

## Oponentský posudek diplomové práce

Název: Validace metod syntézy oligonukleotidů ve scale 200 nmol

Autorka: Bc. Adéla Rázková

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Vedoucí práce: PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.

Konzultant práce: PharmDr. Filip Kostelanský, Ph.D.

Oponentka práce: Mgr. Michaela Beranová, Ph.D.

Rok obhajoby: 2025

Předložená experimentální diplomová práce studentky Bc. Adély Rázkové se zabývala validací procesu syntézy oligonukleotidů v rozsahu délky 60–82 bází ve scale 200 nmol a porovnávala vliv tří výrobců pevných fází (Glen, LGC, Sigma) na výtěžnost syntézy. Navíc identifikovala další faktory, které by mohly mít vliv na kvalitu syntézy.

Praktická část práce byla vypracována ve firmě Generi Biotech, s.r.o. v Hradci Králové pod vedením konzultanta PharmDr. Filipa Kostelanského, Ph.D. a školitele PharmDr. Antonína Libry, Ph.D..

Práce má standardní členění – úvod, teoretickou část, praktickou část a závěr. V rámci praktické části je potom obsažen cíl práce, metody, výsledky a diskuse. Navíc nabízí seznam ilustrací (celkem 5 obrázků), seznam tabulek (celkem 11), seznam grafů (celkem 29) a seznam použité literatury (celkem 73 odkazů). To vše činí dohromady celkem 75 číslovaných stran.

V teoretické části jsou stručně shrnuta témata definice oligonukleotidů, dva způsoby jejich chemické syntézy (fosforamiditová a fosfonátová metoda) a také pevné fáze s její rolí v samotné syntéze, také představuje základní schéma syntetizéru a zabývá se analytickými metodami hodnocení kvality syntézy resp. oligonukleotidů, třetí část se pak zabývá třemi druhy validacemi procesu syntézy konkrétně instalační, provozní a výkonnostní kvalifikace.

Experimentální část práce se zaměřila na validaci metody syntézy dlouhých oligonukleotidů ve scale 200 nmol na syntetizéru K&A H-8-SE od výrobce K&A labs a to pro tři výrobce pevné fáze (GlenResearch, LGC, SigmaAldrich-Merck). Pro každého z nich bylo syntetizováno osm sekvencí v délce 60, 62, 67, 70, 74, 77, 79 a 82 meru ve čtyřech opakováních, celkem tedy 96 vzorků (32 pro každého výrobce) na variabilních pozicích syntetizéru, přičemž každá syntéza byla analyzována pomocí UV-vis spektrofotometrie, HPLC a MALDI-TOF MS.

Validace zahrnovala hodnocení kritérií parametrů výtěžek syntézy (>50 % deklarovaného scale), čistoty syntézy (AUC >50 %) a přesnosti molekulové hmotnosti daného oligonukleotidu (odchylka  $\pm 50$  Da vypočtené MW). Dále byl sledován monitorovací parametr syntézy TRM (tritylmonitor, propad hodnot o více než 50 %). Úspěšnost validace byla vázána na splnění všech kritérií u minimálně 66 % vzorků od každého výrobce.

Získaná experimentální data byla podrobena statistickému zpracování v softwaru ANOVA. Dva výrobce se podařilo validovat v plném rozsahu délky (GlenResearch, LGC), výrobce SigmaAldrich-Merck se podařilo validovat pouze u sekvencí do délky sekvence 74 bází.

V této práci bylo provedeno zpracování velkého množství vzorků a autorka se musela naučit velké množství sofistikovaných laboratorních technik (příprava syntéz na stroji, deprotektace, stanovení výtěžků a určení totožnosti). Autorka takto získala a zpracovala velké množství dat, které bylo podkladem pro rozsáhlé a robustní statistické vyhodnocení. Dosažená data a závěry jsou přehledně prezentovány vysokým počtem tabulek a grafů. Výsledky jsou interpretovány v diskuzi, která rozebírá význam jednotlivých parametrů a jejich korelace. Práce správně upozorňuje na limity jednotlivých analytických parametrů a nutnost jejich kombinovaného použití k dosažení žádoucích informací.

