ty jsou náchylné k oxidaci při působení vody, což vede k nesprávnému posouzení celkové čistoty produktu. Příprava vzorků ve vyšších koncentracích (cca 1 mg/ml) a provádění nástřiků z oddělených lahviček snižuje oxidaci. Kritéria přijatelnosti zohledňují zvýšenou oxidaci při nižších koncentracích [57].

Ke stanovení hmotnosti dvouvláknových oligonukleotidů jsou použity techniky MALDI [56]. Odsolením se odstraní malé molekuly nečistot, které jsou zbytkovými vedlejšími produkty deprotektace a štěpení. RP-HPLC má vyšší rozlišení, tím pádem umožňuje vyšší čistotu. Standardně RP-HPLC dosahuje čistoty více než 85 %. IP-RP-HPLC je separační metoda, která zlepšuje separaci sloučenin iontové povahy pomocí iontových asociací mezi analyty a opačně nabitými ionty. Tato technika využívá mobilní fázi obsahující organické rozpouštědlo a iontové párovací činidlo, které neutralizuje náboj analyzovaných molekul. Stacionární fáze je nepolární, typicky modifikovaný silikagel [63]. IP-RP-HPLC se ukázala jako účinná metoda pro spolehlivou analýzu DNA. Je mnohem rychlejší a bezpečnější alternativou ke konvenčním metodám separace a kvantifikace DNA [64]. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE) rozděluje oligonukleotidy na základě molekulové hmotnosti. Tato technika má velice vysoké rozlišení a tím pádem i vysokou úroveň dosažitelné čistoty nad 95 %. Doporučuje se pro oligonukleotidy s počtem bází nad 50 [61].

#### 1.3.4.2. Výtěžnost syntetizovaných oligonukleotidů

V reálném světě se báze nespojují se 100% účinností, ale účinnost vazby v každém kroku syntézy je menší než 100 %. Každý typ báze má jinou účinnost vazby, ta se liší i s polohou v rostoucím oligonukleotidu. Dalším faktorem určujícím účinnost vazby je konkrétní syntetizátor. Lze vypočítat teoretický výtěžek syntézy za předpokladu konstantní účinnosti vazby oligonukleotidu [59].

$$Y = (eff)^{n-1}$$

Y = výtěžek, eff = průměrná účinnost vazby, n = počet bází v oligonukleotidu [59]

Průměrnou postupnou účinnost používáme při stanovení relativní účinnosti každého cyklu syntézy. Absolutní výtěžek se využívá pro stanovení, kolik miligramů produktu je přítomno pro následné čištění. Pokud je syntéza provedena na 1-mmol koloně, očekává se absolutní výtěžek blízko hodnotě 1 mmol [60]. Pro dosažení vysokých výtěžků, musí být odstraněna 5'-hydroxylová chránící skupina se 100% účinností v každém cyklu a minimalizace vedlejší reakce (depurinace) [62].

Syntéza velmi dlouhých oligonukleotidů nad 60 bází, je problematická. Už při syntéze oligonukleotidu s více než 40ti bázemi se doporučuje produkt purifikovat. Pokud bude oligonukleotid použit při klonování nebo při cílené mutagenezi, je doporučeno oligonukleotid vyčistit i při délce kratší než 40 bází. Toto čištění ušetří čas i finance při výzkumu [59].

#### 1.3.4.3. Profil nečistot

Chromatografická separace mezi cílovou molekulou a úzce příbuznými variantami může být obtížná a nepraktická. Nečistoty mohou zahrnovat zbytková jednotlivá vlákna a agregovaná vlákna. Tyto nečistoty lze měřit pouze pomocí nedenaturačních technik, které neumožňují detekci a kvantifikaci jednotlivých nečistot, jelikož mají nedostatečné chromatografické rozlišení. Denaturační techniky způsobují disociaci všech molekul, tím se zlepšuje chromatografické rozlišení mezi jednotlivými nečistotami oproti nedenaturačním technikám. Tato technika umožňuje hlásit, kvantifikovat a identifikovat jednotlivé nečistoty nebo jejich skupiny [56].

Je důležité identifikovat a kvantifikovat nečistoty, nejlépe je klasifikovat dle jejich specifické modifikační chemie. Tato chemie může zahrnovat chemické úpravy, které vedou ke zlepšení jejich vlastností, např. změna bází, přidání funkčních skupin. K tomu používáme různé denaturační analytické metody jako je IP HPLC, ESI-MS, IPHPLC-ESI-MS. Hlavní výzvou je vyvinout metodu, která bude schopna oddělit a kvantifikovat zbytky vláken a agregovaných složek aniž by došlo k jeho narušení či poškození. Chromatografická metoda jako je velikostní vylučovací chromatografie (SEC), je metoda s nejmenším vlivem na strukturu vlákna, ale má omezenou rozlišovací schopnost. Kromě SEC patří mezi běžně používané nedenaturované techniky IE-HPLC, IP chromatografie a kapilární elektroforéza. Použití kombinace denaturačních a nedenaturačních technik poskytuje doplňkové analýzy oligonukleotidových nečistot k zajištění kontroly čistoty látky [56].

Chromatografickými metodami nelze rozlišit všechny nečistoty související s oligonukleotidy a vysoký počet nečistot se vyskytuje společně s hlavním píkem. Proto se používají analytické metody kombinující chromatografii s různými detektory, jako jsou UV a MS detektory, což umožňuje účinnější separaci. Díky kombinaci chromatografie, která rozděluje molekuly na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, a selektivity detektorů, které poskytují informace o UV absorpci a hmotnostní informace. Toto spojení zlepšuje rozlišení, identifikaci a kvantifikaci nečistot, které by jinak zůstaly skryté. K posouzení čistoty výchozího materiálu lze použít i spektroskopii nukleární magnetické rezonance (NMR). Kritické nečistoty nukleosid-fosforamiditů, které mohou během spojování reagovat a mohou se hromadit v konečném produktu, by měly být kontrolovány a omezeny. Profily nečistot výchozích materiálů by měly být zkoumány v rámci jejich potenciálního dopadu na kvalitu konečného produktu [58].

## 2. PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1. Cíle

Hlavním cílem této práce je validovat syntézu a porovnat účinnost syntézy oligonukleotidů mezi třemi různými výrobci pevné fáze a identifikovat faktory, které ovlivňují kvalitu syntézy. Mezi dílčí cíle práce patří např. plán validace, kde byly ve spolupráci vedoucího práce a odborného konzultanta sestaveny sledované parametry, které jsou zobrazeny v Tabulka 2. Tyto sledované parametry souvisejí s čistotou produktu a výtěžností syntézy. Je zadána i odchylka neúspěšnosti syntézy, neboli do jaké míry tolerujeme její neúspěšnost. U každého výrobce požadujeme minimální úspěšnost 66%. Dalšími dílčími cíli práce jsou provedení samotné syntézy oligonukleotidů, MALDI analýza, spektrofotometrie, HPLC analýza statistické zpracování dat. Díky těmto analytickým metodám získáme hodnoty o molekulové hmotnosti, výtěžku, retenčním čase a ploše pod píkem.

Sledované parametry	AMA v roztoku
Výtěžek	více než 50 % deklarovaného scale
MALDI	MW oliga ± 50 Da vypočtené hodnoty
HPLC kvalita	AUC více než 50 %
<b>Monitorovací parametry syntézy</b>	<b>popis</b>
TRM	náhlý propad TRM hodnot o více než 50 %
<b>Zaměřit se na:</b>	
1) preciznost	MW oliga ± 50 Da
2) robustnost	výtěžek více než 50 % deklarovaného scale
3) opakovatelnost	MW + výtěžek
<b>Splnění validace</b>	Úspěšnost u více než 66% vzorků

Tabulka 2 Sledované parametry

### 2.2. Metody

#### 2.2.1. Vážení vzorku

V Tabulka 3 jsou vypsány sekvence oligonukleotidů dle jejich délky (bp). ID identifikátor jednotlivých sekvencí je shodný s délkou, jelikož je v tomto ohledu unikátní. Dále jsou zobrazeny i vypočítané hodnoty obsahu bází GC. Tato hodnota udává chemickou stabilitu oligonukleotidu a může sloužit i k porovnávání kvality syntéz.

Délka	Sekvence	Obsah GC
60	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGAA	50,00 %
62	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAG	51,61 %

67	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACT	49,25 %
70	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGCA	50,00 %
74	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGCACCCT	51,35 %
77	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGCACCCTTGG	51,95 %
79	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTGCACCCTTGGTC	51,90 %
82	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCG TCAGTGTGTATAAGAGACAGTAACTGCACCCTTGGTCTCC	52,44 %

Tabulka 3 Souhrn syntetizovaných oligonukleotidů

Pro každou bázi byla vypočtena navážka dle vzorce níže. Navážka je v přímé úměře se scale syntézy. Navážky poté byly naváženy na analytických vahách (Boeco, Německo) s přesností na 0,5 mg.

$$\text{navážka [g]} = \frac{\text{scale syntézy } [\mu\text{mol}] \cdot 1 \text{ g}}{L [\mu\text{mol}]} \cdot 1,32$$

L = loading báze

### 2.2.2. Syntéza

Název chemie	Výrobce	Specifikace (obsah)
ACN	Sigma-Aldrich	Acetonitril
TCA Deblock	Sigma-Aldrich	Methylene chloride, trichloroethanoic acid
Oxidizer	Sigma-Aldrich	0,02M, tetrahydrofuran, pyridine
Cap A	Sigma-Aldrich	tetrahydrofuran, acetic anhydride, 2,6-dimethylpyridine
Cap B	Sigma-Aldrich	tetrahydrofuran, 1- methylimidazole
TET activator solution	Vlastní výroba v Generi Biotech	0,25 M 5-(Ethylthio)-1H- tetrazol

DMT-dA (bz) phosphoramidite	Sigma-Aldrich	0,1 M DMT-dA (bz) phosphoramidite v ACN
DMT-dC (ac) phosphoramidite	Sigma-Aldrich	0,1 M DMT-dC (ac) phosphoramidite v ACN
DMT-dG (dmf) phosphoramidite	Sigma-Aldrich	0,1 M DMT-dG (dmf) phosphoramidite v ACN
DMT-dT phosphoramidite	Sigma-Aldrich	0,1 M DMT-dT phosphoramidite v ACN

Tabulka 4 Seznam použitých chemikálií

Nejdříve byly vytvořeny nové sekvence pro syntézu, které byly následně vybrány do tabulky pro spuštění syntézy. Sekvence musely být shodné s kódy syntetických kolonek na syntetizátoru na pozicích 1-8. Rmv. DMT bylo automaticky v tabulce vyplněné na NO, což značilo, že se poslední báze po konci syntézy nedetrityluje. Byla zvolena metoda pro syntézu, konkrétně metoda LongDNA-AM1. Celá syntéza probíhala na automatizovaném syntetizátoru (K&A, H-8-SE, Německo). Průběh syntézy byl sledován na TRM, kdy grafy by měly být ideálně lineární či mírně klesající, také se sledoval celkový yield TRM v procentech. V2 hodnota představuje měření transmittance druhého tritylu během syntézy a slouží jako referenční hodnota pro všechna následná měření tritylu. Každá následující hodnota přenosu se porovnává s hodnotou V2. Nižší hodnota V2 odpovídá intenzivnější barvě při syntéze, což odráží efektivnější coupling v předchozím kroku. V2 také závisí na faktorech, jako je např. specifická použitá chemie nebo ředění tritylu v květetě před měřením.

### 2.2.3. Deprotekce

Syntetické kolonky byly inkubovány s 350  $\mu$ l AMA roztoku (methylamin : hydroxid amonný, 1:1) pomocí automatických pipet (Eppendorf Research, Německo) v 5 ml zkumavkách Eppendorf 20 min při laboratorní teplotě. Následně byly syntetické kolonky promyty 650  $\mu$ l AMA roztoku a eluent byl jímán do 2 ml zkumavek Sartsted. Získaný roztok byl inkubován v termostatickém heatblocku (Major Science, Taiwan) 1 h při 60 °C. Po inkubaci byly zkumavky zchlazeny v mrazicím boxu po dobu 20 min při -20 °C. Vzorky byly homogenizovány pomocí vortexu a následně centrifugovány 3 s při 600 ot/min v laboratorní centrifuze (Verkon Ohaus Frontier 5816R, USA). Následně byl celý objem vzorků nanesen na gelové filtrační kolony (CentriPure N10, Německo) a ponechán k úplnému vsáknutí do gelu. Na kolonu se vzorkem bylo nanesen 500  $\mu$ l IWA vody, ale eluát nebyl jímán. Následně bylo na kolony nanesen 1000  $\mu$ l IWA vody a vzorky byly jímány do 2 ml Sartsted zkumavek. Takto purifikovaný vzorek byl analyzován pomocí HPLC a MALDI-TOF MS.

## 2.2.4. Analytické metody

### 2.2.4.1. MALDI-TOF

Z roztoku purifikovaného oligonukleotidu byly odpipetovány 2  $\mu\text{l}$  do 0,5ml zkumavky Eppendorf, kde se smísily s 10  $\mu\text{l}$  matricového roztoku (vlastní výroba, 3-hydroxy-pikolinová kyselina + imidazol). Směs byla homogenizována a nanесena na destičku vhodnou pro MALDI-TOF MS analýzu. Destička byla vložena do hmotnostního spektrofotometru (Bruker autoflex® maX, Německo) a analyzována laserovou ionizací. Naměřená hmotnost byla porovnána s teoretickou hodnotou, která byla vypočítána na základě sekvenčního složení.

### 2.2.4.2. HPLC

Vzorek ve Sartsted zkumavce byl umístěn bez víčka do stojánku v sestavě HPLC s autosamplerem (Agilent 1260 Infinity II LC systém, USA). V řídicím softwaru byla vybrána odpovídající analytická metoda, která zahrnovala použití mobilních fází složených ze 100% acetonitrilu a 100 mmol roztoku triethylamonium acetátu. Pro filtraci mobilní fáze byla použita filtrační aparatura s 0,45 $\mu\text{m}$  polyvinylidenfluoridovou membránou Durapore®. Pro analýzu vzorků byla použita kolona AdvanceBio Oligonucleotide 2,7  $\mu\text{m}$  150 x 4,6 mm – stacionární fáze C18 na plně porézní silice (velikost částic 2  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 110 Å). Při separaci složek vzorku na chromatografické koloně docházelo k detekci a záznamu chromatogramu. Na tento krok práce dohlížel odborný konzultant PharmDr. Filip Kostelanský, Ph.D.

### 2.2.4.3. Spektrofotometrické stanovení absorbance

Po dokončení HPLC analýzy byl vzorek přenesen do vakuové koncentrační centrifugy (Savant SpeedVac SPD2030, USA) za účelem vysušení vzorku. Sušení probíhalo 3 hodiny při 55 °C za vakua. Po odpaření vody byly oligonukleotidy naředěny na konečný objem 1000  $\mu\text{l}$  v IWA vodě. Roztok byl 2 minuty homogenizován pomocí vortexu (Biosan V-1 plus, Biosan SIA, Lotyšsko, 3000ot/min). Následně bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku do 2ml zkumavky Eppendorf, kde se smísil se 700  $\mu\text{l}$  IWA vody a znovu 2 minuty homogenizován na vortexu. Každý vzorek byl připraven v triplikátech, pro zajištění přesnosti kvantifikace. Bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  IWA vody do mikrotitrační destičky a změřen blank na spektrofotometru (Tecan Infinite® M Nano, Rakousko) i na spektrofotometru (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, USA). Poté byly pipetovány a změřeny vzorky v triplikátu. Hodnotily se odchylky absorbance mezi triplikáty.

## 2.2.5. Statistické zpracování dat

K vyhodnocení výsledků syntézy oligonukleotidů byla použita analýza rozptylu ANOVA, která umožňuje porovnat více skupin současně a určit, zda existují statisticky významné rozdíly mezi výrobci pevné fáze nebo mezi různými podmínkami syntézy (např. délka sekvence, pozice na syntetizátoru). ANOVA sloužila ke zjištění, zda rozdíly ve výtěžnosti, čistotě či výsledcích analytických metod (MALDI, HPLC, TRM) jsou skutečně ovlivněny konkrétními faktory, nebo zda se jedná o náhodné odchylky [71]. Statistické vyhodnocení bylo provedeno vedoucím práce PharmDr. Antonínem Librou, Ph.D.

R Studio je open-source prostředí určené pro práci v jazyce R, které umožňuje efektivní zpracování a vizualizaci dat. V této práci bylo využito především pro provádění statistických analýz (ANOVA) a grafické zobrazení výsledků. Rozhraní R Studia zahrnuje editor skriptů (tvorba a úprava kódu pro analýzu dat), konzole (spouštění příkazů a okamžité zobrazení výsledků), správa prostředí (přehled o použitých datových sadách a proměnných) a grafický panel (vizualizace výsledků např. boxploty, grafy z ANOVA). R Studio bylo použito zejména pro provádění ANOVA analýz, tvorbu grafického znázornění výsledků a zpracování dat z analytických metod (MALDI, HPLC, TRM). Díky integraci nástrojů je vhodným prostředím pro reprodukovatelné zpracování výsledků [72].

## 2.3. Výsledky

Tato kapitola se zaměřuje na prezentaci a analýzu získaných výsledků při porovnání tří různých výrobců pevné fáze používané pro syntézu oligonukleotidů. Pro každého výrobce byly provedeny celkem čtyři syntézy s 8 sekvencemi, přičemž se měnily pozice na syntetizátoru. V rámci každé syntézy bylo analyzováno osm vzorků, což celkově představuje 96 vzorků. Tabulka 10 s celkovými výsledky všech analytických metod je uvedena v přílohách na straně 66.

Pro vyhodnocení úspěšnosti syntézy byly stanoveny sledované parametry, mezi které patří čistota produktu, výtěžnost syntézy, preciznost, robustnost, opakovatelnost a chemická stabilita. Tyto parametry jsou podrobně rozepsány v Tabulka 2 v kapitole cíle práce.

