

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### OPRACOWANIE METOD PRZYGOTOWANIA PRÓBEK OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSSENSOWNYCH Z WYKORZYSTANIEM KLASYCZNYCH I NOWEGO TYPU ADSORBENTÓW

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano metody przygotowania próbek oligonukleotydów antysensownych z wykorzystaniem klasycznych i nowego typu adsorbentów.

W badaniach zastosowano wybrane, komercyjnie dostępne kolumnienki do ekstrakcji do fazy stałej z adsorbentami polimerowymi i na bazie krzemionki. W przypadku materiałów niepolarnych ekstrakcja była możliwa poprzez zastosowanie trybu par jonowych. Na wartości odzysku miało wpływ kilka czynników, przede wszystkim rodzaj zastosowanego odczynnika do tworzenia par jonowych i zawartość procentowa metanolu w roztworze stosowanym do elucji. Z kolei ekstrakcja z użyciem niemodyfikowanej krzemionki była możliwa w trybie oddziaływań hydrofilowych. W nim kluczowym okazała się zawartość procentowa rozpuszczalnika organicznego na etapie kondycjonowania, nanoszenia próbki i przemywania złoża.

Nowym podejściem do przygotowania próbek oligonukleotydów antysensownych było zastosowanie mikroekstrakcji do sorbentu w igle. Pozwoliła ona na skuteczne oczyszczenie próbek, jednocześnie zapewniając wysoki odzysk analitu, dobrą powtarzalność, zmniejszenie objętości próbki i skrócenie czas procedury. Ponadto, zsyntezowano nowe adsorbenty do ekstrakcji dyspersyjnej na bazie usieciowanych poli(cieczy jonowych) oraz pokrytych nimi nanocząstek magnetycznych. Materiały scharakteryzowano z uwzględnieniem różnych technik. Adsorpcja oligonukleotydów była możliwa w niskim pH. Do elucji zastosowano roztwór soli organicznej (o niskim stężeniu, wysokim pH) z dodatkiem metanolu. Dużą zaletą nowych materiałów wobec tych komercyjnie dostępnych jest brak konieczności usuwania białek z próbek osocza przy jednoczesnym zachowaniu wysokich wartości odzysku i powtarzalności.

Opracowane procedury z powodzeniem zastosowano do ekstrakcji oligonukleotydów z różnymi typami modyfikacji chemicznej z wzbogaconego osocza ludzkiego. Wyniki niniejszych badań są nowe w kontekście rozwoju metod przygotowania próbek stosowanych w badaniach oligonukleotydów antysensownych mających ogromny potencjał terapeutyczny.

29.06.2021

*Nuckowski*

## SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

### DEVELOPMENT OF METHODS OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES SAMPLES PREPARATION USING CLASSIC AND NEW TYPES OF ADSORBENTS

Methods for preparing antisense oligonucleotides samples using classical and novel types of adsorbents were developed in this dissertation.

Selected commercially available solid-phase extraction cartridges with polymeric and silica-based adsorbents were used. For non-polar materials, extraction was possible by using the ion pair mode. Several factors influenced the recovery values, primarily the type of ion pair reagent and the percentage of methanol in the elution solvent. In contrast, extraction with unmodified silica was possible in the hydrophilic interaction mode. The percentage of organic solvent at the conditioning, sample application, and washing stages was crucial in this case.

The use of microextraction by packed sorbent was a new approach to the sample preparation of antisense oligonucleotides. It allowed for efficient purification of the sample, high analyte recovery, good reproducibility, reduced sample volume, and reduced procedure time. Furthermore, new adsorbents based on cross-linked poly(ionic liquids) and magnetic nanoparticles coated with these polymers for dispersive extraction were synthesized. The materials were characterized with different techniques. Adsorption of oligonucleotides was possible at low pH. A solution of organic salt (at low concentration and high pH) with the addition of methanol was used for elution. A significant advantage of the new materials over those commercially available is that there is no need to remove proteins from serum samples while maintaining high recovery and repeatability values.

The developed procedures were successfully applied for the extraction of oligonucleotides with different types of chemical modification from enriched human plasma. The presented study results are novel in the context of the development of sample preparation methods used in the study of antisense oligonucleotides having great therapeutic potential.

29.06.2021

*L. Nuckowski*