



42. Krkine nagrade

ZNANOST POVEZUJE.

42. Krkine nagrade | 42nd Krka Prizes

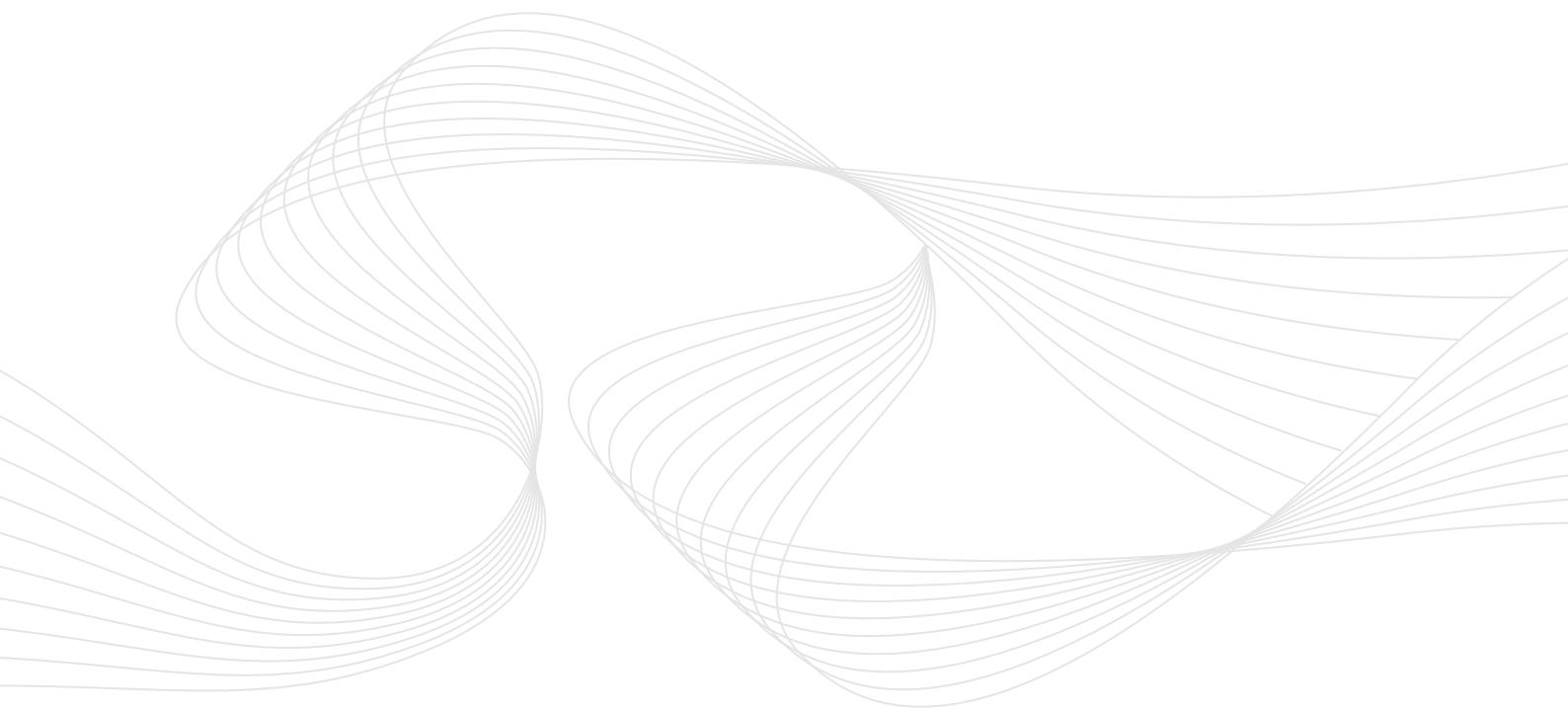
22. simpozij

Zbornik povzetkov



22. simpozij

Zbornik povzetkov



Novo mesto, 19. oktober 2012



**Častni odbor
42. Krkinih nagrad**

Jože Colarič, predsednik uprave in generalni direktor Krke akad. prof. dr. **Jože Trontelj**, predsednik Slovenske akademije znanosti in umetnosti
prof. dr. **Radovan Stanislav Pejovnik**, rektor Univerze v Ljubljani
prof. dr. **Danijel Rebolj**, rektor Univerze v Mariboru
dr. **Gašper Marc**, predsednik Slovenskega farmacevtskega društva
prof. dr. **Venčeslav Kaučič**, predsednik Slovenskega kemijskega društva
prof. dr. **Pavel Poredoš**, predsednik Slovenskega zdravniškega društva

**Svet Sklada
Krkinih nagrad**

dr. **Aleš Rotar**, predsednik
prof. dr. **Mihail Japelj**, častni predsednik

Znanstveni odbor

prof. dr. **Franc Vrečer**, predsednik
doc. dr. **Aleš Gasparič**
Dušanka Oblak Božič
doc. dr. **Vida Škrabanja**
dr. **Silvo Zupančič**

Organizacijski odbor

Elvira Medved, predsednica
Simona Kastelic
mag. **Simona Torkar Flajnik**
dr. **Jernej Zadnik**
dr. **Miha Plevnik**

**Glavni in odgovorni
urednik**

dr. **Miha Plevnik**

Recenzenti

Breda Barbič Žagar, mag. Sonja Benčina Crnić, mag. Neda Benički Svagelj, mag. Marko Boh, dr. Žiga Bolta, dr. Sergeja Bombek, mag. Mari Božič, Polona Bukovec, dr. Nina Cimerman, dr. Aleš Curk, mag. Lea Cvitkovič Maričič, dr. Irena Čarman, mag. Lidia Černoša, Katja Čerpnjak, dr. Boris Dular, mag. Tina Dular Meglič, Maja Ferbezar, mag. Andrej Ferlan, Tamara Feuš, mag. Mihael Florjanič, doc. dr. Aleš Gasparič, mag. Mojca Golob, Grega Hudovornik, dr. Aleš Hvala, mag. Miran Hvalec, dr. Špelca Jenko, mag. Alenka Jerman, dr. Jernej Kužner, mag. Brane Kastelec, dr. Jože Kastelic, Milena Kastelic, Ksenija Kikelj, Alen Kljajič, Andrej Klobčar, Alenka Kmecl, mag. Aleš Knoll, dr. Saša Kolarič, mag. Suzana Kolenc, mag. Helena Kotnik, dr. David Kralj, mag. Andrejka Kramar, mag. Alenka Kramarič, dr. Vesna Krošelj, dr. Brigita Lapornik, Nataša Lebar, dr. Roman Lenaršič, dr. Alenka Leskovar, mag. Bronja Manček, dr. Tatjana Mateovič Rojnik, dr. Marija Meleh, mag. Mateja Merslavič, Berta Mešnjak, Klavdija Mežnar, dr. Špela Miklič, Mirjam Milharčič Simčič, dr. Anita Mlakar, Maja Oblak, Uroš Ocepek, dr. Renata Osolnik, mag. Vesna Pahor, dr. Matej Pavli, Darja Pavlin, dr. Anica Pečavar, Mitja Pelko, dr. Andreja Plaper, mag. Igor Plaper, Gregor Pleterski, Miha Plevnik, mag. Marjeta Poznič Planinc, Maja Preškar, mag. Ivan Radež, Roman Radež, dr. Nataša Rebolj, Vojko Rebolj, dr. Tadej Recelj, mag. Gregor Redek, dr. Aleš Rotar, Miloš Ružič, Robert Sekeres, dr. Zvone Simončič, dr. Igor Simonič, Gordan Sladič, Janika Slanc Yovk, dr. Janez Šmodiš, dr. Matej Smrkolj, Matej Stergar, mag. Nada Šavor, dr. Leon Ščuka, doc. dr. Vida Škrabanja, Marko Štefanič, dr. Anton Štimac, dr. Jaroslav Tihi, mag. Simona Torkar Flajnik, dr. Katja Trontelj, mag. Robert Ucman, mag. Aleš Urbančič, mag. Anamarija Vajs, dr. Tomaž Vaupotič, dr. Sintija Verstovšek, Tanja Vnučec Popov, dr. Miha Vrbinc, prof. dr. Franc Vrečer, dr. Mateja Vrečer, dr. Jernej Zadnik, dr. Natalija Zajc Škrbina, dr. Silvo Zupančič, Slavko Zupančič, dr. Rok Zupet

VSEBINA | CONTENT

42. KRKINE NAGRADE

- 8 | Aleš Rotar, predsednik Svetega Sklada Krkinih nagrad
- 10 | Krkini nagrajenci 2012

22. SIMPOZIJ | ZBORNIK POVZETKOV

- 14 | Franc Vrečer, predsednik Znanstvenega odbora

KRKINE NAGRADE ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | PREDSTAVITEV NAGRAJENCEV

- 19 | Jernej Baškovč, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Uporaba kombinatorne sinteze v pripravi mono- in bicikličnih heterocikličnih sistemov
- 25 | Sabina Devjak Novak, Krka, d. d., Novo mesto
Proučevanje nekaterih s funkcionalnostjo povezanih lastnosti hipromeloze kot tvorilca ogrodnih tablet
- 31 | Borut Kovačič, Krka, d. d., Novo mesto
Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov
- 37 | Matjaž Ravnikar, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj rekombinantnih mlečnokislinskih probiotikov in interakcije probiotičnih mlečnokislinskih bakterij z zdravilnimi učinkovinami
- 43 | David Šarlah, Scrippsov raziskovalni inštitut, La Jolla, Kalifornija
Totalna sinteza in biološko vrednotenje antiinfekcijskih naravnih spojin iz družine bijojanaginov in hirsutelonov