Pro porovnání jsem si vybrala vzorek s délkou sekvence 62 bp a vzorek s délkou sekvence 82 bp, abych ukázala případné rozdíly z analýz souvisejících s délkou. Všechny tyto vzorky pocházejí ze syntézy č.2 od každého výrobce. Dalším důvodem pro prezentování těchto konkrétních vzorků byly sledované parametry, přičemž vzorky s pevnou fází Glen splňovaly tyto parametry, zatímco vzorky od výrobců Sigma a LGC alespoň jeden parametr nesplnil. Proto mi přišlo zajímavé ukázat i grafy analýz vzorků nesplňující parametry. Grafy z analytických metod pro výrobce Sigma a LGC jsou připojeny v přílohách práce na straně 66.

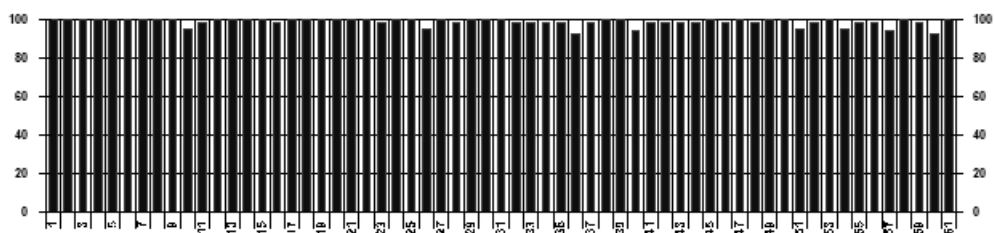
Následující výsledky statistického vyhodnocení poskytují podrobnější pohled na variabilitu dat a umožňují posoudit, které faktory mají největší vliv na kvalitu syntézy oligonukleotidů.

### 2.3.1. Trityl monitor (TRM)

TRM měří intenzitu transmitance jako tzv. „hladiny DMT<sup>+</sup> (tritylu)“ v kyvetách pro každou kolonu zvlášť při vlnové délce 470 nm, která poskytuje nejvyšší citlivost pro detekci tritylu. V2 hodnota reprezentuje intenzitu transmitance DMT<sup>+</sup> v průběhu detritylace ve druhém syntetickém cyklu. Pro graf TRM převádí ovládací software všechny hodnoty transmitance na hodnoty tzv. „extinkce“, které se pohybují přibližně od 1 (intenzivní barva, bez transmitance) do přibližně 4095 (plná transmitance, bezbarvý roztok). TRM nezobrazuje absolutní, kalibrovanou optickou hustotu (optical density –OD); místo toho vyhodnocuje všechny naměřené hodnoty tritylu vzhledem k referenční hodnotě – V2.

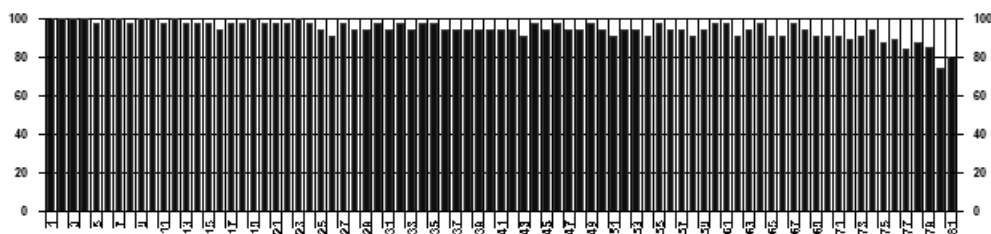
TRM Total Yield se stanoví porovnáním měření transmitance v jednotlivých cyklech syntézy. Pokud se hodnota transmitance mezi cykly nemění, je celková výtěžnost 100 %. TRM Step to Step Yield představuje účinnost každého cyklu syntézy.

V02675 : Tot. yield: 100%, Step to step yield= 100.0%, V2: 8



Graf 1 Záznam tritylmonitoru vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s konstantní hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). Protože nedošlo k žádné změně přenosu tritylu, celková výtěžnost TRM zůstává na 100 %.

V02678 : Tot. yield: 80%, Step to step yield= 99.7%, V2: 5

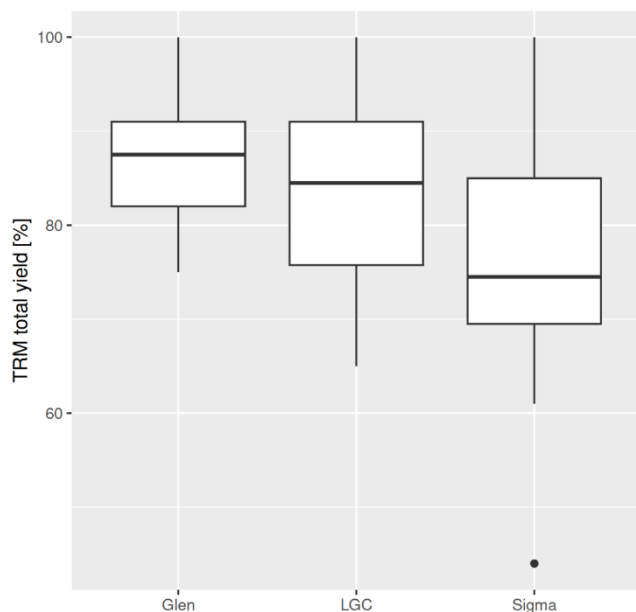


Graf 2 Záznam tritylmonitoru vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s mírně klesající hodnotou TRM total yield až na hodnotu 80. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 80%.

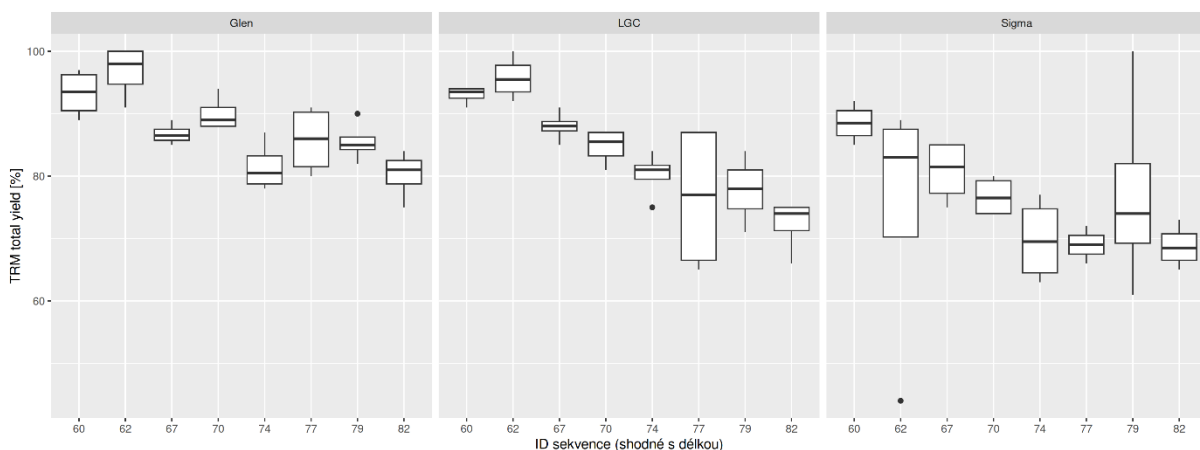
Response: trm.total.yield

	Df	Sum-Sq	Mean-Sq	F-value	Pr(>F)	
Len	1	2984.8	2984.84	60.3176	1.776e-11	***
Support	2	2302.1	1151.07	23.2608	9.142e-0	***
Position	1	105.8	105.82	2.1383	0.1474	
Len:support	2	198.9	99.47	2.0102	0.1404	
Len:position	1	0.4	0.36	0.0072	0.9327	
Support:position	2	59.7	29.84	0.6031	0.5495	
Len:support:position	2	122.4	61.19	1.2366	0.2956	
Residuals	84	4156.8	49.48			

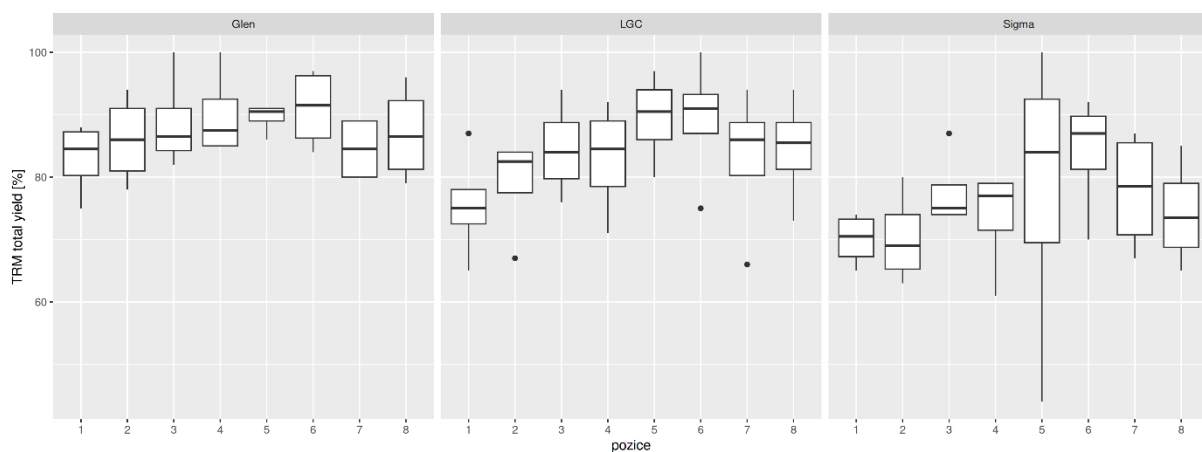
Tabulka 5 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě hodnot TRM total yield a délkou, poté mezi hodnotou TRM total yield a výrobcem pevné fáze. len = délka sekvence, support = pevná fáze, position = pozice na syntetizátoru, residuals = reziduum (rozdíl mezi skutečnou hodnotou a hodnotou předpovězenou modelem), Df = stupeň volnosti (počet hodnot, které mohou být měněny aniž by ovlivnily ostatní), Sum Sq = součet čtverců (měří variabilitu dat), Mean Sq = střední čtverec (průměrná variabilita), F value = F-statistika (poměr mezi středními čtverci mezi skupinami a uvnitř skupin), Pr(>F) = p-hodnota (pravděpodobnost náhody, čím nižší hodnota, tím významnější rozdíl)



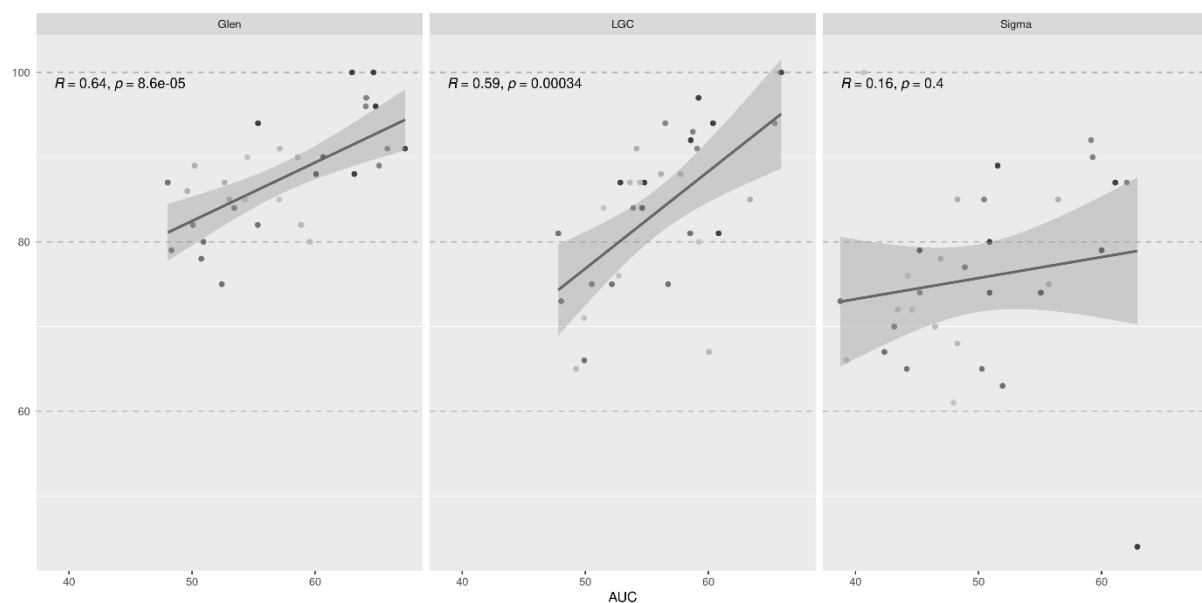
Graf 3 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze na základě hodnot TRM total yield (%). Na ose x jsou výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty TRM total yield (%). Nižší hodnoty TRM total yield jsou viditelné u výrobce Sigma. U zbylých dvou výrobců je rozdíl patrný jen v rozptýlu hodnot.



Graf 4 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě hodnot TRM total yield. Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Největší rozptyl hodnot je pozorovatelný u výrobce LGC u ID sekvence 77. Tento rozptyl pozorujeme i u výrobce Glen, ale je mnohem menší. U výrobců LGC a Sigma je viditelný pokles hodnot TRM total yield se zvyšující se ID sekvencí. Mírný propad můžeme vidět u ID sekvence 67 a 74 u výrobce Glen.



Graf 5 Zobrazuje porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě hodnot TRM total yield (%). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Na grafu nejsou viditelné propady hodnot vlivem pozice na syntetizátoru. Nejvyšší hodnoty TRM total yield má výrobce pevné fáze Glen, naopak nejnižší hodnoty má výrobce Sigma.



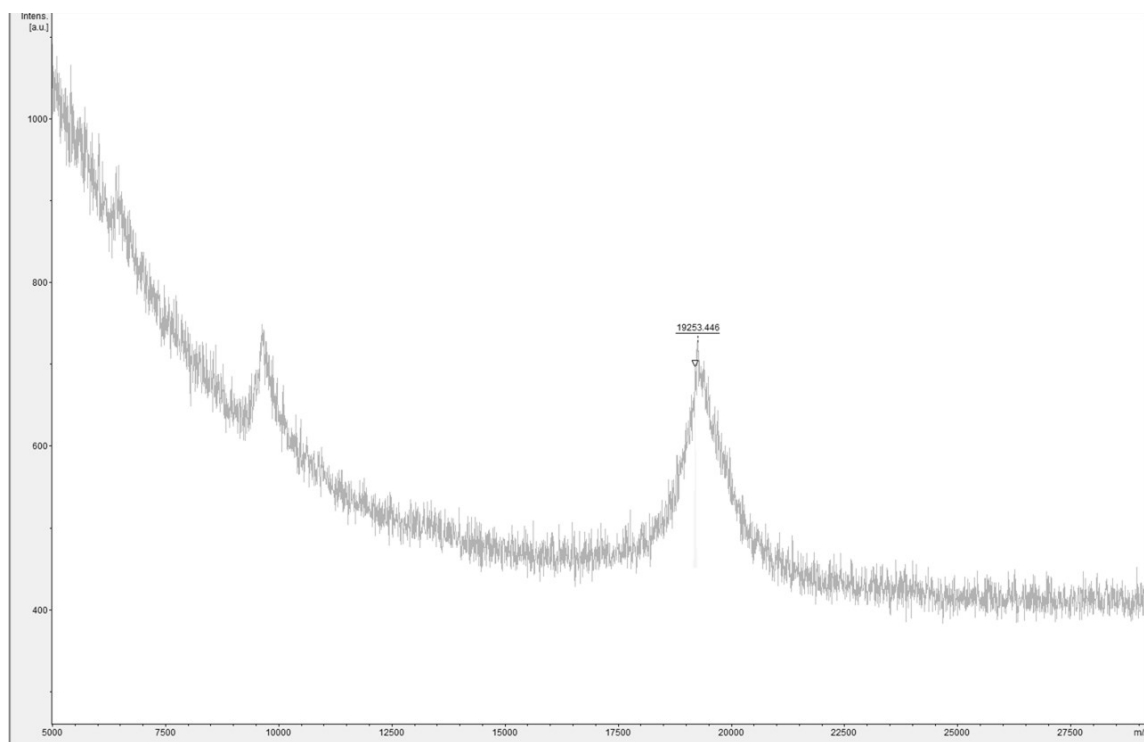
Graf 6 zobrazuje korelaci hodnot TRM total na základě hodnot AUC jednotlivých výrobců pevné fáze. Na ose x jsou hodnoty AUC (%), na ose y je TRM total yield (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Výrobce pevné fáze Glen má  $R=0,64$ , výrobce LGC má  $R=0,59$  a výrobce Sigma má  $R=0,16$ .  $R$  hodnota je korelační koeficient a udává sílu a směr lineární závislosti mezi AUC (%) a TRM total yield. Čím více se koeficient blíží hodnotě 1, tím silnější je přímá korelace mezi dvěma hodnotami. Hodnota  $R$  nad 0,4 se dá považovat za středně silnou pozitivní korelaci. Pokud je hodnota  $R$  nad 0,7, je tato korelace silně pozitivní.