Práce má významný aplikační přínos, neboť systematicky porovnává tři běžně používané pevné fáze a poskytuje konkrétní doporučení pro syntézu oligonukleotidů ve výrobní praxi. Výsledky mají potenciál přispět k optimalizaci výrobních procesů a zvýšení kvality produktů v oblasti syntézy oligonukleotidů.

Práce je přehledně členěna a obsahuje všechny povinné části. Tabulky a grafy jsou správně očíslovány a opatřeny popisky. Text je psán spisovně s minimem překlepů, ovšem čtivost a srozumitelnost práce trpí nepřesností v používané terminologii jako např. „výtěžek tritylu, spojování ve smyslu vzniku chemické vazby a další) a velkým počtem stylistických chyb. Úvodní odstavce často zmiňují konkrétní detaily, které jsou v kontextu práce nevýznamné. Naopak základní definice pojmů jsou často vynechány nebo uvedeny chybně. Obecné informace se velmi často opakují v kruhu buď v rámci jedné kapitoly (např. 1.2.2, , v rámci jednoho odstavce (str. 40 ods.1), či dokonce i jedné věty (str. 34, odst. 3, 1. věta).

Z celkového počtu 73 citací je celá polovina (38) odkazem na neindexované, firemní, populárně-naučné webové stránky, ze kterých jsou citovány rozsáhlé odstavce například na str. 19-23 a 30-32. To zapříčiňuje, že text vyznívá neodborně až marketingově. Často se zde mění čas i osoba oslovení a budí tak dojem doslovného překladu daných stránek. (Jen webové stránky firmy Merck jsou v práci citovány 6x). Dále nebylo zachováno postupné číslování zdrojů, neboť už na první straně teoretické části je po zdroji 1 a 2 citován zdroj 34. V dalším odstavci následují zdroje 35-39 a poté navazuje 7,4 a 6. Dohledání použití všech zdrojů je tedy extrémně nepřehledné a to i z důvodu absence jakéhokoliv jednotného citačního stylu.

Diskuze výsledků je povětšinou jednoduchým popisem získaných grafů, diskutovány jsou výsledky s literaturou jen sporadicky to přesně jednou na str. 55. Často není zřejmé, jak autorka dané závěry z grafů vyvodila (např. „Dále bylo prokázáno, že pozice vzorku na syntetizátoru nemá vliv na AUC ani na ostatní klíčové parametry (Graf 13).“ Hodnoty a termíny ze statistického zpracování ANOVA z Tabulek 5, 7 a 9 nejsou v práci dále zmiňovány ani komentovány a vlastně nejsou.

Níže uvádím některé další komentáře a dotazy:

- V anglické variantě anotace chybí údaj o délce syntetizovaných oligonukleotidů.
- Teorie se do zbytečných podrobností a často nepřesně zabývá organickou syntézou a naopak zcela pomíjí základy statistiky, které slouží jako hlavní nástroj vyhodnocení dat, a které by čtenáři pomohli orientovat se blíže.