42. KRKINE NAGRADE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | POVZETKI

- 51 | **Biserka Bakrač**, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Specifična vezava ekvinatoksina II, citolitičnega proteina iz morske vetrnice *Actinia equina*, na sfingomielin
- 52 | **Blaz Brulc**, Kemijski inštitut Ljubljana
Sinteza blokkopolimerov različnih arhitektur na osnovi asparaginske kisline in laktida
- 53 | **Matjaž Brvar**, Kemijski inštitut Ljubljana
Strukturno podprtvo načrtovanje novih zaviralcev DNA-giraze B
- 54 | **Biljana Govendarica**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo
- 55 | **Miloš Ilić**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Strukturalna optimizacija novih antitrombotičnih učinkovin z dvojnim delovanjem in njihov vpliv na angiogenezo
- 56 | **Matevž Luštrik**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Razvoj metod in vrednotenje lokalnih karakteristik toka trdnih delcev v vrtinčnoslojnih napravah za oblaganje ter njihov vpliv na enakomernost oblage delcev
- 57 | **Vita Majce**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje diazenov ter njihovih analogov kot možnih inhibitorjev nekaterih encimov
- 58 | **Damjan Makuc**, Kemijski inštitut Ljubljana
NMR-študije konformacij in interakcij funkcionaliziranih indolov kot anionskih receptorjev
- 59 | **Nenad Maraš**, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Reakcije fenolov s tetraalkilamonijevimi solmi in sinteza 3-acetamido- β -rezorcinskih kislin s prilagojeno Kolbe-Schmittovo reakcijo
- 60 | **Miha Možina**, Sensum, d. o. o.
Kontrola kakovosti trdih farmacevtskih izdelkov s strojnim vidom
- 61 | **Sara Prijič**, Nanotesla institut
Uporaba superparamagnetnih nanodelcev za magnetofekcijo reporterskih in terapevtskih genov v celice, mišice in eksperimentalne tumorje miši
- 62 | **Veronika Škedelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Načrtovanje, sinteza in vrednotenje inhibitorjev D-aspartat ligaze in D-alanil-D-alanin ligaze

- 63 | **Lidija Urbas**, *BIA Separations, d. o. o.*
Razvoj monolitnih kolon in metod za odstranjevanje proteinov iz bioloških vzorcev in določevanje virusnih delcev
- 64 | **Janja Medved**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Razvoj avtomatizirane metode za določevanje olmesartana v humani plazmi
- 65 | **Bojana Črček**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Kombinatorna sinteza 4-(1-fenil-5-oksopirolidin-3-il)pirimidin-5-karboksamidov
- 66 | **Tadej Dolenc**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Vpliv pufrskih sistemov na topnost izbranih soli naproksena in ciprofloksacina pri konstantnem pH
- 67 | **Aleša Dular**, *Krka, d. d., Novo mesto*
Vpliv pogojev kristalizacije na izbrane lastnosti delcev modelne zdravilne učinkovine
- 68 | **Maja Marušič**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
NMR-struktura G-kvadrupleksa iz genoma človeškega papilomskega virusa
- 69 | **Marko Mihelič**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Izdelava laboratorijskega modela za testiranje aktivnosti ketoreduktaz pri njihovi večkratni uporabi v procesih biokatalize
- 70 | **Nina Pekolj**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Določanje strupenosti in razgradljivosti hidrofobnih ionskih tekočin
- 71 | **Aleš Pršina**, *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*
Izdelava tablet s stiskanjem hidroksipropilcelulozne obloge za dosego dvopulznega sproščanja zdravilne učinkovine
- 72 | **Tjaša Saje**, *Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*
Oblikovanje embalaže po meri vseh uporabnikov
- 73 | **Ana Testen**, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani*
Sinteza novih pirazolo[1,2-*a*]pirazolonskih peptidomimetikov
- 74 | **Jernej Turnšek**, *Kemijski inštitut Ljubljana*
Sinteze nobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov
- 75 | **Jasna Zadnik**, *Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani*
Matematični modeli in algoritmi pri zvijanju proteinov

- 76 | **Matej Burkat, Simona Gričar, Katja Kelvišar**, Gimnazija Novo mesto
Akne – odpravljanje oziroma preprečevanje težav, značilnih za mladostniško kožo
- 77 | **Sara Kokolj**, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola
Protimikrobnlo delovanje različnih vrst medu na ustno mikrofloro
- 78 | **Tadej Pečar, David Pekolj**, Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in
tehniška gimnazija
Problematika odpadnih zdravil in njihovo varno uničenje
- 79 | **Saša Počivalšek, Dejan Slapšak**, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo,
elektrotehniko in računalništvo
Vpliv izbire topila in pogojev ekstrakcije na izkoristek ekstrakcije kofeina iz
črnega čaja oziroma kave
- 80 | **Jernej Zorman**, II. gimnazija Maribor
Merjenje antioksidativnega potenciala *in vitro* z Briggs-Rauscherjevo reakcijo
- 82 | **Kazalo avtorjev**
- 83 | **Kazalo mentorjev in somentorjev**



Znanje, tehnologije, metode in nova zdravila so gibalo razvoja farmacevtske industrije. So plod multidisciplinarnega razvojnega dela, temelječega na mnogih predhodnih korakih. Raziskovanje in razvoj nista sami sebi namenjeni dejavnosti, ampak sta nerazdružljiva dvojčka, ki se dopolnjujeta in odpirata vedno nove možnosti. Prav tako se dopolnjujejo mladostna energija in pronicljivost ter izkušnje in razgledanost. Krka je zavezana razvoju novih zdravil, zato se bomo še naprej trudili najti hitre in učinkovite poti do inovativnih tehnologij in zdravil. Del naše razvojne strategije je tudi povezovanje različnih generacij raziskovalcev. Krkine nagrade bodo še naprej pomemben most med strokovnjaki, ki raziskujemo in razvijamo nova zdravila, s katerimi se bodo v prihodnosti še učinkoviteje zdravili bolniki po vsem svetu.

Dr. Aleš Rotar
predsednik Sveta Sklada Krkinih nagrad

New products, technologies, methods and knowledge are crucial for the development of the pharmaceutical industry. They are the result of multidisciplinary development work based on many steps previously made. Research and development are not an end in themselves, they are inseparable twins, amending each other and opening up new opportunities. Youthful energy and inventiveness as well as experience and open-mindedness complement each other as well. Krka is committed to developing new products; therefore, we will continue to find fast and efficient paths to innovative technologies and products. Cooperation between generations of researchers is part of our development strategy, with Krka Prizes remaining an important bridge between all of us who engage in research and development so that our medicines, a result of knowledge and work of many experts, will continue to treat many patients around the globe in the future.

Dr Aleš Rotar
President of the Krka Prizes Fund Council

KRKINI NAGRAJENCI 2012 | KRKA PRIZE WINNERS 2012

KRKINE NAGRADOV ZA POSEBNE DOSEŽKE NA PODROČJU RAZISKOVALNEGA DELA | NAGRAJENCI

Nominalna nagrada	Nominalni mentor	Številka
Jernej Baškovč <i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Branko Stanovnik	2374
Sabina Devjak Novak <i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Saša Baumgartner Franc Vrečer	2375
Borut Kovačič <i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Odon Planinšek Franc Vrečer	2376
Matjaž Ravnikar <i>doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Borut Štrukelj Mojca Lunder	2377
David Šarlah <i>doktor znanosti s področja kemije</i>	K. C. Nicolaou	2378

KRKINE NAGRADOV ZA RAZISKOVALNO NALOGO | NAGRAJENCI

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Biserka Bakrač	<i>doktorica znanosti s področja biokemije in molekularne biologije</i>	Gregor Anderluh	2379
Blaž Brulc	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Majda Žigon	2380
Matjaž Brvar	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Tomaž Šolmajer Andrej Perdih	2381
Biljana Govendarica	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Stane Srčič Miha Škarabot	2382

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Miloš Ilić	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Danijel Kikelj Janez Ilaš	2383
Matevž Luštrik	<i>doktor znanosti s področja farmacije</i>	Stane Srčič	2384
Vita Majce	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Slovenko Polanc Stanislav Gobec	2385
Damjan Makuc	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Janez Plavec	2386
Nenad Maraš	<i>doktor znanosti s področja kemije</i>	Marijan Kočevar	2387
Miha Možina	<i>doktor znanosti s področja elektrotehnike</i>	Dejan Tomaževič	2388
Sara Prijič	<i>doktorica znanosti s področja medicinskih ved</i>	Gregor Serša	2389
Veronika Škedelj	<i>doktorica znanosti s področja farmacije</i>	Anamarija Zega	2390
Lidija Urbas	<i>doktorica znanosti s področja kemije</i>	Aleš Štrancar Boris Pihlar	2391
Janja Medved	<i>magistra kemije</i>	Helena Prosen Lea Cvitkovič Maričič	2392
Bojana Črček	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Jurij Svetec	2393
Tadej Dolenc	<i>magister farmacije</i>	Franc Vrečer Darko Uršič	2394
Aleša Dular	<i>magistra farmacije</i>	Franc Vrečer Polona Bukovec	2395