Vzorek	Hodnota TRM total yield (%)	Výtěžek (nmol)
V02670	84	129,568
V02702	70	103,912
V02710	67	112,583
V02711	70	107,454
V02712	65	106,568

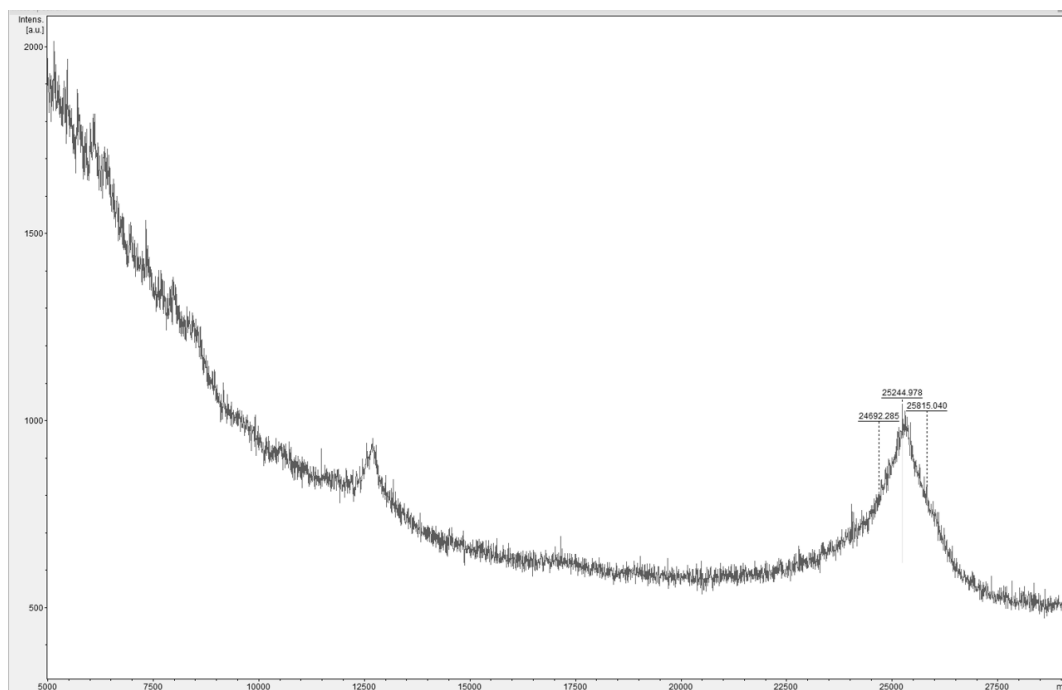
Vzorek	Hodnota TRM total yield (%)	Výtěžek (nmol)
V02714	61	109,845
V02715	44	120,469
V02718	65	104,246
V02719	68	116,782
V02720	63	118,760
V02727	66	115,346
V02742	66	90,216
V02751	65	106,024
V02759	67	102,636

Tabulka 6 Porovnání grafu TRM s náhlým propadem hodnot pod 50 % či hodnota TRM total yield nižší než 70%. Dále jsou uvedeny hodnoty výtěžku vzorku ze spektrofotometrické analýzy. Tato tabulka byla vytvořena na základě mé hypotézy o nízké hodnotě TRM total yield a vysokém výtěžku. Tato hypotéza nebyla potvrzena, jelikož v tabulce vidíme hodnoty výtěžku pod sledovaným parametrem validace (V02742) nebo které jsou těsně nad sledovaným parametrem (V02759), rozhodně je nelze považovat za nadprůměrné hodnoty.

### 2.3.2. MALDI TOF



Graf 7 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s viditelným píkem o hodnotě 19 205,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost (m/z), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.



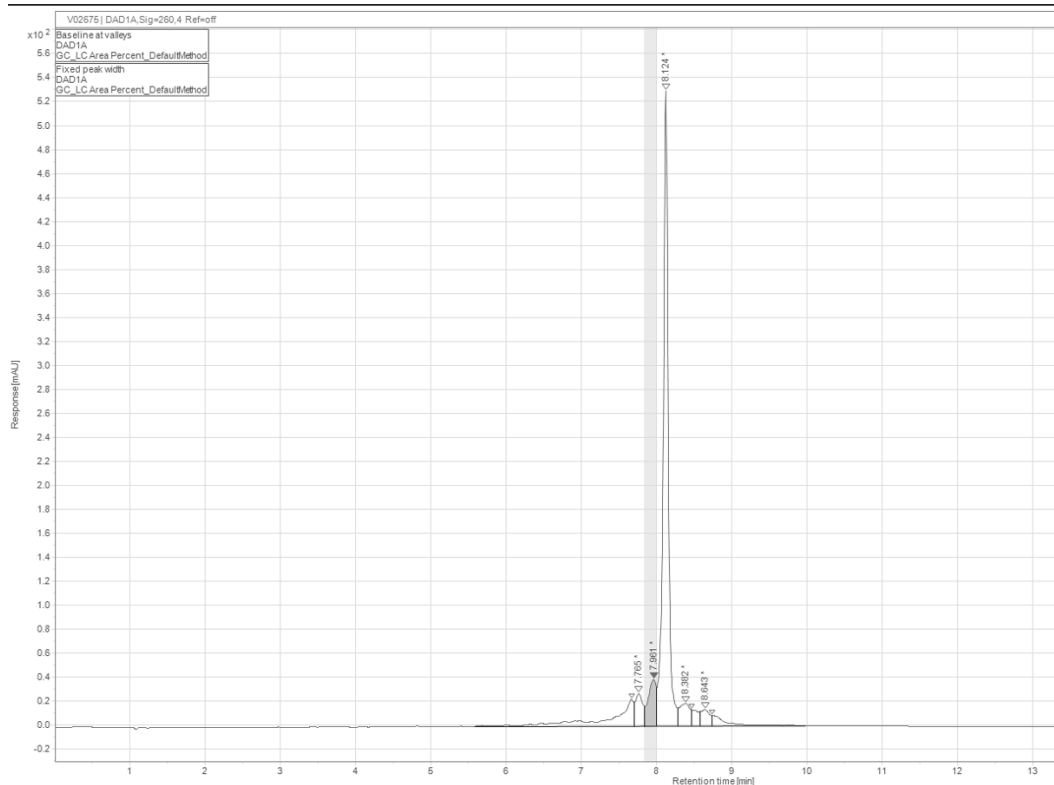
Graf 8 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s viditelným píkem o hodnotě 25 245 Da. Na ose x je uvedena hmotnost ( $m/z$ ), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.

### 2.3.3. HPLC

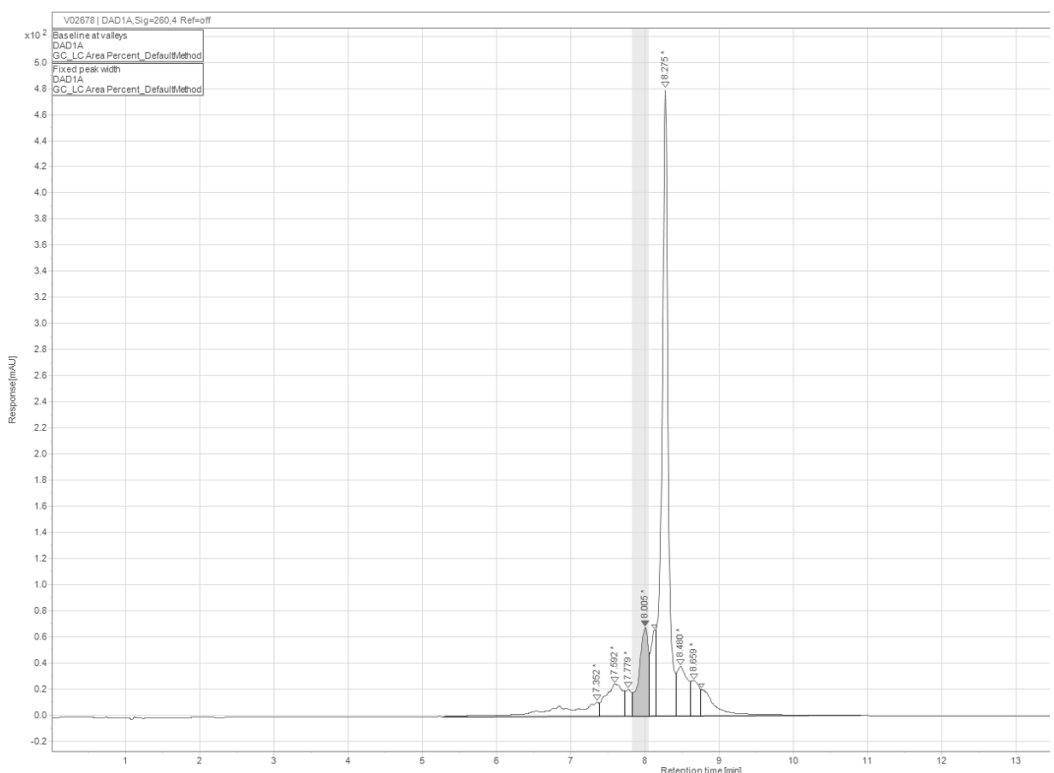
AUC je klíčovým parametrem v HPLC analýze, neboť vyjadřuje množství detekované látky ve vzorku. Čím větší je plocha pod hlavním chromatografickým píkem, tím vyšší je koncentrace dané sloučeniny, za předpokladu konstantních podmínek měření. V kontextu syntézy oligonukleotidů je AUC často používáno jako indikátor výtěžku a efektivity syntézy, případně čistoty.

Dalším parametrem je retenční čas, který udává, jak dlouho trvá, než analyzovaná látka projde kolonou a dorazí k detektoru. Sleduje se také tvar píku, pokud je ostrý a symetrický pík, značí to dobrou separaci vzorku. V neposlední řadě se hodnotí i počet a intenzita vedlejších píků, které mohou naznačovat přítomnost nečistot či vedlejších produktů.

Množství jednotlivých složek vzorku nemůžeme dle AUC bez použití vnitřního nebo vnějšího standardu kvantifikovat. Můžeme pouze porovnávat a pozorovat na chromatogramu relativní zastoupení jednotlivých píků.



Graf 9 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02675 (62 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s retenčním časem 8,12 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrazet vedlejší produkty nebo nečistoty.

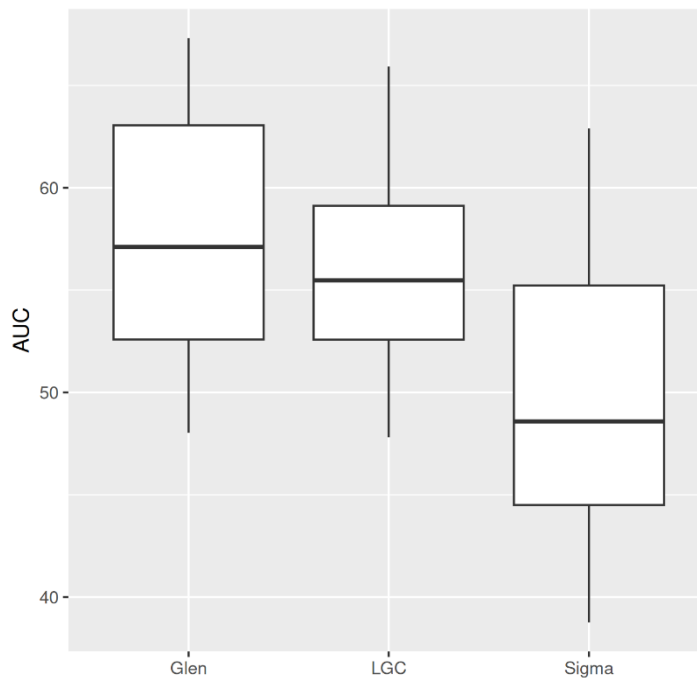


Graf 10 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02678 (82 bp) syntetizovaného na pevné fázi Glen s retenčním časem 8,28 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrazet vedlejší produkty nebo nečistoty.

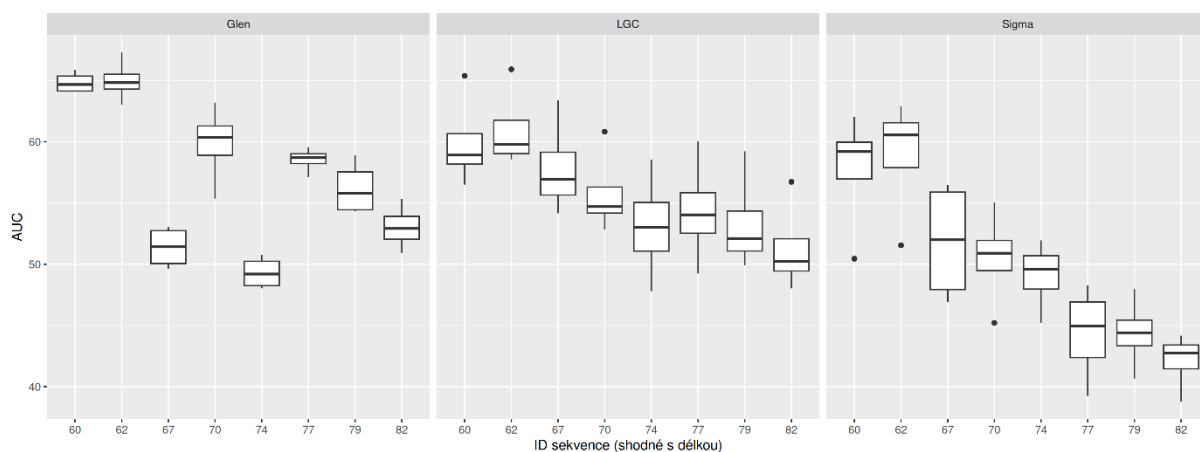
Response: auc

	Df	Sum-Sq	Mean-Sq	F-value	Pr(>F)	
Len	1	1591.02	1591.02	95.9958	1.477e-15	***
Support	2	986.27	493.14	29.7539	1.702e-10	***
Position	1	1.14	1.14	0.0688	0.79379	
Len:support	2	128.06	64.03	3.8632	0.02483	*
Len:position	1	1.20	1.20	0.0727	0.78814	
Support:position	2	11.48	5.74	0.3463	0.70831	
Len:support:position	2	104.46	52.23	3.1512	0.04790	*
Residuals	84	1392.20	16.57			

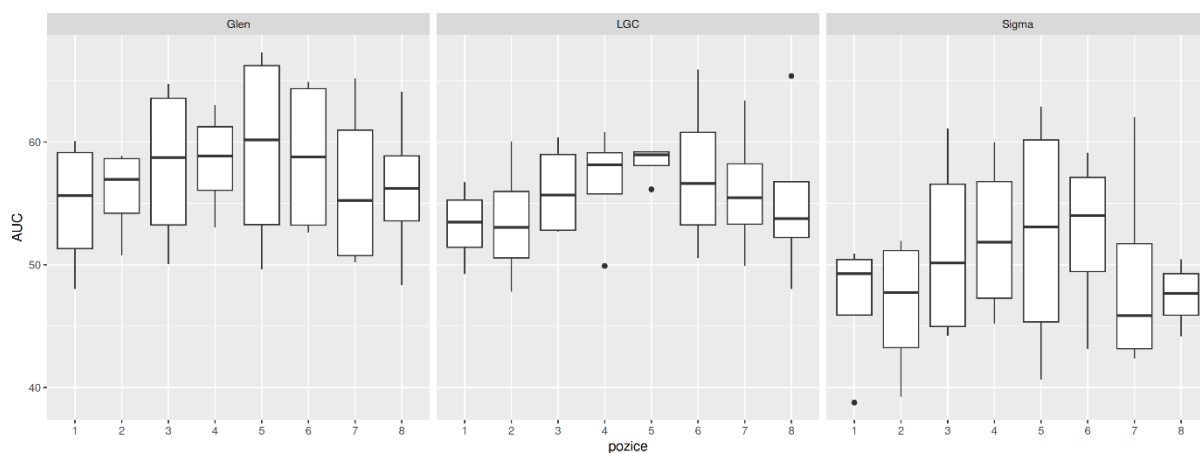
Tabulka 7 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě výtěžku a délky sekvence, poté mezi výtěžkem a výrobcem pevné fáze. Jsou viditelné i slabé faktory na základě délky a pevné fáze, poté i na délce, pevné fázi a pozici. Vysvětlivky zkratk najdete pod Tabulka 5.



Graf 11 Porovnání výrobců pevné fáze na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou jednotliví výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty AUC (%). Nejvyšších hodnot AUC (%) dosahuje výrobce pevné fáze Glen, poté LGC a nejnižší hodnoty má výrobce Sigma.



Graf 12 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y jsou hodnoty AUC (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. S rostoucí ID sekvencí, klesá u výrobců LGC a Sigma hodnota AUC (%). Nejvyšších hodnot dosahují ID sekvence 60 a 62. Tyto dvě ID sekvence mají absolutně nejvyšší hodnotu AUC (%) u pevné fáze Glen. Propad hodnot AUC (%) pozorujeme u ID sekvence 67 a 74 u výrobce Glen, tyto propady nepozorujeme u zbylých dvou výrobců



Graf 13 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě hodnot AUC (%). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y jsou hodnoty AUC (%) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Nejvyšších hodnot AUC (%) dosahuje výrobce pevné fáze Glen, nejnižších dosahuje výrobce Sigma. Pevná fáze od LGC mají nejmenší rozptýlené hodnoty AUC nehledě na pozici na syntetizátoru.

Kód GLEN	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Kód SIGMA	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Kód LGC	AUC (%)	Výtěžek (nmol)
V02665	60,08	121,37	V02697	50,9	107,91	V02729	54,8	111,08
V02666	58,89	124,99	V02698	44,59	105,62	V02730	51,48	115,03
V02667	64,74	120,01	V02699	61,11	114,66	V02731	60,38	106,64
V02668	53,04	129,17	V02700	55,71	111,04	V02732	57,74	115,40
V02669	65,87	119,29	V02701	59,27	109,66	V02733	58,74	112,97
V02670	53,43	129,57	V02702	43,15	103,91	V02734	50,53	95,12

Kód GLEN	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Kód SIGMA	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Kód LGC	AUC (%)	Výtěžek (nmol)
V02671	59,57	122,27	V02703	43,43	98,46	V02735	54,44	104,15
V02672	48,33	123,26	V02704	48,89	106,94	V02736	53,9	109,98
V02673	55,36	117,58	V02705	50,9	106,56	V02737	54,62	106,48
V02674	54,31	122,96	V02706	44,23	103,58	V02738	52,72	97,70
V02675	63,01	114,46	V02707	60	91,93	V02739	58,57	110,68
V02676	49,62	123,85	V02708	46,91	131,22	V02740	56,15	113,09
V02677	64,16	123,12	V02709	59,14	104,10	V02741	59,09	108,62
V02678	50,93	124,87	V02710	42,35	112,58	V02742	49,92	90,22
V02679	57,13	114,11	V02711	46,46	107,45	V02743	53,63	111,47
V02680	48,03	126,43	V02712	50,27	106,57	V02744	52,16	113,86
V02681	63,19	116,85	V02713	55,06	109,58	V02745	52,85	108,96
V02682	57,09	129,62	V02714	47,97	109,84	V02746	49,91	94,85
V02683	67,31	110,61	V02715	62,9	120,47	V02747	59,2	107,93
V02684	52,64	124,85	V02716	56,46	118,60	V02748	54,16	111,69
V02685	65,2	114,70	V02717	62,05	115,25	V02749	56,5	111,08
V02686	55,34	127,70	V02718	44,17	104,25	V02750	48,03	94,55
V02687	58,84	119,25	V02719	48,28	116,78	V02751	49,25	106,02
V02688	50,75	119,61	V02720	51,95	118,76	V02752	47,81	113,17
V02689	60,66	121,12	V02721	45,21	119,21	V02753	60,83	111,86
V02690	54,5	122,17	V02722	40,66	108,92	V02754	59,22	96,63
V02691	64,92	110,56	V02723	51,55	118,82	V02755	65,92	108,62
V02692	50,21	125,97	V02724	48,28	117,13	V02756	63,39	111,63
V02693	64,12	116,33	V02725	50,45	112,19	V02757	65,39	107,32
V02694	52,42	127,79	V02726	38,77	112,10	V02758	56,73	94,28
V02695	58,58	113,08	V02727	39,25	115,35	V02759	60,05	102,64
V02696	50,07	106,38	V02728	45,22	116,30	V02760	58,53	92,94
<b>Průměr</b>	57,26	120,75	<b>Průměr</b>	49,86	111,12	<b>Průměr</b>	55,83	106,15

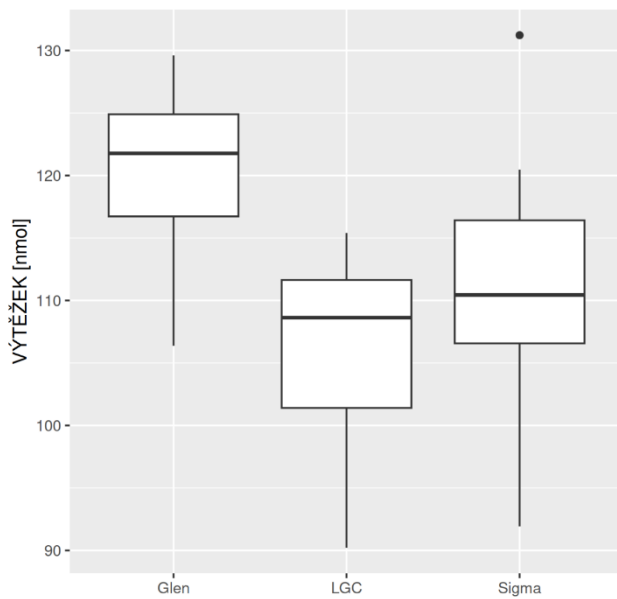
Tabulka 8 Průměrné hodnoty pevné fáze Glen (AUC 57,26 %, výtěžek 120,75 nmol), Sigma (AUC 49,86 %, výtěžek 111,12 nmol), LGC (AUC 55,83 %, výtěžek 106,15 nmol).