- Často se v práci vyskytuje formulace „validace syntézy místo validace metody syntézy, vytvoření nových sekvencí místo přípravy neb syntézy“.
  - V textu často chybí odkazy na obrázky.
  - Jedním z hlavních cílů práce je „porovnání třech výrobců pevné fáze“, v práci ovšem chybí jejich výčet a charakterizace. První zmínka o konkrétním výrobcí je uvedena až na straně 52 v kapitole 2.3 Výsledky a to neformální formulací „pevná fáze Glen“ (v práci použito 21x) místo vhodnější „pevná fáze výrobce Glen“. Navíc pojmenování výrobců Glen a Sigma je velmi nepřesné, protože neobsahují ani celý název společností.
  - V Tabulce 2 je navíc uvedena formulace „AMA v roztoku“, která s tabulkou zdánlivě nesouvisí a je asi nechtěným pozůstatkem. Navíc je ve stejné tabulce část „zaměřit se na preciznost, robustnost a opakovatelnost“, ovšem žádný z těchto parametrů není v práci dále komentován.
  - V Tabulce 3 zavádíte ID sekvence, která je totožná s délkou sekvence. V Tabulce 6, 8 pak již operujete s Kódem sekvence, přičemž není jasné, které kódy patří ke kterým ID sekvencí. To odhaluje až v přílohách Tabulka 10, ovšem řazení podle interního kódu mi přijde velmi nešťastné a čtenáři znesnadňuje orientaci v datech. Řazení podle délky a výrobce pevné fáze by bylo přehlednější.
  - Na str. 38 během popisu postupu syntézy na syntetizéru najednou zavádíte oproti cílům kromě TRM další dvě veličiny TRM total a V2, proč? Jsou tyto parametry běžně při syntéze používány?
  - Nesouhlasím s tvrzením na str. 53, že čistota vzorku (AUC,%) závisí na výtěžku.
1. V práci opakovaně uvádíte jednotku bp jako jednotku délky oligonukleotidu, je tato jednotka skutečně pro tyto účely vhodná? Jak je to s jejím použitím pro ssDNA a dsDNA?
  2. V teoretické i praktické části práce velmi často používáte formulaci „účinnost syntézy“ můžete prosím vysvětlit, co tímto termínem myslíte?
  3. Vysvětlíte prosím, co myslíte tvrzením na str. 36 „...Dále jsou vypočítané hodnoty obsahu bazí GC. Tato hodnota udává chemickou stabilitu oligonukleotidů a může sloužit i k porovnávání kvality syntéz.“
  4. Na str. 37 píšete, že byla vypočtena navážka pro každou bázi a uvádíte zde vzorec výpočtu. Opravte prosím chybu v tvrzení a vysvětlíte co znamená pojem loading baze, navíc prosím vysvětlíte, proč byl výpočet násoben koeficientem 1,32.
  5. V Tabulce 4 *Seznam použitých chemikálií* i v celé diplomové práci dále postrádám jakýkoliv detailnější popis či charakterizaci použitých pevných fází. Mohla byste toto pro úplnost doplnit?
  6. Z formulace „Na tento krok práce dohlížel odborný konzultant...“ v kapitole 2.2.4.2 HPLC není jasné, které kroky provedla autorka a které kroky provedl za autorku konzultant, popřípadě v další kapitole 2.2.5 školitel. Mohla byste pro přehlednost vysvětlit, jaké kroky z praktické části byly výsledky Vaší činnosti, jaké metodiky, jste se naučila a které činnosti byly výsledkem práce Vašich vedoucích?
  7. Jaký typ detekce má sestava HPLC použitá v praktické části?
  8. V kapitole 2.2.4.3 vyplývá, že jste pro stanovení výtěžku používali dva spektrofotometry. Proč a jaké údaje byly použity pro výpočty?
  9. V teorii se zabýváte vysvětlením pojmů validace IQ/OQ/PQ, jakou část pokrývá praktická část Vaší práce?

10. V druhém odstavci kapitoly 2.4.3 HPLC diskutujete korelaci mezi parametry AUC a TRM, která u každého z výrobců pevných fází vychází jinak silná. Už ale neuvádíte, proč by tomu tak mohlo být. Můžete tento jev dovysvětlit?
11. Velmi často v diskuzi polemizujete nad „souladem“ daných sekvencí s danou pevnou fází (např. v druhém odstavci na str. 54 nebo v posledním odstavci na tytéž straně), jak toto lze chápat ve chvíli, kdy dle Tabulky 3 mají všechny sekvence stejný základ 60 bazí?

Přes všechny výtky práce splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci v oboru bioanalytické laboratorní diagnostiky.

**Přes všechny zmíněné výtky práce splňuje požadavky na tento typ prací kladené, a proto doporučuji ji k obhajobě. Navrhuji hodnocení E, Dobře.**

**V Hradci králové dne 26. 5. 2025**

**Mgr. Michaela Beranová, Ph.D.**