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Maja Marušič	<i>univerzitetna diplomirana biokemičarka</i>	Janez Plavec	2396
Marko Mihelič	<i>univerzitetni diplomirani biokemik</i>	Aleksander Pavko Aleš Gasparič	2397
Nina Pekolj	<i>univerzitetna diplomirana biokemičarka</i>	Andreja Žgajnar Gotvajn	2398
Aleš Pršina	<i>magister farmacije</i>	Odon Planinšek	2399
Tjaša Saje	<i>diplomantka grafičnih komunikacij</i>	Boštjan Botas Kenda Domen Fras	2400
Ana Testen	<i>univerzitetna diplomirana kemičarka</i>	Jurij Svete	2401
Jernej Turnšek	<i>univerzitetni diplomirani biotehnolog</i>	Gregor Anderluh Roman Jerala	2402
Jasna Zadnik	<i>univerzitetna diplomirana matematičarka</i>	Tomaž Košir	2403

Nagrajenec	Status	Mentor, somentor	Številka
Matej Burkat	<i>dijak</i>	Branka Klemenčič	2404
Simona Grčar	<i>dijakinja</i>	Maja Gabrič Zirkelbach	2405
Katja Kelvišar	<i>dijakinja</i>	Petra Vovko	2406
Sara Kokolj	<i>dijakinja</i>	Irena Štrumbelj Drusany	2407
Tadej Pečar	<i>dijak</i>	Dragica Budić Banović	2408
David Pekolj	<i>dijak</i>		2409
Saša Počivalšek	<i>dijakinja</i>	Mojca Drofenik Čerček	2410
Dejan Slapšak	<i>dijak</i>		2411
Jernej Zorman	<i>dijak</i>	Sanja Cvar	2412



Teorija je, ko se vse ve, a nič ne funkcionira, praksa je, ko vse deluje, a nihče ne ve, zakaj.

Albert Einstein

Ena temeljnih idej Krkinih nagrad je povezati teorijo s prakso in na ta način doseči, da bo rešitev izizza funkcionalna in bo temeljila na znanstvenem razumevanju tako izizza kot njegove rešitve. Ta ideja se zrcali tudi v dvojnosti kriterija izbora najboljših nalog – znanstveni odličnosti in industrijski uporabnosti.

Med nagrajene naloge, ki so prispele na razpis za 42. Krkine nagrade, so se uvrstile tiste, ki so v največji meri izpolnjevale oba kriterija. Izbrali smo jih izmed več kot devetdesetih nalog z zelo različnih znanstveno-strokovnih področij in z vseh izobraževalnih stopenj od srednje šole do doktorskega študija. Še posebej veselijo primeri, ko mladi raziskovalci in njihovi mentorji združijo znanstveno odličnost in realne izzive z željo po inventivnosti ter zavedanjem o pomenu njene zaštite.

V Znanstvenem odboru Sveta Sklada Krkinih nagrad si želimo, da bi delež prijavljenih nalog, ki bodo z znanstveno odličnostjo reševale konkretnne strokovne oziroma še bolje industrijske izzive generične farmacevtske industrije, rastel tudi v prihodnje. Mladi raziskovalci bodo z na ta način zastavljenim raziskovalnim delom pridobili novo znanje in izkušnje, ki jim bodo koristile pri njihovi vključitvi v delo v industriji.

V imenu Znanstvenega odbora Sveta sklada Krkinih nagrad in v svojem imenu se vsem avtorjem nalog zahvaljujem za prijavo in jim hkrati čestitam za opravljeno raziskovalno delo, ki je potrditev njihovih raziskovalnih sposobnosti.

Posebna zahvala gre vsem mentorjem in somentorjem, ki so mlade raziskovalce usmerjali na poti po neznanih in neshojenih poteh raziskovanja in znanosti. Tudi letošnji izbor ne bi bil mogoč brez številnih strokovnjakov iz Krke, ki so naloge pregledali in ocenili ter s tem Znanstvenemu odboru omogočili ustrezni izbor najboljših nalog, za kar se jim zahvaljujemo.

Iskreno čestitamo vsem prejemnikom Krkinih nagrad in priznanj. Želimo jim, da bi bila to dodatna vzpodbuda za vztrajanje pri raziskovalnem delu ter prelivjanju teoretičnih izsledkov v industrijske izdelke in storitve, kar bo dolgoročno prineslo pozitivne učinke tudi na gospodarsko rast Slovenije.

Prof. dr. Franc Vrečer, mag. farm.
predsednik Znanstvenega odbora Sveta sklada Krkinih nagrad

Theory is when you know everything but nothing works. Practice is when everything works and no one knows why.

Albert Einstein

One of the fundamental ideas of Krka Prizes is to integrate theory with practice, thus arriving at a functional solution to the challenge based on a scientific understanding of both the challenge and its solution. This idea is reflected in the two criteria for selecting the best prizes – scientific excellence and industrial applicability.

The awarded assignments submitted for the 42nd Krka Prizes competition largely fulfil both criteria. More than ninety assignments were selected from diverse scientific fields and from all levels of education – from secondary school to the doctoral level. We particularly appreciate the assignments in which young researchers and their mentors combine scientific excellence and realistic challenges striving for innovation and the understanding that innovation needs to be protected.

The Scientific Committee of the Krka Prizes Council would like to see the share of the submitted assignments resolving specific expert, or even industrial, challenges of the generic pharmaceutical industry with scientific excellence to increase also in the future. During their research work, young researchers will acquire new knowledge and experience which will prove useful when they enter the industry.

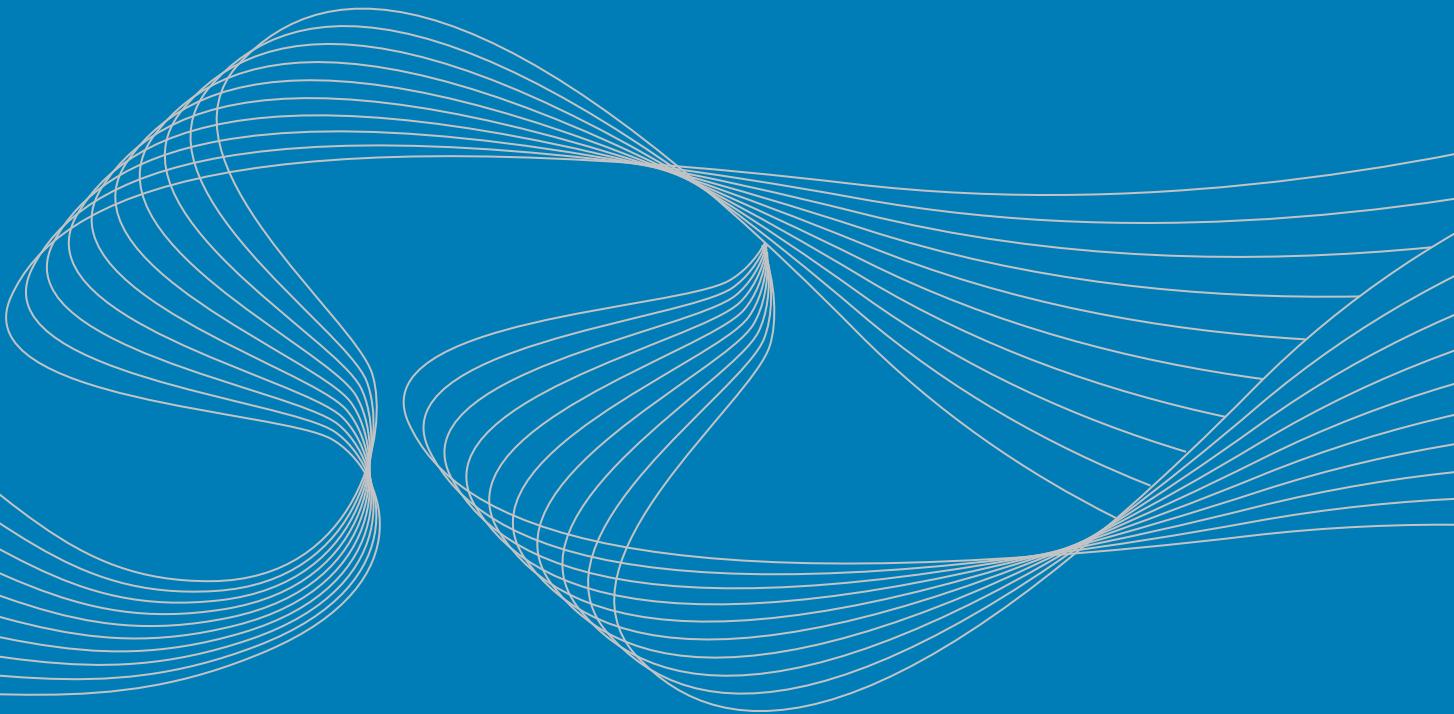
On behalf of the Scientific Committee of the Krka Prizes Council and on my own behalf, I would like to thank all the authors of assignments for submitting their applications and congratulate them for their research work, which stands as proof of their research capabilities.