### 2.3.4. Spektrofotometrie

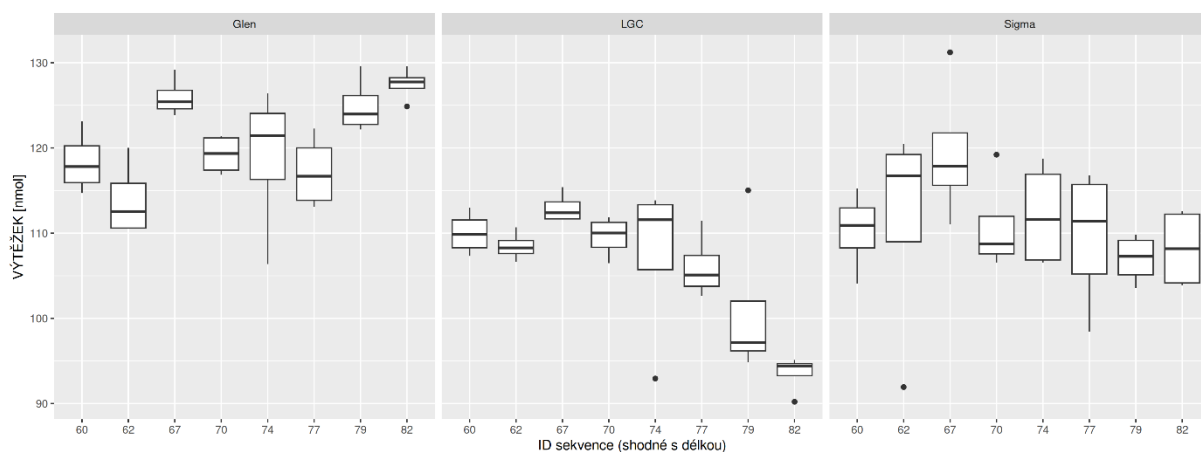
Response: yield

	Df	Sum-Sq	Mean-Sq	F-value	Pr(>F)	
Len	1	143.6	143.56	3.4482	0.0668262	
Support	2	3527.1	1763.57	42.3586	1.901e-13	***
Position	1	20.7	20.75	0.4983	0.4821840	
Len: support	2	792.5	396.24	9.5172	0.0001881	***
Len: position	1	13.8	13.79	0.3311	0.5665230	
Support: position	2	54.3	27.17	0.6525	0.5233464	
Len: support: position	2	53.8	26.92	0.6467	0.5263815	
Residuals	84	3497.3	41.63			

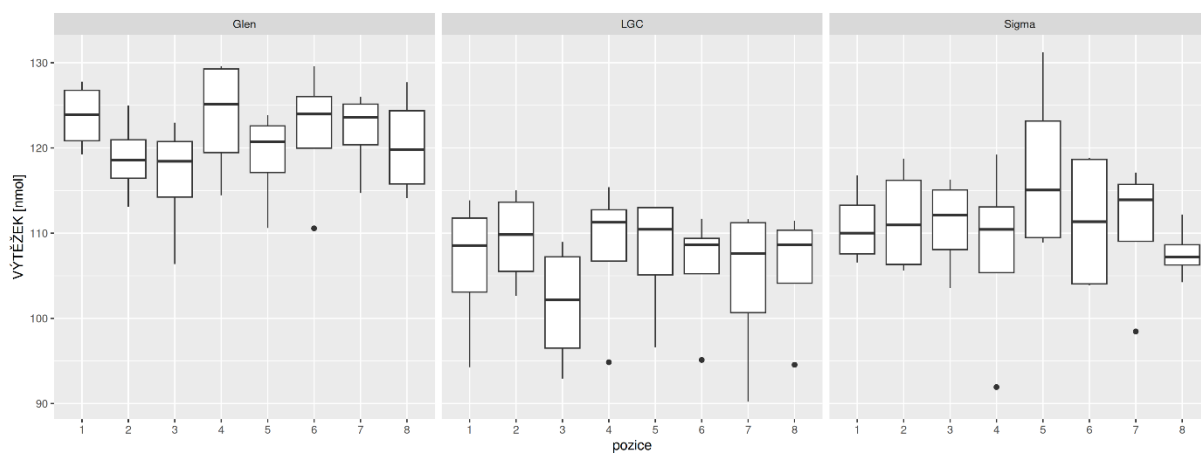
Tabulka 9 Statistické vyhodnocení ANOVA. Důležité faktory jsou zřetelné na základě výtěžku a výrobci pevné fáze, poté na základě výtěžku na délce a výrobci pevné fáze. Vysvětlivky zkratk najdete pod Tabulka 5.



Graf 14 Porovnání výrobců pevné fáze na základě výtěžku (nmol). Na ose x jsou výrobci pevné fáze, na ose y jsou hodnoty výtěžku vzorků (nmol). Je viditelný nejvyšší výtěžek u výrobce pevné fáze Glen, naopak nejnižšího výtěžku dosahuje pevná fáze LGC.



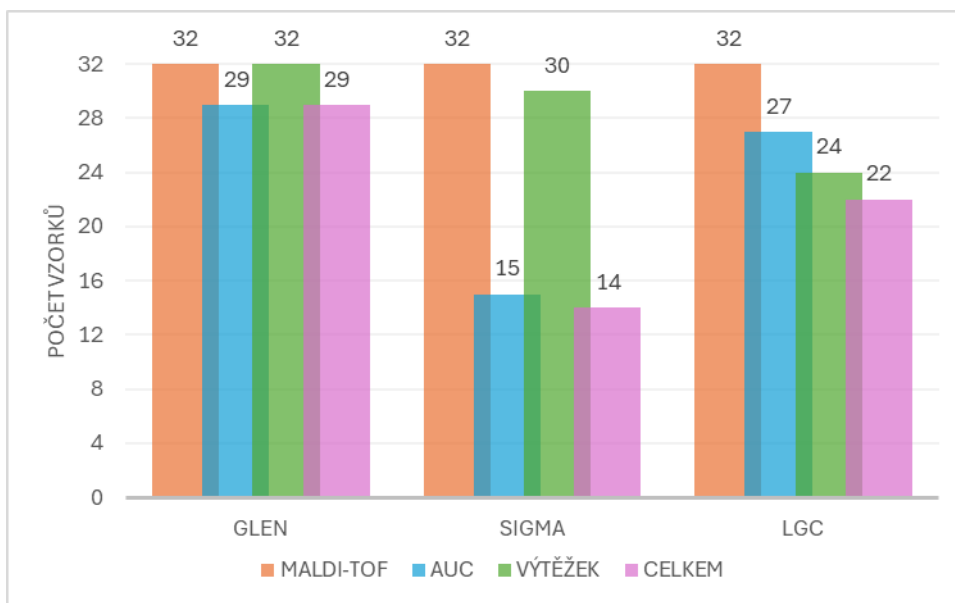
Graf 15 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na ID sekvence na základě výtěžku. Na ose x jsou ID sekvence shodné s délkou 60 bp až 82 bp, na ose y jsou hodnoty výtěžku vzorků (nmol) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Oligonukleotid s ID sekvencí 82 má v rámci skupiny vyšší výtěžky u pevné fáze Glen než u LGC a Sigma. Propad jako je u ID sekvence 82 u pevné fáze LGC nepozorujeme ani u Sigmy ani u Glena.



Graf 16 Porovnání výrobců pevné fáze s ohledem na pozici na syntetizátoru na základě výtěžku vzorků (nmol). Na ose x jsou jednotlivé pozice na syntetizátoru 1-8, na ose y jsou hodnoty výtěžku (nmol) a osa z představuje jednotlivé výrobce pevné fáze. Nepozorujeme výrazný pokles na žádné pozici ani u jednoho výrobce pevné fáze.

### 2.3.5. Vyhodnocení sledovaných parametrů

Detailnější tabulka pro každý vzorek oligonukleotidu na dané pevné fázi a každý sledovaný parametr analýzy je přiložena v přílohách v Tabulka 11.



Graf 17 Znárodnění počtu vzorků, které splnily dané sledované parametry. Od jednoho výrobce bylo syntetizováno 32 vzorků. Na ose x jsou vyznačeny výrobci pevné fáze, na ose y jsou počty vzorků splňující parametry. Glen má nejvyšší počet zastoupených vzorků splňující parametry, konkrétně je to 32 vzorků z 32 z analýzy MALDI-TOF i výtěžku, 29 vzorků splňuje podmínky AUC. Sigma má 32 vzorků splňující parametry MALDI-TOF, ale pouze 15 jich splnilo podmínky AUC, lépe je na tom s výtěžkem, u kterého prošlo 30 vzorků. LGC má 32 vzorků splňující parametry MALDI-TOF, 27 vzorků splňující podmínky AUC a 24 vzorků, které splnily podmínky výtěžku. Celkem splnilo všechny sledované parametry validace 65 vzorků z 96 syntetizovaných vzorků, což odpovídá že 67,7% počtu vzorků splnilo sledované parametry validace. Konkrétněji sledované parametry u výrobce Glen splnilo 29 vzorků (90,6 %), u Sigmy 14 vzorků (43,8 %) a u LGC 22 vzorků (68,8 %).

## 2.4. Diskuse

### 2.4.1. TRM

Získaná data z TRM poskytují průběžný přehled o efektivitě jednotlivých syntetických cyklů. Ačkoli na první pohled nebyla pozorována přímá souvislost mezi hodnotami TRM a AUC, statistické vyhodnocení prokázalo středně silnou pozitivní korelaci mezi těmito dvěma parametry jak je vidět na Graf 6. Lze tedy říci, že TRM sice nelze využít jako samostatný rozhodovací parametr, ale může sloužit jako pomocný nástroj k odhadu kvality syntézy.

Při porovnávání vztahu mezi TRM total yield, délkou sekvence a typem pevné fáze syntetizovaných na pevných fázích od různých výrobců, vykazovaly nejvyšší průměrné hodnoty vzorky syntetizované na pevné fázi Glen, těsně následované vzorky syntetizované na pevné fázi LGC, u kterého však pozorujeme větší rozptyl hodnot. Vzorky syntetizované na pevné fázi Sigma dosahují nižších hodnot výtěžku a větší variability (Graf 4). Největší odchylky byly zaznamenány u LGC v případě ID sekvence 77, přičemž příčina tohoto jevu zůstává nejasná, neboť u ostatních výrobců podobná odchylka nebyla zaznamenána. Mohlo se jednat o nesoulad mezi sekvencí a pevnou fází. Naopak, pozice na syntetizátoru neprokázala žádný významný vliv na hodnoty TRM total yield, a lze ji tedy považovat za nevýznamný faktor (Graf 5).

Pro úplnější hodnocení bylo provedeno srovnání mezi jednotlivými analytickými metodami. Výsledky analytických metod najdete v přílohách v Tabulka 10. Byly zaznamenány případy, kdy vzorek vykazoval nízký TRM (propad TRM hodnot pod 50 %), ale zároveň měl AUC dle sledovaných parametrů validace v pořádku (53,43 %) a také měl nadprůměrný výtěžek 129,58 nmol (např. vzorek V02670). Nebo naopak TRM i AUC splňovaly sledované parametry

validace, ale výtěžek byl na daného výrobce pevné fáze podprůměrný (114,46 nmol, např. V02675). TRM hodnoty klesly na 60 % u vzorku V02742, v návaznosti na to byla očekávána vyšší výtěžnost na základě domněnek (čím nižší TRM, tím vyšší výtěžek), ale výsledek byl překvapivě nízký (90,22 nmol). Tato hypotéza vyplynula z analýzy grafů TRM, identifikace vzorků s náhlým poklesem hodnot parametru TRM total yield a jejich následného porovnání s výtěžky (Tabulka 6). Po tomto porovnání jsem se domnívala, že nižší hodnoty TRM total yield mohou souviset s vyššími hodnotami výtěžku. Tyto příklady ukazují, že žádný z parametrů sám o sobě nedokáže plně predikovat kvalitu syntézy. A pro celkové vyhodnocení je třeba vzájemně kombinovat více analytických přístupů.

#### 2.4.2. MALDI-TOF

Hmotnostní spektrální analýza pomocí MALDI-TOF potvrdila úspěšnost všech provedených syntéz, změřená molekulová hmotnost všech vzorků splnila sledované parametry validace viz Tabulka 11.

#### 2.4.3. HPLC

Hodnota AUC byla hlavním parametrem pro hodnocení kvality produktů metodou HPLC. Při porovnávání vztahu mezi AUC, délkou sekvence a typem pevné fáze syntetizovaných na pevných fázích od různých výrobců, vykazovaly nejvyšší průměrné hodnoty vzorky syntetizované na pevné fázi Glen, následované vzorky syntetizovanými na pevných fázích LGC a Sigmou (Graf 12). Opakující se poklesy hodnot AUC u délek 67 bp a 74 bp u pevné fáze Glen mohou naznačovat nevhodnou kombinaci sekvence a pevné fáze. Pozice vzorku na syntetizátoru neměla vliv dle statistického porovnání na hodnoty AUC ani u jednoho výrobce pevné fáze (Graf 13).

Významným zjištěním byla korelace mezi parametry AUC a TRM (Graf 6). Nejvyšší korelační koeficient ( $R = 0,64$ ) byl pozorován u pevné fáze Glen, což značí středně silnou pozitivní korelaci. U pevné fáze LGC činil  $R = 0,59$ , což rovněž odpovídá středně silné korelaci. Na základě těchto hodnot lze předpokládat, že průběh TRM může alespoň částečně napovědět, jak bude vypadat výsledek HPLC analýzy. U pevné fáze Sigma však byla hodnota  $R$  pouze 0,16, což ukazuje na velmi slabou korelaci. Vyšší hodnota TRM by tak mohla značit efektivní syntézu a může vést k vyšší absolutní hodnotě cílového produktu. Avšak samotná čistota vzorku (AUC %) závisí nejen na výtěžku, ale i na míře vedlejších produktů vzniklých během syntézy. V rámci úvah nad sekvencemi a jejich strukturou nebyly pozorovány rozdíly v obsahu GC, které by mohly ovlivnit syntézu – sekvence si jsou totiž velmi podobné (Tabulka 3).

Při porovnávání AUC a výtěžku syntézy oligonukleotidů, syntetizovaných na pevných fázích od různých výrobců, vykazovaly nejvyšší průměrné hodnoty AUC i výtěžku vzorky syntetizované na pevné fázi Glen (AUC 57,3 %, výtěžek 120,8 nmol). Vzorky syntetizované na pevné fázi Sigma dosáhly průměrných hodnot AUC 49,9 % a výtěžku 111,2 nmol, u vzorků syntetizovaných na pevné fázi LGC byly hodnoty AUC 55,8 % a výtěžku 106,2 nmol (Tabulka 8). Z tohoto vyplývá, že oba sledované parametry splnil výrobce pevné fáze Glen a LGC. Výrobce Sigma má průměr hodnot AUC pod parametry validace a splnil je pouze u oligonukleotidu s délkou sekvence 60 bp a 62 bp. Tudíž tato pevná fáze není vhodná pro delší

oligonukleotidy (Graf 12). Při použití této pevné fáze pro syntézu oligonukleotidu s délkou 62 bp a kratší, je tato pevná fáze validní a dá se použít pro danou syntézu. Samozřejmě vše vyplývá z potřeb výroby a náročnosti na kvalitu oligonukleotidu.