Sincere gratitude should also be expressed to the mentors and co-mentors who have guided young researchers towards the unknown and less trodden paths of research and science. This year's selection would not be possible without numerous experts at Krka who reviewed and assessed the assignments, thus facilitating the Scientific Committee's work in selecting the best assignments, which we appreciate greatly.

We would like to warmly congratulate all the recipients of Krka Prizes. We hope that these prizes will provide further incentive to continue their research work and transform theoretic results into industrial products and services, which will have long-term positive effects also on the growth of the Slovenian economy.

Prof Dr Franc Vrečer, MSc Pharm
President of the Scientific Committee Krka Prizes Fund Council

42.



Krkine nagrade za posebne dosežke na področju raziskovalnega dela
Krka Prizes for Special Achievements in Research

Predstavitev nagrajencev
Prize Winners

Dr. JERNEJ BAŠKOVČ



»Kemija me je zanimala, odkar vem zase,« pravi dr. Jernej Baškovč, ki se je po končani srednji šoli vpisal na Fakulteto za kemijo in kemijsko tehnologijo in kasneje postal mladi raziskovalec, potem pa se je lotil še magistrskega študija na Ekonomski fakulteti, ki ga bo tudi kmalu končal. Na podiplomskem študiju se je ukvarjal predvsem z organsko kemijo, spoznal heterociklično kemijo in paralelno sintezo, oboje pa je kasneje združil v kombinatorno kemijo, pri kateri je treba delati z veliko množico spojin hkrati.

V nagrajeni raziskovalni nalogi se je Brežičan ukvarjal z uporabo kombinatorne sinteze v pripravi mono- in bicikličnih heterocikličnih sistemov. Načela njegovega raziskovalnega dela so predvsem združevanje kakovosti, raziskovanja in avtomatizacije. Tako pride do hitrejšega odkrivanja novih učinkovin, kljub temu da avtomatizacija večkrat podaljša preizkušanje postopkov, saj je treba delati z velikim številom spojin. Vendar dodaja, da je kasneje veliko lažje prenesti te postopke na večje količine kemikalij, saj kombinatorna kemija uporablja le industrijske postopke in pristope. »Vsako raziskovanje je bilo opravljeno na potencialno bioloških učinkovinah, ki se ponekod pojavljajo kot pesticidi, nekatere tudi pri zdravljenju srčnih bolezni. Večina mojega dela je bila opravljena tudi v sodelovanju s farmacevtsko industrijo, saj so rezultati, ki nastanejo s takšnim načinom dela, presenetljivo dobri.«

Krkin štipendist in dvakratni Krkin nagrajenec je počaščen, da spada v skupino Krkinih nagrjencev. Nagrada je priznanje, da dobro dela, predvsem pa si želi, da bi prihodnje generacije nadgradile obstoječe znanje. Poudarja, da si morajo raziskovalci vedno znova postavljati vprašanje, kaj novega je treba še odkriti. »Uspešen raziskovalec naj bi bil nekdo, ki si upa pogledati tja, kamor si še nihče ni upal. Mora biti optimističen, saj stvari običajno ne potekajo tako, kot si je človek zamislil. Če si pri svojem delu uspešen, dobiš na koncu zelo otipljive rezultate, saj te tudi neuspeli poskusi vodijo v pravo smer,« dodaja.

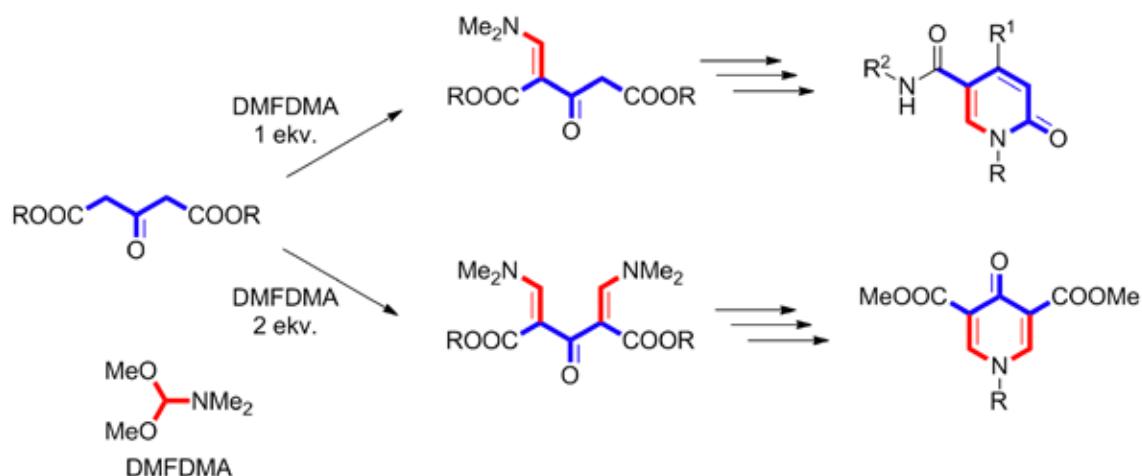
Uporaba kombinatorne sinteze v pripravi mono- in bicikličnih heterocikličnih sistemov

JERNEJ BAŠKOVČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Branko Stanovnik, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Sintezna organska kemija je bolj kot znanost umetnost, ker se večinoma dogaja v koncentriranih raztopinah, najbolj uporabljenih sistemih v kemiji, v zvezi z njimi pa je še zmeraj veliko neznank. Vsa dognanja sintezne kemije temeljijo na eksperimentalnih izkušnjah, zato je zelo pomembno, kako se lotimo eksperimentiranja. Kombinatorna sinteza je eden od novejših načinov izvedbe sintezne kemije, ki naj bi naredil sintezno delo bolj učinkovito. Ker je v literaturi o pomenu kombinatorne kemije malo napisanega in ker se nismo zadovoljili z razlagom, ki kombinatorno kemijo označuje samo kot način izvedbe eksperimentalnega dela, smo zadevo raziskali globlje. Najprej smo v literaturi poiskali koncepte, ki bi bili primerni za opis kombinatorne kemije, potem pa smo jih preizkusili v praksi.

Teoretične osnove za kombinatorno delo smo preizkusili s sintezo heterocikličnih sistemov iz dimetilaminometilidenskih derivatov acetondikarboksilatov (slika 1).



Slika 1. Acetondikarboksilat (obarvan z modro) smo s pomočjo *N,N*-dimetilformamid dimetilacetala (DMFDA, obarvanega z rdečo) spremenili v dva različna dimetilaminometilidenska derivata (v sredini slike). Ta dva derivata sta bila osnovna gradnika za gradnjo končnih skupin produktov (na sliki skrajno desno), ki smo jih naredili s pomočjo kombinatornih metod.

Acetondikarboksilati in njihovi dimetilaminometilidenski derivati so dobro znani tako v heterociklični kemiji kot v paralelni sintezi in kombinatorni kemiji. Velik del zgodbe o kombinatorni kemiji se vrti okoli sinteze končnih skupin produktov ali tako imenovanih knjižnic. Veliko poudarka je tudi na avtomatizaciji vseh sinteznih postopkov in postopkov za izolacijo končnih produktov.

Med raziskovanjem uporabe kombinatorne kemije smo ugotovili, da je paralelna sinteza podpomenka oziroma orodje, ki ga uporablja kombinatorna kemija. Gre za avtomatiziran pristop sinteze knjižnic, ki zahteva nekoliko bolj poglobljen način načrtovanja sinteznih postopkov in postopkov za izolacijo produktov. Ker gre običajno za delo z večjo skupino izhodnih spojin, ki sodelujejo v eni pretvorbi, morajo biti postopki splošni, tako da so primerni za vse izhodne spojine. V ta namen so za potrebe paralelne sinteze včasih potrebne za to prirejene aparature, drugačen pa je tudi pristop k delu. Večja sistematicnost je potrebna že pri beleženju rezultatov eksperimentalnega dela, spremenjena je tudi organizacija dela, vse pa je namenjeno temu, da čim hitreje pridemo do večje skupine želenih produktov.

Kombinatorna kemija je veliko širši pojem. Ne zajema samo sinteznega dela kemije, ampak sta v njej močno zastopana tudi analiza in eksperimentiranje, kjer iščemo ustrezne reakcijske pogoje s pomočjo izvedbe večjega števila eksperimentov hkrati. Tudi pri našem delu se je pokazalo, da je za uspešno pripravo kombinatornih knjižnic treba vključiti vse možnosti, ki jih ponuja kombinatorna kemija, in da je treba pri delu z velikim številom spojin pokazati veliko iznajdljivosti ter pripravljenost sprejemati nove ideje.

Prav sprejemanje novih idej je bilo ključnega pomena, ko smo poskušali rezultate in nova znanja predstaviti javnosti. Nabor konceptov, ki bi ustrezno opisali kombinatorno kemijo, je v kemiji pomanjkljiv, zato smo si pomagali s pojmi iz vodenja kakovosti. Tako so pojmi, ki lahko ustrezno opišejo prednosti kombinatorne kemije, učna krivulja, Demingov krog, standardizacija in še nekateri podobni s tega področja. Vsi pa samo potrjujejo dejstvo, da postaja sintezna znanost čedalje bolj interdisciplinarna.