Oligonukleotidy syntetizované na pevné fázi Glen s délkou 67 bp a 74 bp vykazují odlišné hodnoty než ostatní oligonukleotidy na této pevné fázi. Může se jednat o nesoulad daných sekvencí s pevnou fází. Oligonukleotid s délkou 67 bp je stále validní (pouze jedenkrát pod sledovaným parametrem AUC %), oligonukleotid s délkou 74 bp nesplnil parametry validace již dvakrát. Takovéto odchylky nejsou u ostatních pevných fází přítomny, proto se domnívám, že jde o dříve popsany nesoulad sekvence s pevnou fází. 29 vzorků neboli 90,6 % vzorků syntetizovaných na pevné fázi Glen splnilo všechny sledované parametry a s úspěšností více jak 66 % je validní pro tuto syntézu oligonukleotidů. Oligonukleotidy na pevné fázi LGC s délkou 74 bp až 82 bp jedenkrát nesplnily parametry validace. Jednalo se o vzorky v jedné syntéze, tudíž chyba nastala při syntéze. Z tohoto důvodu můžeme i pevnou fází LGC považovat za validní pro tuto metodu. I když má tato pevná fáze nižší hodnoty výtěžku oproti pevné fázi Glen, za důležitější považujeme hodnoty AUC, které jsou validní. 22 vzorků neboli 68,8 % vzorků syntetizovaných na pevné fázi LGC splnilo všechny sledované parametry a s úspěšností více jak 66 % je validní pro tuto syntézu oligonukleotidů. Oligonukleotidy syntetizované na pevné fázi Sigma s délkou 60 bp a 62 bp splňují všechny sledované parametry. Oligonukleotidy s délkou 67 bp až 74 bp jsou stále validní, i přes 1-2x nesplnění parametrů AUC %. Oligonukleotidy delší než 77 bp zásadně nesplňují parametry validace. Proto pevnou fází Sigma můžeme použít pouze pro syntézy oligonukleotidů do 74 bp. 14 vzorků neboli 43,8 % vzorků syntetizovaných na pevné fázi Sigma splnilo všechny sledované parametry a s úspěšností menší jak 66 % není validní pro tuto syntézu oligonukleotidů. Toto hodnocení vyplývá z Tabulka 10 v přílohách a Graf 17. V Tabulka 10 jsou barevně označeny vzorky ne/splňující sledované parametry validace. Graf 17 zobrazuje počet a procenta vzorků, které splnily sledované parametry validace.

Dále bylo prokázáno, že pozice vzorku na syntetizátoru nemá vliv na AUC ani na ostatní klíčové parametry (Graf 13). Ačkoli vzorky syntetizované na pevných fázích LGC a Sigma nedosahují tak vysokých hodnot AUC ani výtěžků jako vzorky syntetizované na pevné fázi Glen (Tabulka 10), stále splňují základní požadavky a parametry validace na syntézu a mohou být použity jako alternativa v případě nedostupnosti nevhodnější varianty. V případě výrobce pevné fáze Sigma lze použít pouze sekvence dlouhé 60 bp až 70 bp, delší sekvence nesplňují sledované parametry validace (Graf 12, Tabulka 10).

#### 2.4.4. Spektrofotometrie

Při porovnávání výtěžků syntézy oligonukleotidů, syntetizovaných na pevných fázích od různých výrobců, vykazovaly nejvyšší hodnoty výtěžků vzorky syntetizované na pevné fázi Glen, následované vzorky syntetizovanými na pevných fázích Sigma a LGC (Graf 14). Ani v tomto případě nehrála pozice vzorku na syntetizátoru žádnou roli (Graf 16). Výrazný pokles výtěžku byl zaznamenán u pevné fáze LGC pro ID sekvenci 82, což může naznačovat nevhodnost této pevné fáze pro delší sekvence. Tento jev nebyl pozorován u ID sekvencí 82 na pevné fázi Glen ani Sigma. Nejvyšší výtěžnost byla pozorována u sekvencí s délkou 79 bp a 67 bp, což může souviset s optimální sekvencí k použitému typu pevné fáze a efektivitou

jednotlivých syntetických cyklů (Graf 15). Pro potvrzení této teorie o vhodné sekvenci a délce oligonukleotidu by museli být provedeny další experimenty zaměřující se na tuto problematiku.

#### 2.4.5. Technické parametry syntézy

V rámci syntézy oligonukleotidů je důležité zohlednit nejen použitou pevnou fázi a sekvenci samotnou, ale také technické parametry samotného procesu jako je např. reakční doba, dávkované objemy reagensů, teplota reakční komory nebo vysušení po oxidaci. Tyto faktory mohou mít zásadní vliv na výslednou kvalitu a výtěžek syntetizovaných produktů. Následující hypotetické úpravy syntetické metody by pro potvrzení správnosti musely být realizovány jako další experimenty např. na univerzitním výzkumném pracovišti či ve výzkumné instituci.

Jedním z klíčových parametrů by mohla být doba protékání jednotlivých reagensů syntetickými kolonkami. Lze měnit např. dobu kontaktu reagensů s pevnou fází nebo počet aplikací dané látky. Například v případě oxidačního kroku, při němž dochází k oxidaci meziprojektu, se domníváme, že kratší expoziční doba oxidizéru může mít pozitivní vliv na čistotu a výtěžek vzorku. Oxidace probíhá velmi rychle a zbytečně dlouhý kontakt oxidizéru s pevnou fází může vést ke zvýšené míře degradace nebo k vedlejším reakcím, které mohou snížit čistotu konečného produktu [73].

Lze rovněž optimalizovat délku jednotlivých kroků cyklu (deprotection, coupling, capping a oxidace) a přizpůsobit je specifickým potřebám dané sekvence. Tato forma optimalizace je efektivní především v prostředích, kde se opakovaně syntetizují identické sekvence. V rámci našeho pracovního postupu, kdy dochází k syntéze různorodých sekvencí, však není její použití prakticky využitelné.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo validovat proces syntézy oligonukleotidů (60 – 82 bp dlouhých) ve scale 200 nmol. Nedílnou součástí této práce bylo ověřit, zda jsou jednotlivé pevné fáze vhodné a validní pro použítou syntetickou metodu. Následně bylo provedeno porovnání účinnosti syntézy oligonukleotidů mezi třemi výrobci (Glen, LGC, Sigma) s cílem identifikovat klíčové faktory ovlivňující kvalitu výsledných produktů. Pomocí navrženého validačního plánu byly vybrány reprezentativní sekvence, stanoveny sledované parametry validace a následně byla realizována syntéza oligonukleotidů s důrazem na variabilitu délky sekvencí, výrobce pevné fáze i pozici vzorků na syntetizátoru.

Pro vyhodnocení kvality syntézy byly využity tři hlavní analytické metody – spektrofotometrie (kvantifikace výtěžků), MALDI-TOF MS (kontrola molekulové hmotnosti) a HPLC (stanovení čistoty, retenčního času a plochy pod píkem). Výsledky ukázaly, že pevná fáze Glen a LGC splnily všechny sledované parametry validace. Výrobce pevné fáze Sigma splnil podmínky validace pouze u oligonukleotidů s délkou sekvence 60 bp až 74 bp. Nejvyšší hodnoty výtěžku a AUC vykazovala pevná fáze Glen, u kterého byla zároveň potvrzena středně silná pozitivní korelace mezi TRM a AUC. Pevná fáze Sigma vykazovala nižší AUC oproti pevné fázi Glen a vysoký výtěžek. Zatímco výrobce pevné fáze LGC měl průměrné AUC, nejnižší průměrný výtěžek a k tomu i největší rozptyl hodnot výtěžků, především u delších sekvencí.

Statistické zpracování metodou ANOVA potvrdilo významné rozdíly mezi některými skupinami, zejména na základě délky sekvencí a typu pevné fáze. Naopak faktor pozice na syntetizátoru se neukázal jako významný.

Z praktického hlediska lze konstatovat, že zatímco pevné fáze od výrobců Glen a LGC prokázaly, že jsou validní pro syntézu oligonukleotidů a dosáhli více než 66 % úspěšnosti, výrobce Sigma vykazuje validní výsledky pouze u kratších sekvencí (60 bp – 74 bp). Nejlepší výsledky z hlediska čistoty a výtěžku byly dosaženy při použití pevné fáze od výrobce Glen, který se tak jeví jako nejvhodnější volba pro syntézy s vyššími nároky na kvalitu. Na základě výsledků lze metodu považovat za validní, neboť 65 analyzovaných vzorků (67,7 %) splnilo všechny stanovené parametry.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. KERLIN, Roy L. a LI, Xiantang. Pathology in Non-Clinical Drug Safety Assessment. Online. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. 2013, s. 725-750. ISBN 9780124157590. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00024-8>. [cit. 2024-02-29].
2. *What is an example of an oligonucleotide?* Online. Dostupné z: <https://nanosting.com/blog/what-is-an-example-of-an-oligonucleotide/>. [cit. 2024-02-29].
3. *Oligofigure12*. Online. In: BIONEER. C2010. Dostupné z: <https://us.bioneer.com/images/products/oligofigure12.png>. [cit. 2024-02-29].
4. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms, Nathalie Dias, C. A. Stein;. *Mol Cancer Ther* 1 March 2002; 1 (5): 347–355.
5. *Solid phase oligonucleotide synthesis*. Online. *Atd bio*. C2024. Dostupné z: <https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>. [cit. 2024-02-29].
6. *Nature Methods*. Online. 2018, roč. 15, č. 8. 2018. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41592-018-0096-x>. [cit. 2024-02-29].
7. *Oligonucleotide Synthesis*. Online. METTLER TOLEDO. C2024. Dostupné z: [https://www.mt.com/cz/cs/home/applications/L1\\_AutoChem\\_Applications/L2\\_ReactionAnalysis/oligonucleotide-synthesis.html](https://www.mt.com/cz/cs/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_ReactionAnalysis/oligonucleotide-synthesis.html). [cit. 2024-02-29].
8. *DNA Oligonucleotide Synthesis*. Online. MERCK. C2024. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/dna-oligonucleotide-synthesis>. [cit. 2024-03-01].
9. GIMENEZ MOLINA, Alejandro. *SYNTHESIS OF SHORT OLIGONUCLEOTIDES ON A SOLUBLE SUPPORT BY THE PHOSPHORAMIDITE METHOD*. Online, vedoucí Professor Harri Lönnberg. Turku: University of Turku, 2015. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgglefindmkaj/https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/113110/AnnalesAI521MolinaDISS.pdf?isAllowed=y&sequence=2>. [cit. 2024-03-01].
10. BRZEZINSKA, Jolanta; TRZCIŃSKI, Stanisław; STRZELEC, Joanna a CHMIELEWSKI, Marcin K. From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media. Online. *Bioorganic Chemistry*. 2023, roč. 140. ISSN 00452068. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106806>. [cit. 2024-03-01].
11. GUZAEV, Andrei P. a MANOHARAN, Muthiah. A Conformationally Preorganized Universal Solid Support for Efficient Oligonucleotide Synthesis. Online. In: *Journal of the American Chemical Society*. 2003, s. 2380-2381. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja0284613>. [cit. 2024-04-01].
12. *Universal Supports and Synthesis Supplies*. Online. GLEN research. Dostupné z: <https://www.glenresearch.com/products.html?cat=55>. [cit. 2024-04-01].
13. CLAEBOE, C. D. 3'-Modified oligonucleotides by reverse DNA synthesis. Online. *Nucleic Acids Research*. 2003, roč. 31, č. 19, s. 5685-5691. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg734>. [cit. 2024-04-01].
14. *Phosphoramidite compound identification and impurity control by Benchtop NMR*. Online. Magritek. 2023. Dostupné

- z: <https://magritek.com/2023/05/26/phosphoramidite-compound-identification-and-impurity-control-by-benchtop-nmr/>. [cit. 2024-04-01].
15. 카스텐 켈러. Method and apparatus for sequential synthesis of biopolymers. Online. 2020. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/KR20220042053A/en>. [cit. 2024-04-15].
  16. MCARDLE, Matthew. Which solid support should you select for your oligo synthesis? Online. *Select Science*. Dostupné z: <https://www.selectscience.net/editorial-articles/which-solid-support-should-you-select-for-your-oligo-synthesis/?artID=58864>. [cit. 2024-04-15].
  17. HE, Hua-Jun; STEIN, Erica V.; DEROSE, Paul a COLE, Kenneth D. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. Online. *BioTechniques*. 2018, roč. 64, č. 2, s. 59-68. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://doi.org/10.2144/btn-2017-0102>. [cit. 2024-04-19].
  18. Oligonucleotide Quantification. Online. In: *Merck*. C2024. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/quantitation-of-oligos>. [cit. 2024-04-19].
  19. EL ZAHAR, N. M.; MAGDY, N.; EL-KOSASY, A. M. a BARTLETT, Michael G. Chromatographic approaches for the characterization and quality control of therapeutic oligonucleotide impurities. Online. *Biomedical Chromatography*. 2018, roč. 32, č. 1. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.4088>. [cit. 2024-04-19].
  20. KANAVARIOTI, Anastassia. HPLC methods for purity evaluation of man-made single-stranded RNAs. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37642-z>. [cit. 2024-04-19].
  21. *Oligonucleotide Quality Control by Analytical HPLC*. Online. Merck. C2024. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/custom-dna-oligos-purity-verification>. [cit. 2024-04-19].
  22. *MALDI-TOF/TOF-MS*. Online. Wageningen University and research. Dostupné z: <https://www.wur.nl/en/product/maldi-toftof-ms.htm>. [cit. 2024-04-19].
  23. BURCAR, Bradley T.; CASSIDY, Lauren M.; MORIARTY, Elizabeth M.; JOSHI, Prakash C.; COARI, Kristin M. et al. Potential Pitfalls in MALDI-TOF MS Analysis of Abiotically Synthesized RNA Oligonucleotides. Online. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2013, roč. 43, č. 3, s. 247-261. ISSN 0169-6149. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11084-013-9334-5>. [cit. 2024-04-19].
  24. *Oligonucleotide Quality Control by Mass Spectrometry*. Online. Merck. C2024. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/custom-dna-oligos-qc-analysis-by-mass-spectrometry>. [cit. 2024-04-19].
  25. SADAPHAL, Priya a DHAMAK, Kavita. Review article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. Online. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2022, s. 23-29. ISSN 0976044X. Dostupné z: <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003>. [cit. 2024-04-19].
  26. COVEY, Thomas R.; BONNER, Ronald F.; SHUSHAN, Bori I.; HENION, Jack a BOYD, R. K. The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. Online. *Rapid Communications in Mass*

- Spectrometry*. 1988, roč. 2, č. 11, s. 249-256. ISSN 0951-4198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/rcm.1290021111>. [cit. 2024-08-16].
27. CAVALUZZI, Michael J a BORER, Philip N. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. Online. *Nucleic Acids Research*. 2004, roč. 32, č. 1, s. e13-e13. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gnh015>. [cit. 2024-06-05].
28. S. M. Hossein Tabatabaei Yazdi; , Han Mao Kiah; , Eva Ruiz Garcia; , Jian Ma; , Huimin Zhao et al. DNA-Based Storage: Trends and Methods. Online. S. 20. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://arxiv.org/pdf/1507.01611>. [cit. 2024-06-03].
29. *A step-by-step guide to successful installation qualification (IQ)*. Online. In: GMP SOP. 2023. Dostupné z: <https://www.gmpsop.com/a-step-by-step-guide-to-successful-installation-qualification-iq/>. [cit. 2024-06-05].
30. ROY, Subhadeep a CARUTHERS, Marvin. Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries. Online. *Molecules*. 2013, roč. 18, č. 11, s. 14268-14284. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules181114268>. [cit. 2024-07-30].
31. Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis. Online. In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley, 2000, 3.1.1-3.1.28. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/143613/cpnc0301.pdf?sequence=1/1000>. [cit. 2025-04-25].m
32. *UPLC vs HPLC: what is the difference?* Online. Alispharm.com. C2022. Dostupné z: <https://www.alispharm.com/articles/uplc-vs-hplc-what-is-the-difference/>. [cit. 2024-07-31].
33. NADLER, Wiebke Maria; WAIDELICH, Dietmar; KERNER, Alexander; HANKE, Sabrina; BERG, Regina et al. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. Online. *Journal of Proteome Research*. 2017, roč. 16, č. 3, s. 1207-1215. ISSN 1535-3893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00805>. [cit. 2024-07-31].
34. DIAS, Nathalie a STEIN, A. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. Online. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002, roč. 2002, č. Vol.1, s. 347-355. Dostupné také z: <http://aacrjournals.org/mct/article-pdf/1/5/347/2221857/gd0502000347.pdf>.
35. SMITH, C.I. Edvard a ZAIN, Rula. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. Online. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2019, roč. 59, č. 1, s. 605-630. ISSN 0362-1642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050>. [cit. 2024-08-14].
36. BARRETT, J.Carl a KAWASAKI, Ernest S. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. Online. *Drug Discovery Today*. 2003, roč. 8, č. 3, s. 134-141. ISSN 13596446. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02578-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02578-3). [cit. 2024-08-14].
37. LIU, Chang-Gong; CALIN, George Adrian; MELOON, Brian; GAMLIEL, Nir; SEVIGNANI, Cinzia et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, roč. 101, č. 26, s. 9740-9744. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0403293101>. [cit. 2024-08-14].

38. SILVERMAN, Adam P. a KOOL, Eric T. Oligonucleotide Probes for RNA-Targeted Fluorescence In Situ Hybridization. Online. *Advances in Clinical Chemistry*. 2007, s. 79-115. ISBN 9780123737038. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(06\)43003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(06)43003-1). [cit. 2024-08-14].
39. PU, Kan-Yi; LIU, Bin; TRAM, Kha; JAHANSHAHI-ANBUHI, Sana; BROWN, Christine L. et al. Optimizing the cationic conjugated polymer-sensitized fluorescent signal of dye labeled oligonucleotide for biosensor applications. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, roč. 24, č. 5, s. 1067-1073. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.029>. [cit. 2024-08-14].
40. Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis. Online. In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley, 2000, 3.1.1-3.1.28. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/143613/cpnc0301.pdf?sequence=1/1000>. [cit. 2024-08-14].
41. UNIVERSAL SUPPORT II AND III. Online. In: *Glen reports*. 2009, s. 1-2. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.glenresearch.com/media/olio3/productattachments/technical\\_bulletin/TB\\_Universal\\_Support\\_III.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.glenresearch.com/media/olio3/productattachments/technical_bulletin/TB_Universal_Support_III.pdf). [cit. 2024-08-14].
42. MUSUMECI, Domenica; AMATO, Jussara; RANDAZZO, Antonio; NOVELLINO, Ettore; GIANCOLA, Concetta et al. G-Quadruplex on Oligo Affinity Support (G4-OAS): An Easy Affinity Chromatography-Based Assay for the Screening of G-Quadruplex Ligands. Online. *Analytical Chemistry*. 2014, roč. 86, č. 9, s. 4126-4130. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac500444m>. [cit. 2024-08-15].
43. LARDEUX, Honorine; FEKETE, Szabolcs; LAUBER, Matthew; D'ATRI, Valentina a GUILLARME, Davy. High-Throughput Chromatographic Separation of Oligonucleotides: A Proof of Concept Using Ultra-Short Columns. Online. *Analytical Chemistry*. 2023, roč. 95, č. 27, s. 10448-10456. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01934>. [cit. 2024-08-16].
44. HE, Hua-Jun; STEIN, Erica V.; DEROSE, Paul a COLE, Kenneth D. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. Online. *BioTechniques*. 2018, roč. 64, č. 2, s. 59-68. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://doi.org/10.2144/btn-2017-0102>. [cit. 2024-08-16].
45. WILLIAM, A. Andrus; KAUFMAN, Jay L. a LE, Minh Q. Trityl monitor for automated polynucleotide synthesis. Online. 1993, s. 1-18. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/WO1994000471A1/en>. [cit. 2024-08-16].
46. KAUFMAN, J; LE, M; ROSS, G; HING, P; BUDIANSKY, M et al. Trityl monitoring of automated DNA synthesizer operation by conductivity: a new method of real-time analysis. Online. 1993, č. May;14(5), s. 834-9. Dostupné z: PMID: 8512711, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8512711/>. [cit. 2024-08-16].
47. MOLINA, Alejandro Gimenez a SANGHVI, Yogesh S. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. Online. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. 2019, roč. 77, č. 1. ISSN 1934-9270. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cpnc.82>. [cit. 2024-08-16].
48. ROY, Subhadeep a CARUTHERS, Marvin. Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries. Online. *Molecules*. 2013, roč. 18, č. 11, s. 14268-14284. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules181114268>. [cit. 2024-08-19].