Use of Combinatorial Synthesis in Preparation of Mono and Bicyclic Heterocyclic Systems

JERNEJ BAŠKOVČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Branko Stanovnik, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Synthetic organic chemistry appears to be more of an art than science, because the systems where it takes place are concentrated solutions, which are most widely used systems in chemistry, but little of their mechanics is known to us today. All knowledge of synthetic chemistry is based on experiments, so it is of much importance how we conduct these experiments. Combinatorial synthesis is one of the possibilities to make synthetic work more efficient. Little is written about combinatorial chemistry as a concept and that is why we decided to investigate this a bit more in depth and then to test our new knowledge in practice.

We tested all the theoretical basics for combinatorial work on the synthesis of heterocyclic systems from dimethylaminomethylidene derivatives of acetonedicarboxylates (figure 1).

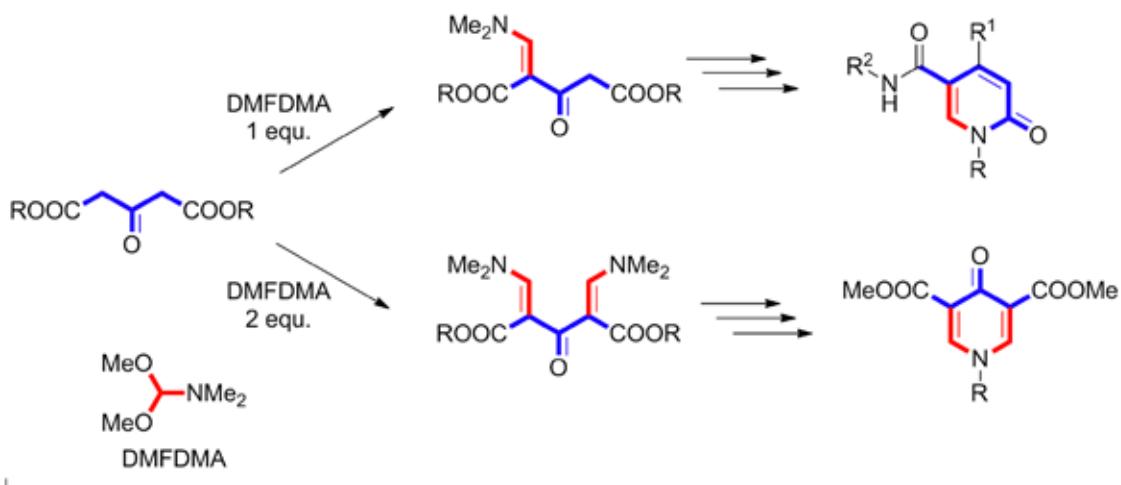


Figure 1. Acetonedicarboxylate (colored blue) was transformed, using *N,N*-dimethylformamide dimethylacetal (DMFDMA, colored red), into two kind of derivative (center of the figure). These two derivatives were our basic building blocks for the final groups of products (right side of the figure), that we synthesized using combinatorial methods.

Acetonedicarboxylates and their dimethylaminomethylidene derivatives are well known in heterocyclic chemistry and also in parallel synthesis and combinatorial chemistry. A great part of combinatorial chemistry is connected to the synthesis of libraries that are final groups of final products. There is also a lot of emphasis on automation of all procedures that include synthesis and isolation of products.

In our research of combinatorial chemistry, we found out that parallel synthesis is only a tool used by combinatorial chemistry. It represents an automated approach for synthesis of libraries, which demands somewhat more difficult planning of experiments. Because we are dealing with a large number of compounds, all the procedures must be general, so that all of the starting compounds can participate in same transformation and the same goes for isolation of products that are formed in this transformation. For the purpose of parallel synthesis, sometimes special devices must be incorporated in the procedure and also there is a greater demand for systematic approach and adapted organization of work. All this is needed that we can quickly obtain large libraries of desired products. Combinatorial chemistry is a much more general term, because it not only incorporates synthetic part of chemistry but also analysis and many experiments that are used for determining of suitable reaction conditions. This has also proven in

line of our work where we had to use all of the aspects of combinatorial chemistry to obtain our desired libraries of final products. In that kind of work one must show a great deal of ingenuity and an open mind. An open-minded approach was needed when we tried to present our results to the public. Chemistry lacks of concepts that describe combinatorial chemistry, so we had to borrow them from quality management. So, the concepts that describe combinatorial chemistry are learning curve, the Deming cycle, standardization and some others from this topic. This only confirms that science of synthesis is becoming increasingly more interdisciplinary.



Dr. SABINA DEVJAK NOVAK

Dr. Sabina Devjak Novak je že v osnovni šoli vedela, da bo farmacevtka, zato je bila po končani gimnaziji v Kočevju logična izbira študija na Fakulteti za farmacijo. Kot študentko jo je najbolj pritegnila tehnologija, zato je svoje izobraževanje nadaljevala na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. »Najbolj so me zanimale različne farmacevtske oblike in pomožne snovi, ki učinkovini omogočajo, da ob želenem času doseže želeno mesto v telesu,« je poudarila Novomeščanka, ki se je po opravljenem strokovnem izpitu zaposlila v Krki in hkrati nadaljevala izobraževanje na podiplomskem študiju.

Osrednja tema njene raziskovalne naloge je bil polimer hipromeloza in njene s funkcionalnostjo povezane lastnosti, ko hipromelozo uporabimo za izdelavo ogrodnih sistemov za doseganje podaljšanega sproščanja učinkovin. S proučevanjem s funkcionalnostjo povezanih lastnosti, kot so viskoznost, velikost delcev in stopnja substitucije, že v fazi razvoja novega izdelka bistveno pripomoremo h kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila. Rezultati opravljenega eksperimentalnega dela so že sedaj zelo uporabni v praksi, saj je, kot pravi sama, ustrezno vrednotenje in proučevanje fizikalno-kemijskih lastnosti hipromeloze bistveno za ustrezno kakovost končne farmacevtske oblike.

Po njenem mnenju mora biti uspešen znanstvenik vedoželen, sistematičen, priden, vztrajen in mora zaupati v svoje sposobnosti, saj se na svoji raziskovalni poti sreča s številnimi ovirami. Znanstvenoraziskovalno delo zagotovo terja celega človeka, zato skuša dobro izkoristiti vsako minuto prostega časa. Baterije napolni predvsem z glasbo, saj je zborovodkinja Zbora Deorina in Zbora Deorina Polovinke ter članica Pihalnega orkestra Krka, in s potovanji v London, kjer si z možem najraje ogledata dober muzikal ali koncert. Krkina nagrada za posebne dosežke ji pomeni veliko priznanje za dobro opravljeno delo in vesela je, da so njen trud in prizadevanje opazili tudi drugi. »Zelo pohvalno je, da Krka že dobra štiri desetletja posebno pozornost izkazuje mladim znanstvenikom. Zato si želim, da bi Krka še naprej združevala akademski svet z gospodarstvom.«

Proučevanje nekaterih s funkcionalnostjo povezanih lastnosti hipromeloze kot tvorilca ogrodnih tablet

SABINA DEVJAK NOVAK, Krka, d. d., Novo mesto

Mentorka: Saša Baumgartner, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Franc Vrečer, Krka, d. d., Novo mesto, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Ogrodni sistemi so danes najpogosteje uporabljeni sistemi za doseganje podaljšanega sproščanja zdravilnih učinkovin (ZU). Kot tvorilec hidrofilnega ogrodja in s tem nosilec podaljšanega sproščanja ZU se največkrat uporablja hipromeloza, ki je varen, netoksičen in cenovno sprejemljiv hidrofilni polimer, za katerega sta značilni še visoka stopnja nabrekanja in tvorba gela ob stiku z vodo oziroma fiziološkimi tekočinami. Snovalci Evropske farmakopeje so v njeno šesto dopolnilo uvedli novo splošno monografijo z naslovom S funkcionalnostjo povezane lastnosti pomožnih snovi (FRC). S tem se je monografija za hipromelozo precej spremenila, saj so na koncu dodani FRC-razdelki, ko hipromelozo uporabljamo v obliki veziva, drsila ali tvorilca ogrodja za tablete s podaljšanim sproščanjem. V doktorski nalogi smo se osredotočili na proučevanje treh FRC-parametrov hipromeloze, ko jo uporabimo kot tvorilca ogrodnih tablet, in sicer na viskoznost, velikost delcev in stopnjo substitucije.