49. *Scale syntézy*. Online. Generi biotech. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/info/scale-syntezy/>. [cit. 2024-08-19].
50. ALTEVOGT, Dominik; CEDILLO, Isaiah; CURTIS, Corrine; DIORAZIO, Louis J.; FABER, Jesse et al. Platform Strategies for Synthetic Oligonucleotide Drug Substances. Online. 2023, roč. 27, č. 12, s. 2211-2222. ISSN 1083-6160. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00303>. [cit. 2024-08-27].
51. LYONS, Jesseca. IQ, OQ, PQ. Online. Greenlight guru. C2024. Dostupné z: <https://www.greenlight.guru/blog/iq-oq-pq-process-validation>. [cit. 2024-08-27].
52. SOFER, Gail a W. ZABRISKIE, Dane. Biopharmaceutical process validation. Online. In: Biopharmaceutical process validation. New York: Marcel Dekker, 2000, s. 296-317. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=BoGgBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA309&dq=operational+qualification+of+oligonucleotide+synthesis&ots=3nxD2DRd4J&sig=eg8adyGJxeEC-7bqjC-1feYAB2I&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=BoGgBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA309&dq=operational+qualification+of+oligonucleotide+synthesis&ots=3nxD2DRd4J&sig=eg8adyGJxeEC-7bqjC-1feYAB2I&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true). [cit. 2024-08-27].
53. POU DYAL, Bidusha. Predictive Analysis of Installation and Operational Qualification Issues vs. Process Severity Events. Online. In: Predictive Analysis of Installation and Operational Qualification Issues vs. Process Severity Events. 2020, s. 18-19. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/126913/1191623911-MIT.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [cit. 2024-08-27].
54. SINGH RATHORE, Anurag a SOFER, Gail. PROCESS VALIDATION IN MANUFACTURING OF BIOPHARMACEUTICALS. Online. In: PROCESS VALIDATION IN MANUFACTURING OF BIOPHARMACEUTICALS. Taylor & Francis Group, 2005, s. 1-8. ISBN 1-57444-516-2. Dostupné z: [https://www.academia.edu/32311699/37612842\\_Process\\_Validation\\_in\\_Manufacturing\\_Bio\\_Pharmaceuticals\\_pdf](https://www.academia.edu/32311699/37612842_Process_Validation_in_Manufacturing_Bio_Pharmaceuticals_pdf). [cit. 2024-08-27].
55. SHUKLA, Shiv Shankar; PANDEY, Ravindra Kumar; GIDWANI, Beena a KALYANI, Gunjan. Online. In: Pharmaceutical Calibration, Validation and Qualification: A Comprehensive Approach. Springer, 2023, s. 59. ISBN 978-981-19-9002-1. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-19-9002-1>. [cit. 2024-08-29].
56. CAPALDI, Daniel; ACKLEY, Kathy; BROOKS, Doug; CARMODY, Judy; DRAPER, Ken et al. Quality Aspects of Oligonucleotide Drug Development: Specifications for Active Pharmaceutical Ingredients. Online. Drug Information Journal. 2012, roč. 46, č. 5, s. 611-626. ISSN 0092-8615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0092861512445311>. [cit. 2024-08-29].
57. KOSHEL, Brooke M.; NGUYEN, Jennifer M.; LAUBER, Matthew A.; DONCKERS, Katrien; VERLUYTEN, Willy et al. Raw Material Testing: Developing Methods for Quality Control of Phosphoramidites used in the Chemical Synthesis of Oligonucleotides. Online. Waters. 2022, s. 12. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/720007597en\\_f76bd28884/720007597en.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/720007597en_f76bd28884/720007597en.pdf). [cit. 2024-08-29].
58. Guideline on the Development and Manufacture of Oligonucleotides. Online. In: . European Medicines Agency, 2024, s. 8-26. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.ema.europa.eu/en/docum>

- ents/scientific-guideline/draft-guideline-development-manufacture-oligonucleotides\_en.pdf. [cit. 2024-08-29].
59. DEVOR, Eric J. a BEHLKE, Mark A. Oligonucleotide Yield, Resuspension, and Storage. Online. In: *Integrated DNA Technologies*. 2005, s. 1-2. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.crchudequebec.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/10/Oligonucleotide\\_Yield\\_Resuspension\\_and\\_Storage.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.crchudequebec.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/10/Oligonucleotide_Yield_Resuspension_and_Storage.pdf). [cit. 2024-08-29].
  60. ELLINGTON, Andrew a POLLARD, JR, Jack D. Introduction to the Synthesis and Purification of Oligonucleotides. Online. In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley & Sons, 2000, s. 14. Dostupné z: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/143751/cpnca03c.pdf?sequence=1/1000>. [cit. 2024-08-29].
  61. *Oligonucleotide Purification*. Online. Merck. C2024. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/best-purification?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=10193651930&utm\\_content=101663337573&gclid=CjwKCAjwxNW2BhAkEiwA24Cm9Opktpyu4to7iWs5rB8idKOZuQPMtUh3pUT1ANGtVgmN-KMROvFDhoC5L0QAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/dna-and-rna-purification/best-purification?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=10193651930&utm_content=101663337573&gclid=CjwKCAjwxNW2BhAkEiwA24Cm9Opktpyu4to7iWs5rB8idKOZuQPMtUh3pUT1ANGtVgmN-KMROvFDhoC5L0QAvD_BwE). [cit. 2024-09-02].
  62. LEPROUST, Emily M.; PECK, Bill J.; SPIRIN, Konstantin; MCCUEN, Heather Brummel; MOORE, Bridget et al. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. Online. *Nucleic Acids Research*. 2010, roč. 38, č. 8, s. 2522-2540. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq163>. [cit. 2024-09-02].
  63. *Tipy a triky v HPLC*. Online. LabRulez. 2022. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/2004>. [cit. 2025-02-21].
  64. MCLEOD, Zachary a BESTWICK, Megan. *Separace nukleových kyselin iontovým párem s reverzní fází, vysoce výkonná kapalinová chromatografie*. Online. Linfield University. 2019. Dostupné z: <https://digitalcommons.linfield.edu/symposium/2019/all/3/>. [cit. 2025-02-21].
  65. ANDRUS, William A.; KAUFMAN, Jay L. a LE, Minh Q. Trityl monitor for automated polynucleotide synthesis. Online. 1993. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/WO1994000471A1/en>. [cit. 2025-02-21].
  66. Kaufman J, Le M, Ross G, et al. Trityl monitoring of automated DNA synthesizer operation by conductivity: a new method of real-time analysis. *Biotechniques*. 1993;14(5):834-839.
  67. Quality Assurance. Online. In: *ISOGEN Life science*. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://isogen-lifescience.com/\\_file/274/Quality\\_Assurance\\_Information\\_1.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://isogen-lifescience.com/_file/274/Quality_Assurance_Information_1.pdf). [cit. 2025-02-21].
  68. GENERI BIOTECH s.r.o. *SOP č. 018 Zařízení: 018A009\_Ovládání syntetizéru K&A\_1.0*. Hradec Králové: GENERI BIOTECH s.r.o., 2024. Interní dokument.
  69. H-8 SE. Online. K&A Labs GmbH. Dostupné z: <https://ka-labs.de/dna-rna-synthesizers/h-8-se/>. [cit. 2025-03-11].
  70. CHENG, Ji-Yen. *Schematic diagram of the 1536 channel oligonucleotide synthesizer*. Online. In: ResearchGate. 2002. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/11156072\\_High\\_throughput\\_parallel\\_synt\\_hesis\\_of\\_oligonucleotides\\_with\\_1536\\_channel\\_synthesizer/figures](https://www.researchgate.net/publication/11156072_High_throughput_parallel_synt_hesis_of_oligonucleotides_with_1536_channel_synthesizer/figures). [cit. 2025-03-11].

71. Analyza rozptylu (ANOVA). Online. In: *Poznamky k predmetu Aplikovana statistika*. Praha, s. 1-7. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://web.vscht.cz/~snuparkj/poznamky\\_k\\_AS\\_ANOVA.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://web.vscht.cz/~snuparkj/poznamky_k_AS_ANOVA.pdf). [cit. 2025-03-25].
72. *Úvod do analýzy dat v R*. Online. Sociology. Dostupné z: <https://sociology-facu.github.io/uvod-do-r-kniha/rstudio.html>. [cit. 2025-03-25].
73. SCHAUDY, Erika; IBAÑEZ-REDÍN, Gisela; PARLAR, Etkin; SOMOZA, Mark M. a LIETARD, Jory. Nonaqueous Oxidation in DNA Microarray Synthesis Improves the Oligonucleotide Quality and Preserves Surface Integrity on Gold and Indium Tin Oxide Substrates. Online. In: *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 2024, s. 2378-2386. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c04166>. [cit. 2025-04-29].

## PŘÍLOHY

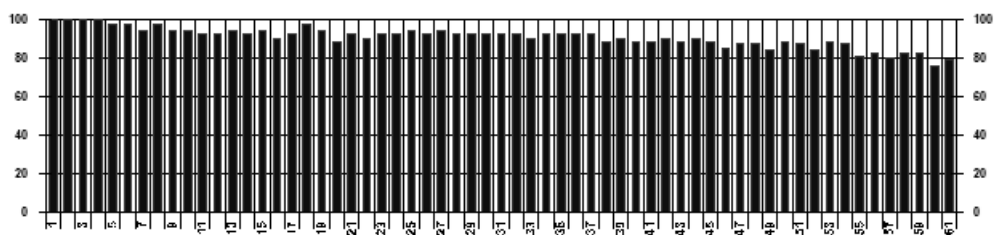
Kód	Délka (bp)	Pevná fáze	Pozice na syntetizátoru	MW Teor (Da)	MW MALDI (Da)	Rozdíl (Da)	RT (min)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)
V02665	70	Glen	1	21625,058	21609,9	15,158	8,3	60,08	121,3745
V02666	79	Glen	2	24352,798	24382,2	29,402	8,3	58,89	124,9884
V02667	62	Glen	3	19169,463	19205,2	35,737	8,17	64,74	120,0149
V02668	67	Glen	4	20693,457	20699,8	6,343	8,28	53,04	129,1676
V02669	60	Glen	5	18551,071	18574,7	23,629	8,22	65,87	119,2883
V02670	82	Glen	6	25235,362	25268,5	33,138	8,31	53,43	129,5679
V02671	77	Glen	7	23759,418	23767	7,582	8,29	59,57	122,2682
V02672	74	Glen	8	22796,806	22807,5	10,694	8,32	48,33	123,2636
V02673	70	Glen	2	21625,058	21633,3	8,242	8,28	55,36	117,5761
V02674	79	Glen	3	24352,798	24379,1	26,302	8,28	54,31	122,9646
V02675	62	Glen	4	19169,463	19205,8	36,337	8,12	63,01	114,4635
V02676	67	Glen	5	20693,457	20687	6,457	8,27	49,62	123,8525
V02677	60	Glen	6	18551,071	18579,7	28,629	8,22	64,16	123,1201
V02678	82	Glen	7	25235,362	25245	9,638	8,28	50,93	124,8735
V02679	77	Glen	8	23759,418	23779,2	19,782	8,28	57,13	114,1129
V02680	74	Glen	1	22796,806	22804,4	7,594	8,3	48,03	126,4301
V02681	70	Glen	3	21625,058	21592,2	32,858	8,29	63,19	116,8537
V02682	79	Glen	4	24352,798	24365,3	12,502	8,29	57,09	129,6151
V02683	62	Glen	5	19169,463	19208,4	38,937	8,12	67,31	110,6061
V02684	67	Glen	6	20693,457	20699,1	5,643	8,27	52,64	124,8512
V02685	60	Glen	7	18551,071	18562,4	11,329	8,22	65,2	114,7021
V02686	82	Glen	8	25235,362	25204,7	30,662	8,28	55,34	127,704
V02687	77	Glen	1	23759,418	23766	6,582	8,31	58,84	119,2465
V02688	74	Glen	2	22796,806	22797,1	0,294	8,28	50,75	119,6127
V02689	70	Glen	4	21625,058	21645,3	20,242	8,27	60,66	121,1193
V02690	79	Glen	5	24352,798	24381,9	29,102	8,28	54,5	122,1693
V02691	62	Glen	6	19169,463	19162,1	7,363	8,13	64,92	110,5613
V02692	67	Glen	7	20693,457	20705,4	11,943	8,28	50,21	125,9691
V02693	60	Glen	8	18551,071	18577,6	26,529	8,19	64,12	116,3333
V02694	82	Glen	1	25235,362	25230,2	5,162	8,3	52,42	127,7883
V02695	77	Glen	2	23759,418	23749	10,418	8,31	58,58	113,075
V02696	74	Glen	3	22796,806	22807,9	11,094	8,31	50,07	106,3759
V02697	70	Sigma	1	21625,058	21640,2	15,142	8,32	50,9	107,9148
V02698	79	Sigma	2	24352,798	24389,5	36,702	8,31	44,59	105,6197
V02699	62	Sigma	3	19169,463	19200,8	31,337	8,18	61,11	114,6643
V02700	67	Sigma	4	20693,457	20735,6	42,143	8,29	55,71	111,0373
V02701	60	Sigma	5	18551,071	18581,4	30,329	8,22	59,27	109,6559
V02702	82	Sigma	6	25235,362	25192,8	42,562	8,33	43,15	103,9124
V02703	77	Sigma	7	23759,418	23764,7	5,282	8,33	43,43	98,46345
V02704	74	Sigma	8	22796,806	22790	6,806	8,32	48,89	106,9424
V02705	70	Sigma	2	21625,058	21619,1	5,958	8,28	50,9	106,5646

Kód	Délka (bp)	Pevná fáze	Pozice na syntetizátoru	MW Teor (Da)	MW MALDI (Da)	Rozdíl (Da)	RT (min)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)
V02706	79	Sigma	3	24352,798	24348,2	4,598	8,32	44,23	103,5766
V02707	62	Sigma	4	19169,463	19169,9	0,437	8,19	60	91,93452
V02708	67	Sigma	5	20693,457	20708,9	15,443	8,29	46,91	131,2226
V02709	60	Sigma	6	18551,071	18580,4	29,329	8,24	59,14	104,0954
V02710	82	Sigma	7	25235,362	25236,6	1,238	8,35	42,35	112,583
V02711	77	Sigma	8	23759,418	23749,4	10,018	8,31	46,46	107,4542
V02712	74	Sigma	1	22796,806	22792,5	4,306	8,33	50,27	106,5676
V02713	70	Sigma	3	21625,058	21630	4,942	8,34	55,06	109,5802
V02714	79	Sigma	4	24352,798	24355,8	3,002	8,32	47,97	109,8446
V02715	62	Sigma	5	19169,463	19166,1	3,363	8,17	62,9	120,4694
V02716	67	Sigma	6	20693,457	20717	23,543	8,32	56,46	118,5986
V02717	60	Sigma	7	18551,071	18558,6	7,529	8,22	62,05	115,2508
V02718	82	Sigma	8	25235,362	25253,9	18,538	8,35	44,17	104,2464
V02719	77	Sigma	1	23759,418	23765,9	6,482	8,32	48,28	116,7817
V02720	74	Sigma	2	22796,806	22814,8	17,994	8,33	51,95	118,7602
V02721	70	Sigma	4	21625,058	21620,9	4,158	8,33	45,21	119,212
V02722	79	Sigma	5	24352,798	24345,8	6,998	8,33	40,66	108,9192
V02723	62	Sigma	6	19169,463	19164,2	5,263	8,21	51,55	118,8187
V02724	67	Sigma	7	20693,457	20707,5	14,043	8,3	48,28	117,1258
V02725	60	Sigma	8	18551,071	18585,9	34,829	8,25	50,45	112,1899
V02726	82	Sigma	1	25235,362	25232,9	2,462	8,34	38,77	112,102
V02727	77	Sigma	2	23759,418	23756,1	3,318	8,35	39,25	115,3459
V02728	74	Sigma	3	22796,806	22829	32,194	8,34	45,22	116,3003
V02729	70	LGC	1	21625,058	21629,3	4,242	8,33	54,8	111,0765
V02730	79	LGC	2	24352,798	24340,7	12,098	8,35	51,48	115,0258
V02731	62	LGC	3	19169,463	19161,1	8,363	8,18	60,38	106,6406
V02732	67	LGC	4	20693,457	20717,4	23,943	8,3	57,74	115,4003
V02733	60	LGC	5	18551,071	18567,2	16,129	8,27	58,74	112,9687
V02734	82	LGC	6	25235,362	25249,8	14,438	8,34	50,53	95,11972
V02735	77	LGC	7	23759,418	23762,3	2,882	8,34	54,44	104,15
V02736	74	LGC	8	22796,806	22800,9	4,094	8,33	53,9	109,9788
V02737	70	LGC	2	21625,058	21619,1	5,958	8,35	54,62	106,4825
V02738	79	LGC	3	24352,798	24307,8	44,998	8,35	52,72	97,69866
V02739	62	LGC	4	19169,463	19149,8	19,663	8,2	58,57	110,6816
V02740	67	LGC	5	20693,457	20724,4	30,943	8,32	56,15	113,0927
V02741	60	LGC	6	18551,071	18558,2	7,129	8,27	59,09	108,6206
V02742	82	LGC	7	25235,362	25236,8	1,438	8,36	49,92	90,21566
V02743	77	LGC	8	23759,418	23771,4	11,982	8,34	53,63	111,4722
V02744	74	LGC	1	22796,806	22801,8	4,994	8,35	52,16	113,8582
V02745	70	LGC	3	21625,058	21630,8	5,742	8,37	52,85	108,9615
V02746	79	LGC	4	24352,798	24338,3	14,498	8,36	49,91	94,84939
V02747	62	LGC	5	19169,463	19172,1	2,637	8,21	59,2	107,9279
V02748	67	LGC	6	20693,457	20676	17,457	8,34	54,16	111,6922
V02749	60	LGC	7	18551,071	18542,4	8,671	8,26	56,5	111,0821
V02750	82	LGC	8	25235,362	25232,1	3,262	8,37	48,03	94,55009