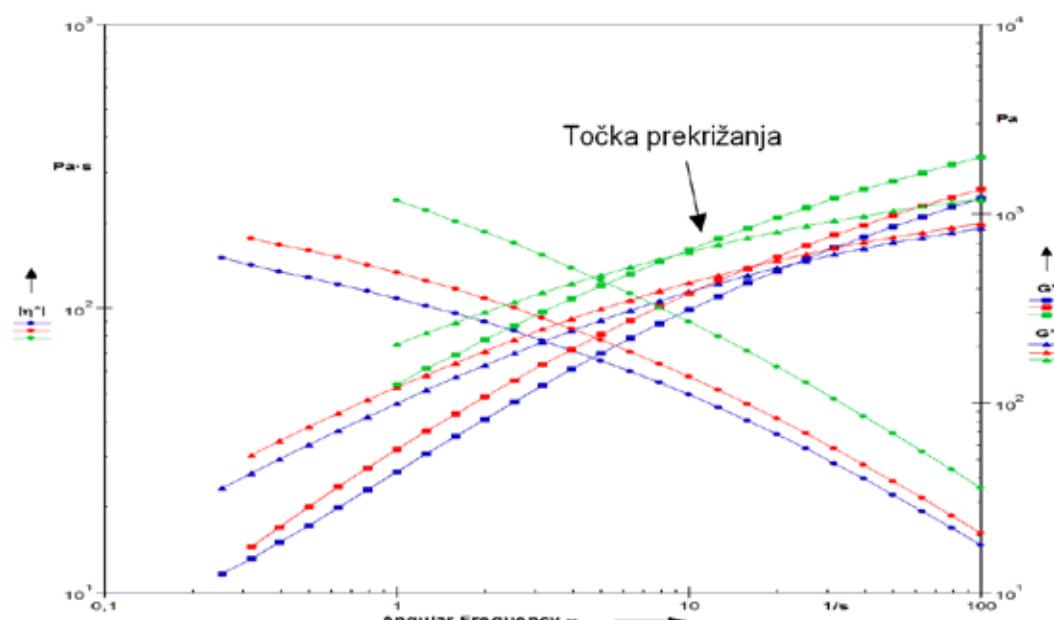
Pri proučevanju viskoznosti kot FRC-parametra smo setu hipromeloz s farmakopejsko oznako 2208 in nazivno viskoznostjo 4000 mPas določili viskoznost z rotacijskim reometrom. Ugotovili smo, da je razpon specifikacijskih mej za viskoznost v Evropski farmakopeji prevelik (3000–5600 mPas), saj vodi v medserijsko variabilnost hipromeloz enake substitucijske in polimerizacijske stopnje istega proizvajalca. Statistično pomembne razlike v viskoznosti hipromeloz posledično vodi v statistično pomembne razlike profile sproščanja slabo topne ZU natrijevega diklofenakata iz ogrodnih tablet, temelječih na omenjenem polimeru, medtem ko statistično pomembno ne vplivajo na sproščanje dobro topnega pentoksifilina. Ker ima viskoznost hipromeloze ključno vlogo pri nastanku in tvorbi gelske plasti ogrodnih tablet, ima s tem tudi ključno vlogo pri sproščanju natrijevega diklofenakata in pentoksifilina. Zato je treba v fazi razvoja vsakega posameznega izdelka določiti ožje specifikacijske meje za viskoznost kot FRC-parametra hipromeloze in pri tem upoštevati lastnosti in količino vgrajene hipromeloze, lastnosti vgrajene ZU ter postopek izdelave tablet.

Z oscilacijsko reometrijo smo hipromelozam z nazivno viskoznostjo 4000 mPas in različno stopnjo substitucije (s farmakopejskimi oznakami 2208, 2910 in 2906) določevali viskoelastične parametre, ki nam dajo informacijo o notranjih lastnostih proučevanih polimernih raztopin. Ugotovili smo, da vsi preizkušani vzorci hipromeloz s koncentracijami 4 % m/m in 6 % m/m tvorijo visoko koncentrirane polimerne disperzije, pri čemer sta elastični (G') in plastični (G'') modul v pogojih linearne viskoelastičnosti frekvenčno zelo odvisna. Kot pomemben in nov FRC-parameter se je izmed vseh proučevanih oscilacijskih parametrov pokazala točka prekrižanja. Ugotovili smo, da se hipromeloze enake polimerizacijske in substitucijske stopnje statistično pomembno razlikujejo v nekaterih viskoelastičnih parametrih in da so vsi viskoelastični parametri med seboj v korelaciji: velike vrednosti G' , G'' in η^* , nižji tan δ ter točka prekrižanja, pomaknjena k manjšim vrednostim, pomenijo tvorbo bolj viskozne in bolj homogene gelske plasti, kar ima za posledico počasnejše sproščanje ZU.

Z bližnjo infrardečo spektroskopijo (NIR) in matematičnim modeliranjem smo razvili univerzalni kvantitativni PLS-model za napovedovanje velikosti delcev hipromeloz (substitucijske stopnje 2208) dveh virov (Methocel® in Metolose®). Zaradi velike vrednosti napake modeliranja, velike vrednosti razlik med napovedano in izmerjeno vrednostjo velikosti delcev hipromeloz ter slabše napovedne moči modela pri napovedovanju velikosti delcev neznanih hipromeloz smo se odločili za razvitje dveh ločenih modelov glede na izvor hipromeloze. Ločena PLS-modela imata boljšo napovedno moč, zato lahko razvita modela uporabimo za napovedovanje velikosti delcev hipromeloz znanih virov, ob poznavanju stopnje substitucije pa lahko napovedujemo tudi sproščanje natrijevega diklofenakata. Boljšo napovedno moč ločenih PLS-modelov smo pripisali razlikam v izhodni surovini in različnem kemijskem postopku izdelave obeh vrst hipromeloze ter razlikam v substitucijskih parametrih ter porazdelitvi velikosti in oblik delcev med viroma polimera. Pri proučevanju vpliva velikosti delcev hipromeloze na sproščanje natrijevega

diklofenakata smo v splošnem ugotovili, da hipromelozi obeh proizvajalcev sproščata natrijev diklofenakat najhitreje iz tablet, narejenih z delci v velikostnem razredu od 100 µm do 125 µm, in najpočasneje iz tablet, narejenih iz nesejanih frakcij, ter iz tablet, narejenih iz frakcij v velikostnem razredu od 32 µm do 45 µm. Statistično različna profila sta pri tabletah z vgrajeno hipromelozo z delci od 100 µm do 125 µm obeh proizvajalcev. Za tvorbo homogene gelske plasti je eden izmed ključnih parametrov dovolj velika količina hidrofilnih hidroksipropilnih substituentov, vendar se je v našem primeru kot ključni parameter pri tvorbi gelske plasti pri sproščanju iz tablet z delci v velikostnem razredu od 100 µm do 125 µm pokazalo tudi ustrezno razmerje med metoksilimi in hidroksipropilnimi skupinami.

Pri proučevanju površinskih lastnosti hipromeloze z inverzno plinsko kromatografijo (IGC) smo ugotovili, da se hipromelozi dveh virov razlikujeta v nepolarnih lastnostih trdnih površin, medtem ko je razlika v polarnih lastnostih minimalna, kar pa ne vpliva na sproščanje natrijevega diklofenakata iz hidrofilnih ogrodnih tablet.



Slika 1. Viskoelastični parametri (G' , G'' in η^*) za različne tipe hipromeloz: zeleno (2208), rdečo (2910) in modro (2906.)

Rezultati naloge so primer proučitve kritičnih FRC-parametrov hipromeloze, ko jo uporabimo v vlogi tvorilca ogrodja za tablete s podaljšanim sproščanjem. Predstavljeni rezultati dokazujojo, da FRC-razdelki specifičnih monografij pomožnih snovi ne prinašajo zgolj dodatnih testiranj, ampak bistveno pripomorejo k pravilnemu razumevanju, katere FRC-lastnosti pomožne snovi so kritične za nameravano uporabo in/ali aplikacijo. Pravilno razumevanje in ovrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi že v predformulacijskih študijah razvoja novega izdelka pa bistveno pripomorejo h kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila.

The Study of Some Functionality-Related Characteristics of Hypromellose Used as a Matrix Forming Agent

SABINA DEVJAK NOVAK, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Saša Baumgartner, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Matrix systems are nowadays the most commonly used systems for prolonged release of active pharmaceutical ingredients (API). Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, hypromellose) as matrix forming agent is one of the most frequently used polymers, because it is safe, non-toxic, relatively cheap, and its high degree of swelling in contact with water or physiological fluids is an important property, which is well exploited in the pharmaceutical industry. In the European Pharmacopoeia new general monograph named "Functionality-related characteristics of excipients (FRC)" was introduced, what resulted in changes of the monograph for hypromellose. At the end of its monograph FRC sections are added. Within our research project, we studied three FRC parameters, when hypromellose is used as matrix forming agent: viscosity, particle-size distribution and degree of substitution (DS).

We studied apparent viscosity as FRC parameter in the first part of our study, therefore we determined apparent viscosity of several HPMC batches (substitution type: 2208 and labelled viscosity: 4000 mPas) with rotational viscometer. We found out that the specification limits for apparent viscosity in European Pharmacopoeia are too broad (3000-5600 mPas), which lead to batch-to-batch variability within the same manufacturer. Using HPMC having viscosity inside the acceptable range but being on the upper and lower side of the range, significant difference in release profile of diclofenac sodium was obtained. On the other hand, the release profile of soluble pentoxyfilline was not influenced by the mentioned differences in polymer viscosity. Viscosity is one of the key parameter influencing formation of hydrogel layer around the matrix tablets and it therefore also regulates the release rate of diclofenac sodium and pentoxyphylline. Therefore, the viscosity limits should be postulated as FRC parameter during the development of some individual formulation considering properties and amount of incorporated HPMC, properties of API and manufacturing process.