Kód	Délka (bp)	Pevná fáze	Pozice na syntetizátoru	MW Teor (Da)	MW MALDI (Da)	Rozdíl (Da)	RT (min)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)
V02751	77	LGC	1	23759,418	23755,9	3,518	8,37	49,25	106,0242
V02752	74	LGC	2	22796,806	22791,3	5,506	8,33	47,81	113,1732
V02753	70	LGC	4	21625,058	21628,1	3,042	8,37	60,83	111,8622
V02754	79	LGC	5	24352,798	24348,2	4,598	8,36	59,22	96,62936
V02755	62	LGC	6	19169,463	19180,1	10,637	8,19	65,92	108,6159
V02756	67	LGC	7	20693,457	20680,9	12,557	8,33	63,39	111,6334
V02757	60	LGC	8	18551,071	18592,7	41,629	8,27	65,39	107,3161
V02758	82	LGC	1	25235,362	25235,3	0,062	8,37	56,73	94,27568
V02759	77	LGC	2	23759,418	23780,3	20,882	8,35	60,05	102,6365
V02760	74	LGC	3	22796,806	22802,9	6,094	8,36	58,53	92,93777

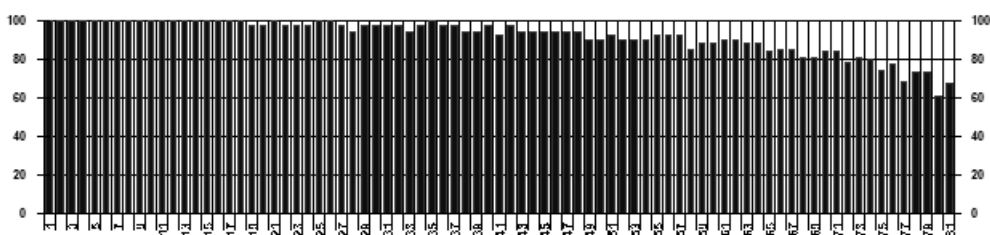
Tabulka 10 Celkové výsledky syntéz z MALDI TOF analýzy, HPLC analýzy a spektrofotometrie. Světle modrou barvou jsou označeny vzorky, které jsou graficky znázorněny v této práci. V sloupcích AUC % a výtěžek je heat mapa, která barevně zobrazuje hodnoty AUC a výtěžku. Pokud jsou hodnoty pod sledovaným parametrem validace, jsou vyznačeny červenou barvou, pokud se hodnoty pohybují okolo sledovaného parametru, tak jsou zobrazeny žlutě a pokud jsou hodnoty nad sledovaným parametrem neboli jsou nadprůměrné, tak jsou zobrazeny zeleně.

V02707 : Tot. yield: 79%, Step to step yield= 99.6%, V2: 6



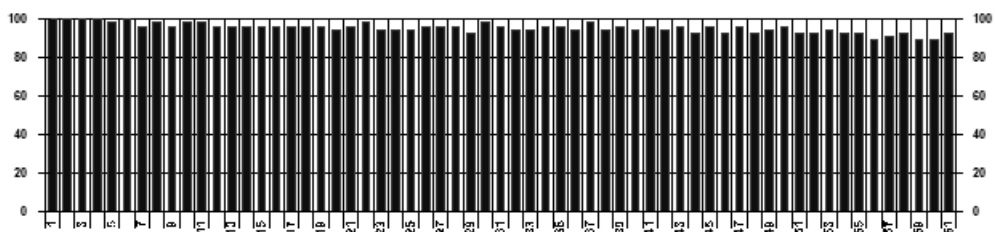
Graf 18 Záznam tritylmonitoru vzorku V02707 s pevnou fází Sigma a délkou 62 bp s mírně klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 79%.

V02710 : Tot. yield: 67%, Step to step yield= 99.5%, V2: 6



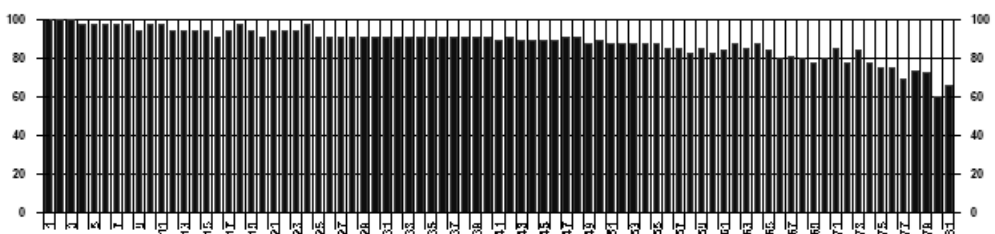
Graf 19 Záznam tritylmonitoru vzorku V02710 s pevnou fází Sigma a délkou 82 bp s klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 67%.

V02739 : Tot. yield: 92%, Step to step yield= 99.9%, V2: 9

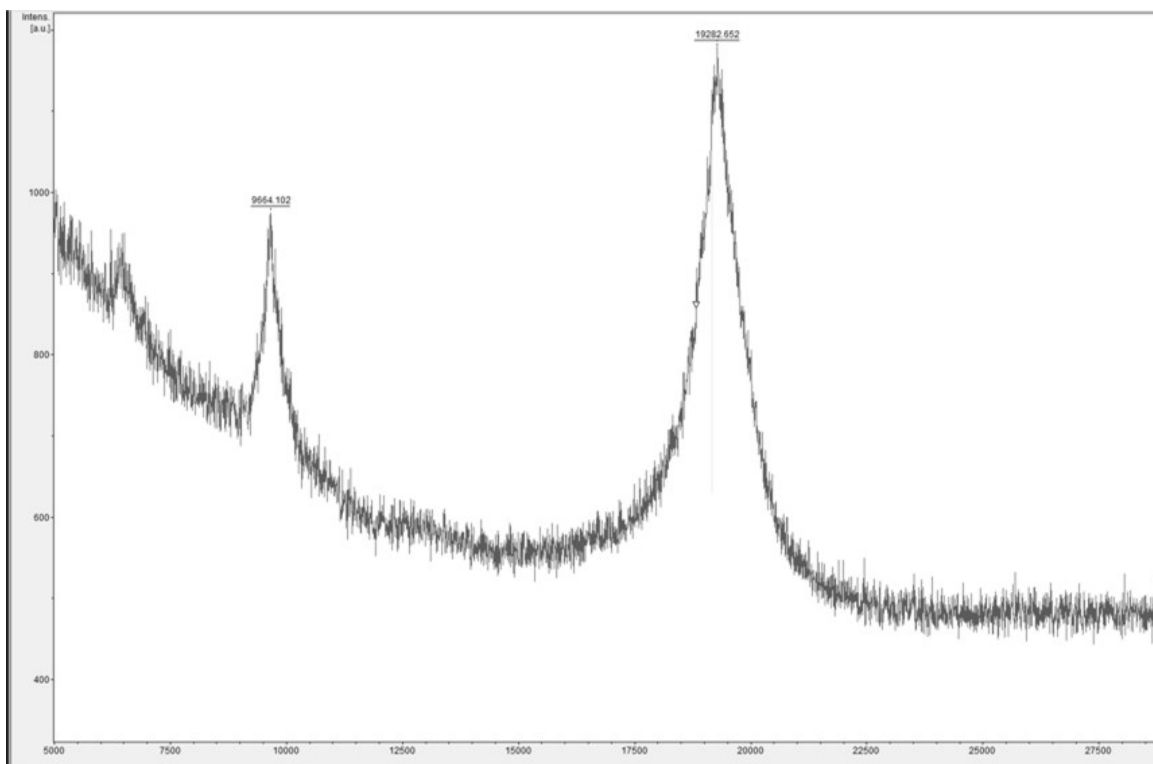


Graf 20 Záznam tritylmonitoru vzorku V02739 s pevnou fází LGC a délkou 62 s konstantní hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 92%.

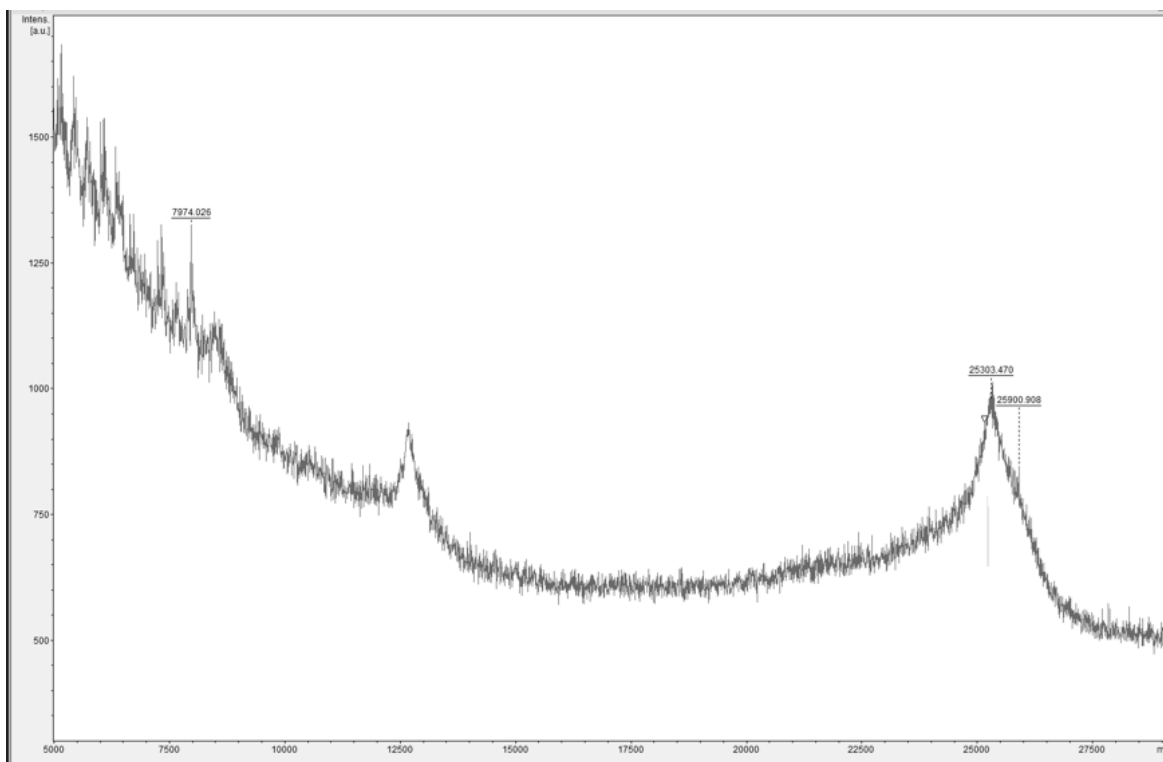
V02742 : Tot. yield: 66%, Step to step yield= 99.5%, V2: 5



Graf 21 Záznam tritylmonitoru vzorku V02742 s pevnou fází LGC a délkou 82 s klesající hodnotou TRM total yield. Na ose x je uveden počet cyklů syntézy, na ose y poté hodnoty TRM total yield (%). V této syntéze se přenos zvýšil, což naznačuje pokles retence tritylu, a celkový výtěžek klesl na 66%.

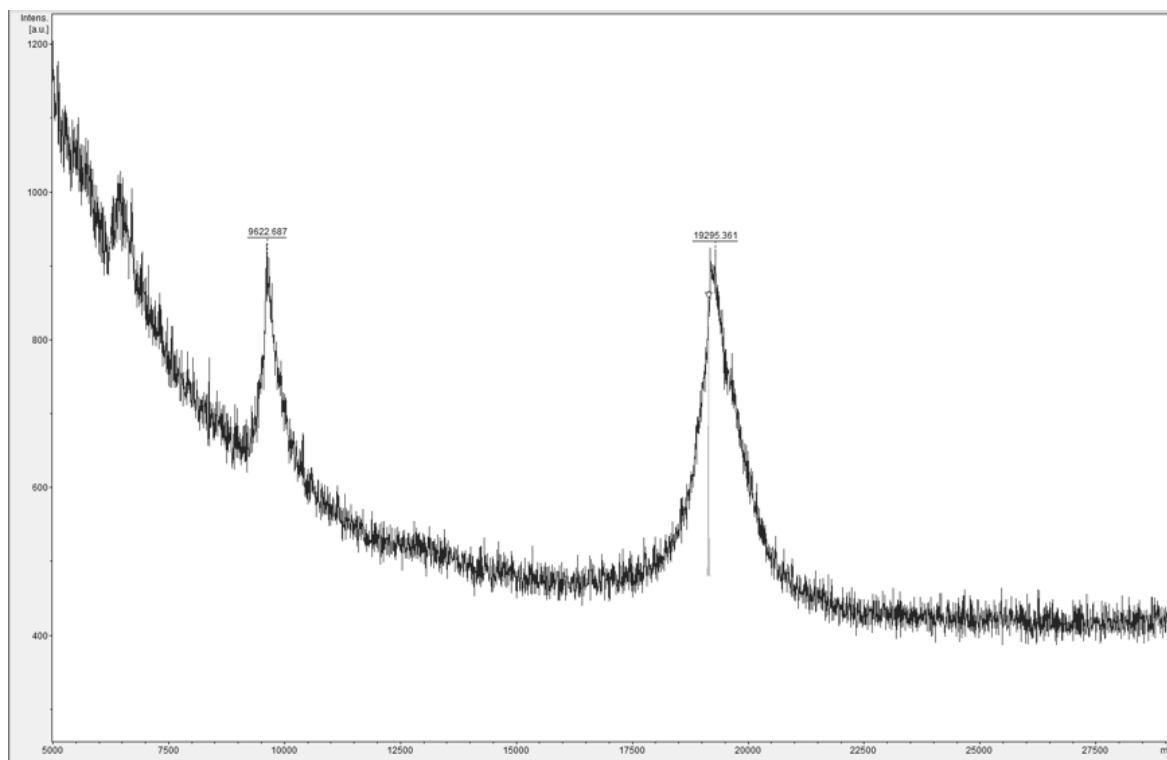


Graf 22 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02707 o délce 62 bp na pevné fázi Sigma s viditelným píkem o hodnotě 19169,9 Da. Na ose x je uvedena hmotnost ( $m/z$ ), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.

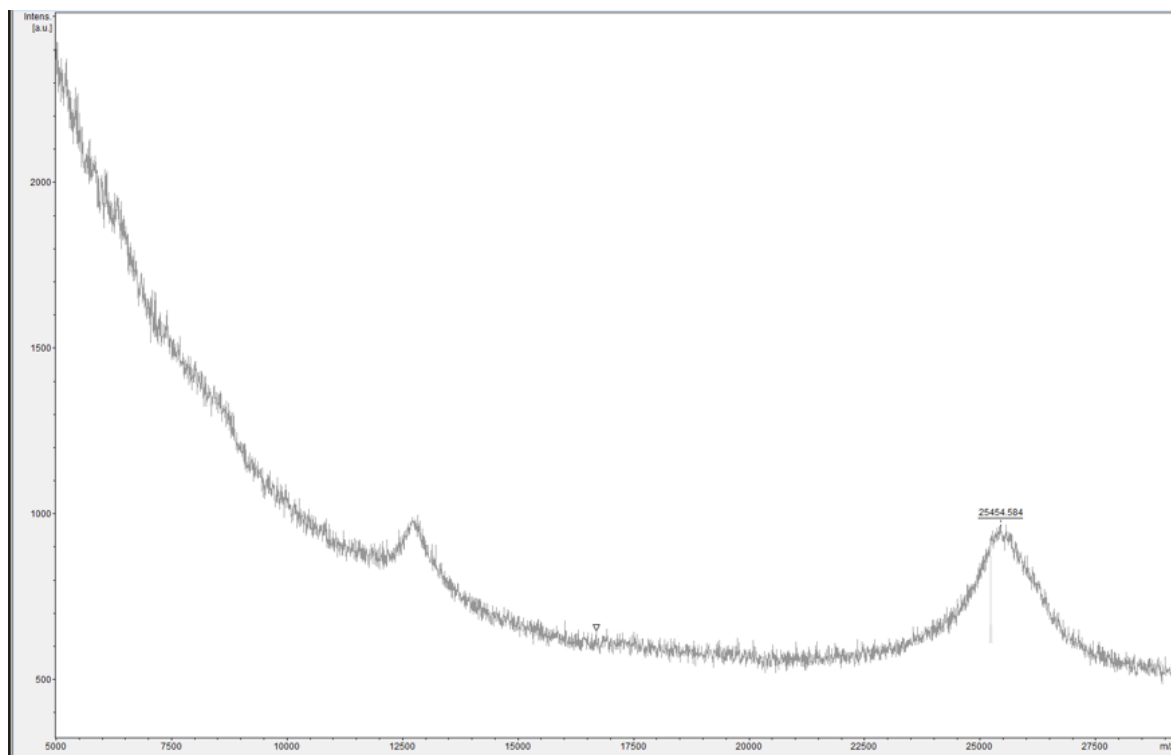


Graf 23 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02710 o délce 82 bp na pevné fázi Sigma s viditelným píkem o hodnotě 25236,6 Da. Na ose x je uvedena hmotnost ( $m/z$ ), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se