At studying rheological properties of different substitution degree of HPMC (substitution type: 2208, 2910 and 2906) and the same nominal viscosity of 4000 mPas, we determined viscoelastic properties by the oscillatory method, which provides us insight into intimate structure of the polymer network. It could be concluded that all investigated water dispersions of HPMC (4 % w/w and 6 % w/w) form highly concentrated polymer dispersions, where G' and G'' are strongly frequency dependent. The crossover point was found out as a new and important FRC parameter, which should be critically determinated and evaluated for each HPMC type. Based on our results we can conclude that there are bath-to-batch variability in visco-elastic properties of two types (2208 and 2910) of HPMC polymer. Batch-to-batch variability in the case of 2910 HPMC type has influence on statistically different dissolution profiles of diclofenac sodium. We also found out that higher values of G' , G'' , η^* , lower $\tan \delta$ and crossover point at lower frequency contributed to more viscous gel layer and slower drug release of model drugs.

Near-infrared spectroscopy (NIR) and mathematical modelling were used to build universal PLS model for predicting the particle-size of HPMC (substitution type 2208) of two different origins (Methocel® and Metolose®). The statistical parameters of universal PLS calibration model were not enough satisfying. Therefore, we separated the sieved fractions of HPMC into two groups with regard to their origin and built two separate PLS calibration models. The values of statistical parameters of separated PLS models were better in comparison to those obtained from the universal calibration PLS model. Although all HPMC batches used were chemically comparable, they differ in the starting materials for polymer manufacturing: cellulose fibers from wood pulp were the starting material for Metolose®, whereas for Methocel® it was cotton. We have also proved that HPMC samples from both manufacturers differ in particle-size distribution and in their methoxy/hydroxypropyl ratio. Our hypothesis was that the outliers obtained were attributable to the influence of sample chemical history (i.e., manufacturing procedure) on the NIR spectra of the HPMC samples. Evidently the universal calibration model did not cover all the

characteristics of samples used in cross validation. Based on our results it could also be concluded that all HPMC tablet types enable prolonged drug release irrespective of the HPMC particle-size fraction used. Formulations with HPMC particles in a size range from 100 to 125 µm showed faster drug release in comparison with formulations made of unsieved HPMC fractions or made of HPMC fractions in a size range from 32 to 45 µm. However, detailed examination of dissolution curves showed additional differences. The fastest drug-release profile was from tablets from HPMC-Metolose® particles with a size from 100 to 125 µm and the slowest from tablets made of HPMC-Methocel® with unsieved particles and HPMC-Methocel® with particles from 32 to 45 µm, which were practically identical. These suggest that the release of diclofenac sodium from tablets made of HPMC-Metolose® particles in the size range from 100 to 125 µm started before the continuous gel layer was formed. For the formation of a homogeneous gel layer, not only a high amount of hydrophilic hydroxypropoxy substituent is needed, but it seems that the appropriate methoxy/hydroxypropoxyl ratio is even more important. It can be concluded that various physical parameters had a different impact on low soluble drug-release profiles. The critical parameter is particle size and, within particles larger than 100 µm, the influence of methoxy/hydroxypropoxyl ratio is even more expressed.

Inverse gas chromatography (IGC) was used to detect differences in polar and non-polar characteristics of two HPMC origins (Methocel® and Metolose®). We could conclude that there are minor differences in non-polar properties, but those differences do not influence the dissolution profiles of diclofenac sodium.

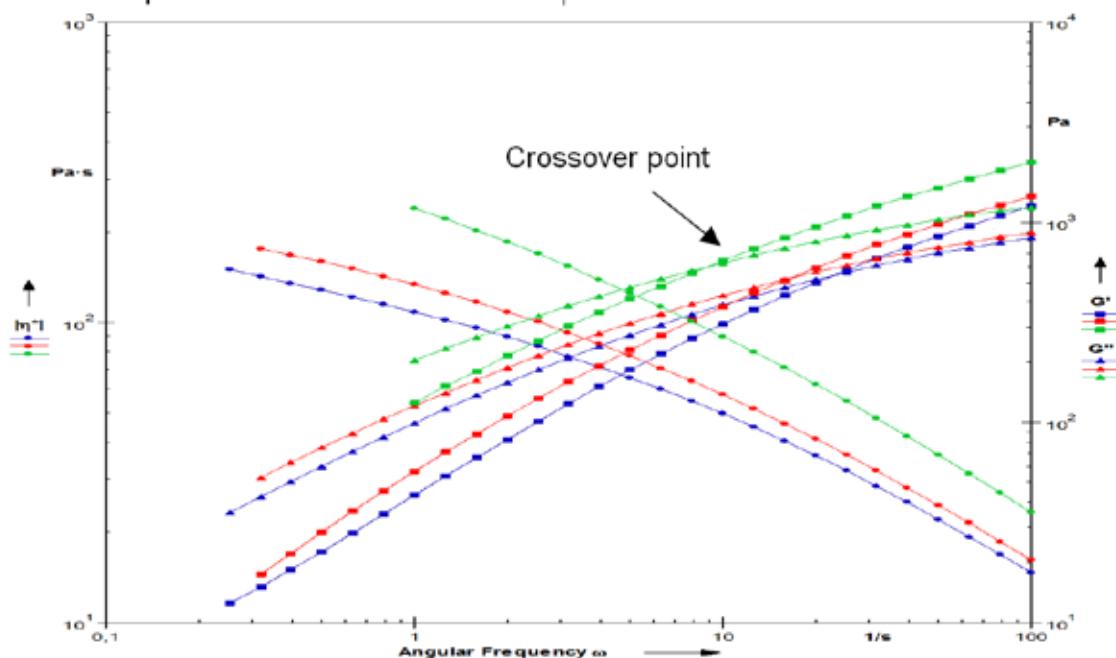


Figure 1. Viscoelastic parameters (G' , G'' in η^*) for different HPMC types: green (2208), red (2910) in blue (2906).

Our experimental work is an example of critical evaluation of FRC parameters of HPMC polymer, when it is used as matrix forming agent. Our results prove that FRC sections are not just additional testing, but they contribute to the quality of medicinal products and to the understanding which FRC parameter is critical for the intended use or intended formulation. Correct understanding and evaluation of physico-chemical characteristics of excipients in pre-formulation study are critical for safe, non-toxic and effective medicinal product of required quality.



Dr. BORUT KOVAČIČ

Zlati maturant ljubljanske bežigrajske gimnazije se je po končani maturi vpisal na Fakulteto za farmacijo, saj je bil že od otroštva bolj naklonjen naravoslovnim vedam. Kasneje je nadaljeval s podiplomskim doktorskim študijem biomedicine, postal še mladi raziskovalec na področju gospodarstva, se zaposlil v Krki in lani uspešno končal doktorski študij.

Krkaš primarno raziskuje področje farmacevtske tehnologije, ki ga od nekdaj zelo zanima. V svoji raziskovalni nalogi je ovrednotil nekatere industrijsko uporabne možnosti za izboljšanje lastnosti problematičnih zdravilnih učinkovin in se osredotočil predvsem na sproščanje takšne modelne učinkovine v gastrointestinalnih tekočinah. »To je bilo mogoče z razvojem dostavnega sistema s poroznimi nosilci in odkritjem kokristalov modelne učinkovine z različnimi pomožnimi snovmi, kar vodi do novih poti razvoja učinkovitih, varnih in kakovostnih zdravil,« še dodaja. Hkrati je predstavil domiselno uporabno vrednost, saj lahko s pomočjo takšnih trdnih disperzij načrtujemo zdravilo, ki teoretično omogoča uporabo enkrat na dan, vendar deluje enako, kot če bi klasično zdravilo vzeli dvakrat na dan, kar bi bila zagotovo pomembna pridobitev za uporabnike.

Krkina nagrada za posebne dosežke Ljubljjančanu pomeni veliko zadovoljstvo in priznanje za njegovo delo. Pravi, da so povezave med akademskim svetom in gospodarstvom zelo dobrodošle, saj gre za »pravo sinergijo med raziskovanjem industrijsko uporabnih tematik in boljšim vpogledom v najnovejše raziskave, kar je eden od receptov za uspešno poslovanje«. Po njegovem mnenju morajo biti uspešni raziskovalci sistematični, delavni, vztrajni ter usmerjeni k uporabnim rezultatom in povezovanju z drugimi strokovnjaki. Svoj prosti čas pa dr. Borut Kovačič najraje preživlja z ženo in njunim osemmesečnim sinom.