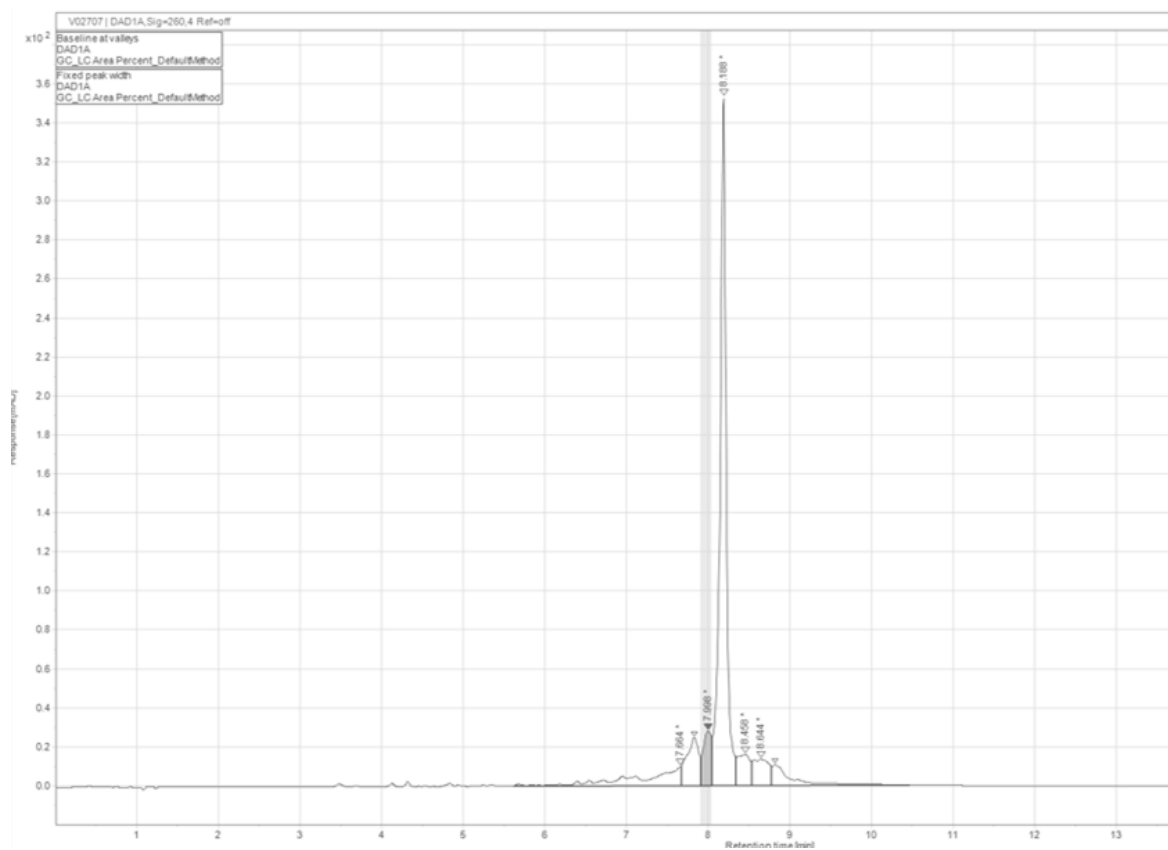
objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.



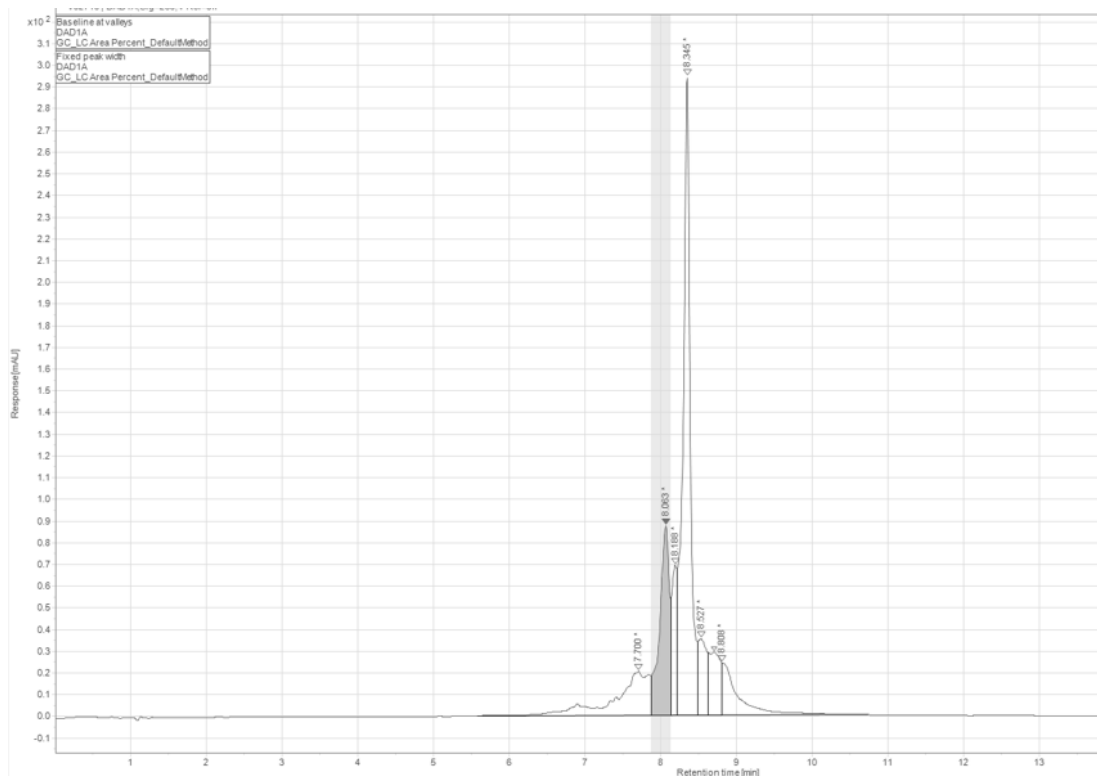
Graf 24 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02739 o délce 62 bp na pevné fázi LGC s viditelným píkem o hodnotě 19149,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost ( $m/z$ ), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.



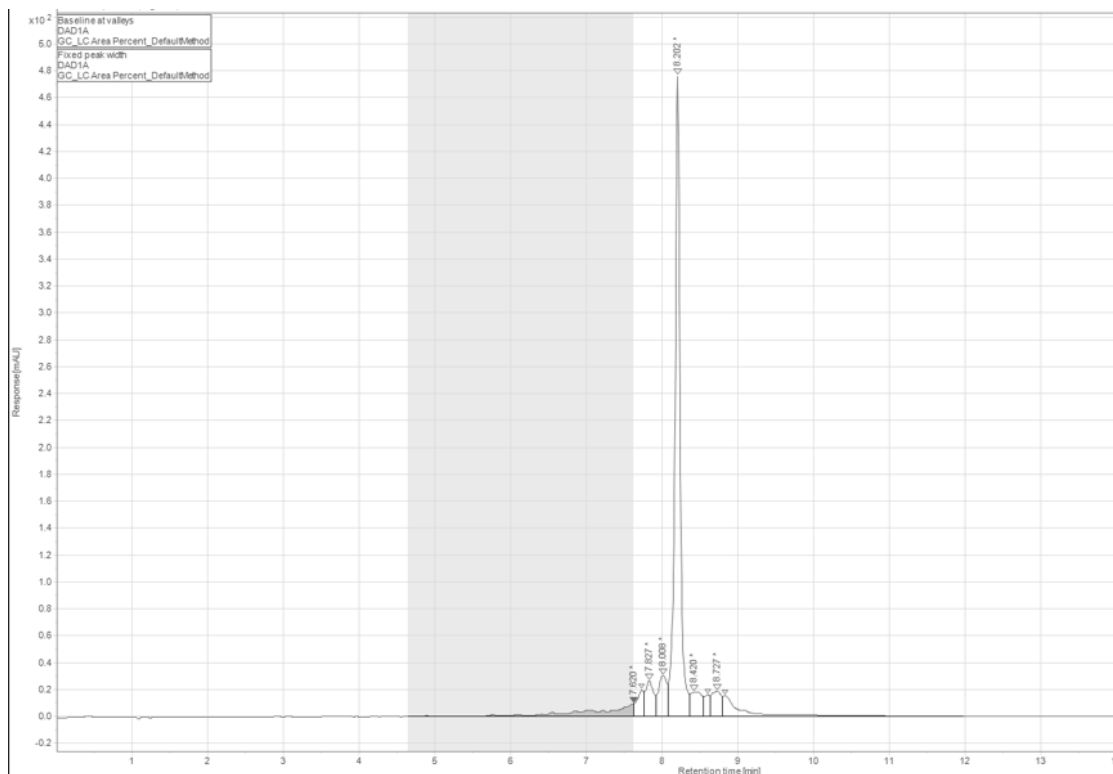
Graf 25 Spektrum z MALDI TOF analýzy vzorku V02742 o délce 82 bp na pevné fázi LGC s viditelným píkem o hodnotě 25236,8 Da. Na ose x je uvedena hmotnost ( $m/z$ ), osa y představuje relativní intenzitu signálu. Kromě hlavního signálu se objevují i vedlejší píky, které mohou být způsobeny přítomností kratšího oligonukleotidu, fragmentů analyzovaného vzorku nebo aduktů s kationty.



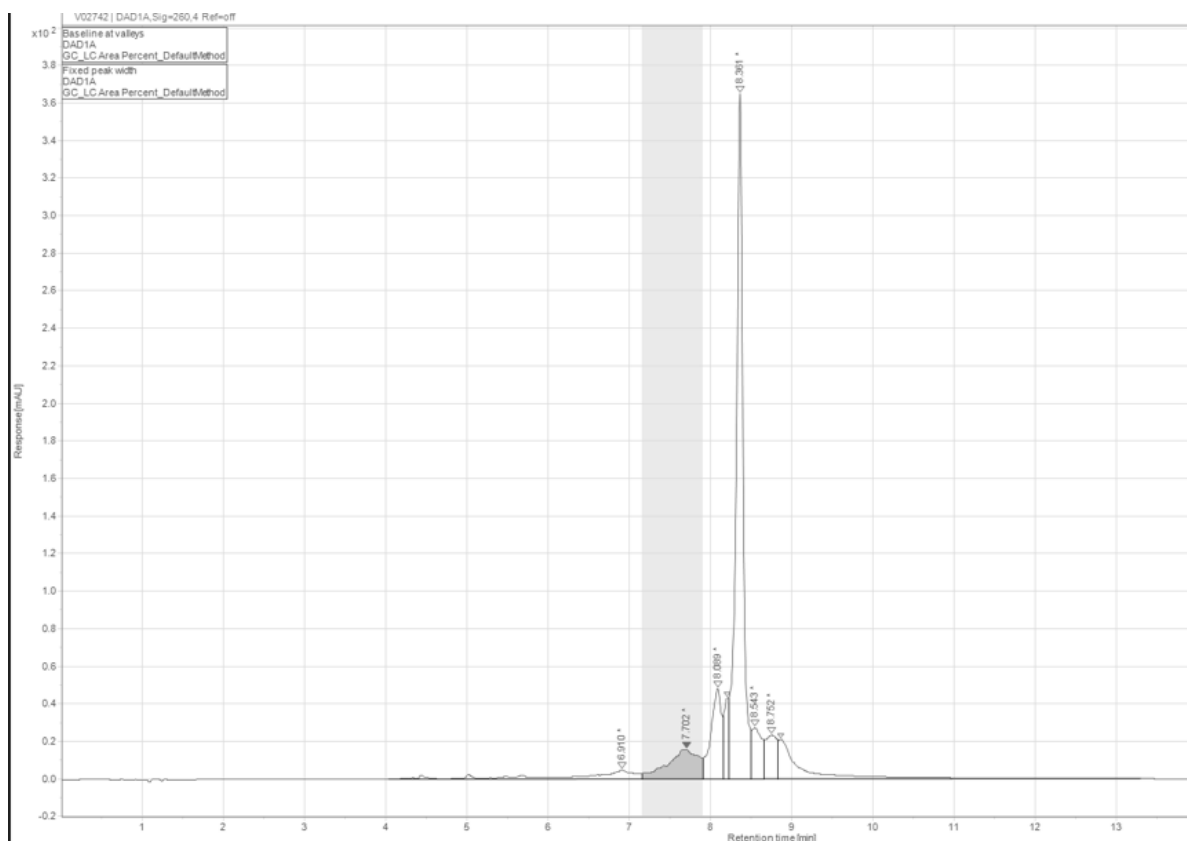
Graf 26 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02707 s délkou 62 bp na pevné fázi Sigma s retenčním časem 8,19 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty.



Graf 27 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02710 s délkou 82 bp na pevné fázi Sigma s retenčním časem 8,35 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty.



Graf 28 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02739 s délkou 62 bp na pevné fázi LGC s retenčním časem 8,2 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty.



Graf 29 Chromatogram HPLC analýzy vzorku V02742 s délkou 82 bp na pevné fázi LGC s retenčním časem 8,36 minut. Osa x představuje čas retence (minuty) a osa y odpovídá intenzitě detekovaného signálu. Přítomné menší píky mohou odrážet vedlejší produkty nebo nečistoty.

Kód	Délka (bp)	Support	MALDI-TOF (Da)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Souhrnné hodnocení
V02665	70	Glen	1	1	1	1
V02666	79	Glen	1	1	1	1
V02667	62	Glen	1	1	1	1
V02668	67	Glen	1	1	1	1
V02669	60	Glen	1	1	1	1
V02670	82	Glen	1	1	1	1
V02671	77	Glen	1	1	1	1
V02672	74	Glen	1	0	1	0
V02673	70	Glen	1	1	1	1
V02674	79	Glen	1	1	1	1
V02675	62	Glen	1	1	1	1
V02676	67	Glen	1	0	1	0
V02677	60	Glen	1	1	1	1
V02678	82	Glen	1	1	1	1
V02679	77	Glen	1	1	1	1
V02680	74	Glen	1	0	1	0
V02681	70	Glen	1	1	1	1
V02682	79	Glen	1	1	1	1

Kód	Délka (bp)	Support	MALDI-TOF (Da)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Souhrnné hodnocení
V02683	62	Glen	1	1	1	1
V02684	67	Glen	1	1	1	1
V02685	60	Glen	1	1	1	1
V02686	82	Glen	1	1	1	1
V02687	77	Glen	1	1	1	1
V02688	74	Glen	1	1	1	1
V02689	70	Glen	1	1	1	1
V02690	79	Glen	1	1	1	1
V02691	62	Glen	1	1	1	1
V02692	67	Glen	1	1	1	1
V02693	60	Glen	1	1	1	1
V02694	82	Glen	1	1	1	1
V02695	77	Glen	1	1	1	1
V02696	74	Glen	1	1	1	1
V02697	70	Sigma	1	1	1	1
V02698	79	Sigma	1	0	1	0
V02699	62	Sigma	1	1	1	1
V02700	67	Sigma	1	1	1	1
V02701	60	Sigma	1	1	1	1
V02702	82	Sigma	1	0	1	0
V02703	77	Sigma	1	0	0	0
V02704	74	Sigma	1	0	1	0
V02705	70	Sigma	1	1	1	1
V02706	79	Sigma	1	0	1	0
V02707	62	Sigma	1	1	0	0
V02708	67	Sigma	1	0	1	0
V02709	60	Sigma	1	1	1	1
V02710	82	Sigma	1	0	1	0
V02711	77	Sigma	1	0	1	0
V02712	74	Sigma	1	1	1	1
V02713	70	Sigma	1	1	1	1
V02714	79	Sigma	1	0	1	0
V02715	62	Sigma	1	1	1	1
V02716	67	Sigma	1	1	1	1
V02717	60	Sigma	1	1	1	1
V02718	82	Sigma	1	0	1	0
V02719	77	Sigma	1	0	1	0
V02720	74	Sigma	1	1	1	1
V02721	70	Sigma	1	0	1	0
V02722	79	Sigma	1	0	1	0
V02723	62	Sigma	1	1	1	1
V02724	67	Sigma	1	0	1	0
V02725	60	Sigma	1	1	1	1
V02726	82	Sigma	1	0	1	0
V02727	77	Sigma	1	0	1	0

Kód	Délka (bp)	Support	MALDI-TOF (Da)	AUC (%)	Výtěžek (nmol)	Souhrnné hodnocení
V02728	74	Sigma	1	0	1	0
V02729	70	LGC	1	1	1	1
V02730	79	LGC	1	1	1	1
V02731	62	LGC	1	1	1	1
V02732	67	LGC	1	1	1	1
V02733	60	LGC	1	1	1	1
V02734	82	LGC	1	1	0	0
V02735	77	LGC	1	1	1	1
V02736	74	LGC	1	1	1	1
V02737	70	LGC	1	1	1	1
V02738	79	LGC	1	1	0	0
V02739	62	LGC	1	1	1	1
V02740	67	LGC	1	1	1	1
V02741	60	LGC	1	1	1	1
V02742	82	LGC	1	0	0	0
V02743	77	LGC	1	1	1	1
V02744	74	LGC	1	1	1	1
V02745	70	LGC	1	1	1	1
V02746	79	LGC	1	0	0	0
V02747	62	LGC	1	1	1	1
V02748	67	LGC	1	1	1	1
V02749	60	LGC	1	1	1	1
V02750	82	LGC	1	0	0	0
V02751	77	LGC	1	0	1	0
V02752	74	LGC	1	0	1	0
V02753	70	LGC	1	1	1	1
V02754	79	LGC	1	1	0	0
V02755	62	LGC	1	1	1	1
V02756	67	LGC	1	1	1	1
V02757	60	LGC	1	1	1	1
V02758	82	LGC	1	1	0	0
V02759	77	LGC	1	1	1	1
V02760	74	LGC	1	1	0	0

Tabulka 11 Souhrnné vyhodnocení sledovaných parametrů validace. 1=splnil dané parametry, 0=nesplnil parametry. Pokud vzorek splnil všechny parametry, tak v souhrnném hodnocení nese označení 1, pokud alespoň jeden parametr vzorek nesplnil, tak nese hodnotu 0. Výrobce Glen má 29 vzorků, které splnily sledované parametry. Výrobce Sigma jich má pouze 14 a výrobce LGC má 22 vzorků, které splnily všechny sledované parametry.