Izboljšanje farmacevtsko-tehnoloških lastnosti karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov

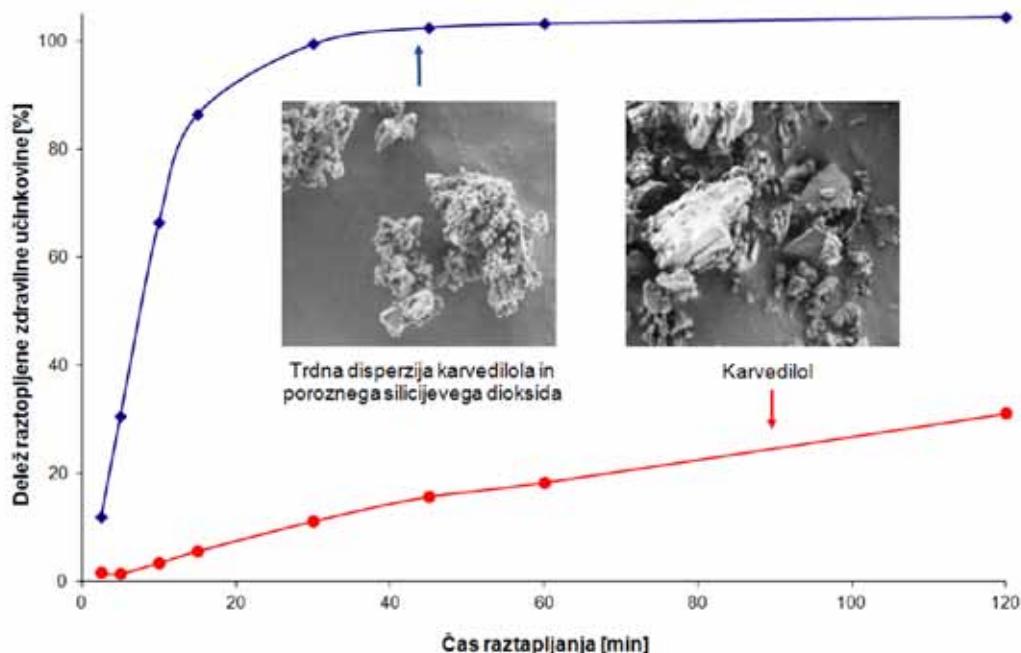
BORUT KOVAČIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Odon Planinšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Franc Vrečer, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; Krka, d. d., Novo mesto

Mnoge, še zlasti novejše zdravilne učinkovine imajo neugodne farmacevtsko-tehnološke lastnosti za razvoj farmacevtske oblike. Med te lastnosti prištevamo tiste fizikalno-kemijske lastnosti, ki so povezane s farmakokinetiko in procesibilnostjo zdravilne učinkovine, kot so topnost, hitrost raztopljanja, stabilnost, pretočne lastnosti in stisljivost praškov. Najbolj izpostavljeni neželeni lastnosti novejših zdravilnih učinkovin sta slaba topnost in počasno raztopljanje v gastrointestinalnih tekočinah. Posledica je majhna biološka uporabnost po peroralni aplikaciji ter z njo povezane večje inter- in intraindividualne variacije. Zato je bil osnovni namen našega raziskovalnega dela proučiti možnosti solubilizacije slabo topne modelne učinkovine karvedilola z izdelavo trdnih disperzij in kokristalov.

V prvem sklopu doktorske naloge smo izboljšali hitrost raztopljanja v vodi slabo topnega karvedilola z izdelavo trdnih disperzij v poroznem silicijevem dioksidu. Za izdelavo trdnih disperzij smo uporabili različne metode, s pomočjo katerih smo z izbranimi analiznimi metodami proučevali mehanizme nalaganja karvedilola na površino in v pore nosilca. Trdne disperzije karvedilola s poroznim silicijevim dioksidom smo pripravili na dva načina: z metodo adsorpcije karvedilola iz raztopine organskega topila in z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku. Iz trdnih disperzij, ki so izdelane na oba načina, se je karvedilol raztopljal bistveno hitreje kot sam izhodni karvedilol ali fizikalna zmes s poroznim silicijevim dioksidom. Za izboljšanje hitrosti raztopljanja so odgovorni različni dejavniki, kot so spremenjena kristalna oblika, zmanjšanje velikosti delcev, adsorpcija karvedilola na hidrofilno površino nosilca in s tem povezana boljša močljivost. Dokazali smo tudi, da med silicijevim dioksidom in karvedilolom ni močnih interakcij in s tem povezane energijske bariere za desorpcijo ob stiku trdne disperzije z vodnim medijem.



Slika 1. Primerjava posnetkov vrstične elektronske mikroskopije in hitrosti raztopljanja čistega karvedilola in karvedilola v trdni disperziji s poroznim silicijevim dioksidom.

Slabosti izdelave trdnih disperzij z metodo adsorpcije iz raztopine sta večja poraba topila in slab izkoristek procesa, saj se neadsorbirana snov, ki jo želimo vgraditi v trdno disperzijo, izgubi pri odstranjevanju topila s filtracijo. V nadaljevanju smo se osredotočili na izdelavo trdnih disperzij z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku, s čimer smo zagotovili učinkovito polnjenje por poroznega silicijevega dioksida brez izgub karvedilola. Izgubo topila in zdravilne učinkovine lahko dodatno zmanjšamo z uporabo topila, v katerem je zdravilna učinkovina bolje topna, s čimer lahko v postopku izdelave trdne disperzije pripravimo bolj koncentrirano raztopino. V trdne disperzije smo vgradili različne količine karvedilola, pri čemer je bil njegov delež v zmesi od 20- do 75-odstoten. Poleg tega smo trdne disperzije izdelali z metodo enostopenjskega in večstopenjskega polnjenja por. Pokazali smo, da koncentracija zdravilne učinkovine v trdni disperziji in metoda izdelave trdne disperzije vplivata na kristalno obliko karvedilola in njegovo močljivost ter na poroznost ozira specifično površino trdne disperzije, kar se je odražalo z različno hitrostjo razapljanja in fizikalno stabilnostjo amorfne oblike karvedilola. Fizikalna stabilnost amorfne oblike karvedilola je posledica prostorske restrikcije, saj pride do obarjanja v območju nosilca z manjšim premerom por, kjer ni prostora za tvorbo kristalizacijskih jeder in rekristalizacija karvedilola ni možna. Dodatno k stabilnosti trdne disperzije prispeva zmanjšana sposobnost sorpcije vlage iz zraka, ki sicer povzroči rekristalizacijo prostega amorfnega karvedilola v polimorfno obliko III.

Trdna disperzija karvedilola s poroznim magnezijevim aluminometasilikatom (Neusilin® US2) je bila osnova za razvoj uniformnega dostavnega sistema z dvopolznim sproščanjem zdravilne učinkovine. Z granuliranjem trdne disperzije z disperzijo gastrorezistentnega polimera smo dosegli hitro sproščanje dela odmerka v kislem mediju in hitro sproščanje preostalega dela odmerka v alkalnem mediju, pri čemer smo to razmerje obeh odmerkov regulirali s količino disperzije gastrorezistentnega polimera, ki smo ga uporabili za granulacijo. S takšnim enostavnim konceptom lahko razvijemo različne farmacevtske oblike, ki omogočajo uporabo zdravila enkrat na dan in imajo primerljive farmakokinetične lastnosti kot klasične farmacevtske oblike s takojšnjim sproščanjem, ki jih uporabimo dvakrat na dan.

Ena od metod za izboljšanje topnosti ali hitrosti razapljanja je tudi spremembra pojavnje oblike zdravilne učinkovine. Znano je, da lahko posamezna zdravilna učinkovina obstaja v različnih trdnih oblikah, kot so soli, kristalne oblike (polimorfi, psevdopolimorfi, kamor štejemo solvate in hidrate) in amorfna oblika, katerih fizikalno-kemijske lastnosti se lahko bistveno razlikujejo. Kadar tvorba soli zdravilne učinkovine ni možna, nam kokristalizacija ponuja dodatne možnosti in ima velik potencial za pripravo novih, stabilnih struktur, s katerimi lahko izboljšamo lastnosti zdravilnih učinkovin. V raziskovalni nalogi je opisana priprava kokristalov karvedilola in salicilne kislino v molarnem razmerju 1 : 1. Kokristalizacijo smo izvedli z mletjem obeh komponent, ki smo jima dodali majhno količino organskega topila, s katerim smo pospešili mehanokemijsko reakcijo. Pri mletju brez dodatka topila kokristal ni nastal. Mlete vzorce smo ovrednotili z različnimi analiznimi tehnikami (ATR FT-IR, DSC, XRPD in NMR v trdnem stanju), ki nam dajo informacijo o kristalni strukturi nastalega kompleksa, s čimer smo potrdili nastanek kokristala s karvedilom. Pokazali smo, da se karvedilol iz kokristalne strukture razaplja hitreje kot mleti karvedilol ali fizikalna zmes s salicilno kislino.

Improvement of Pharmaceutical-Technological Properties of Carvedilol with Solid Dispersions and Cocrystal Preparation

BORUT KOVACIČ, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Odon Planinšek, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Many, especially newer, active pharmaceutical ingredients have inappropriate pharmaceutical-technological properties for drug development. Among those properties we can include physicochemical properties, which are related to pharmacokinetics and processibility of active pharmaceutical ingredient, such as solubility, dissolution rate, stability, flow properties and compressibility of powders. Two of the most critical properties of recently discovered active pharmaceutical ingredients are their poor solubility and slow dissolution rate in gastrointestinal fluids. This causes low bioavailability after oral intake and is related to substantial inter- and intraindividual variations. Hence the main aim of our experimental work was to study possibilities of improving solubility of poorly water soluble carvedilol, which served as a model compound, by preparing solid dispersions and cocrystals.

In the first part of the PhD thesis, the dissolution rate of poorly water soluble carvedilol was improved by preparation of solid dispersions in porous silica. They were prepared by two methods: by adsorption of carvedilol from solution and by evaporating solvent with vacuum evaporator. In both cases the dissolution rate of carvedilol was significantly improved compared to pure crystalline substance or physical mixture with porous silica. This can be attributed to different factors, such as modified crystal structure, reduction of particle size, adsorption of carvedilol onto carrier's hydrophilic surface and better wettability. We have also demonstrated that there are no intensive interactions between silica and carvedilol meaning that energy barrier for desorption of carvedilol from silica is low upon contact of solid dispersion with aqueous medium.

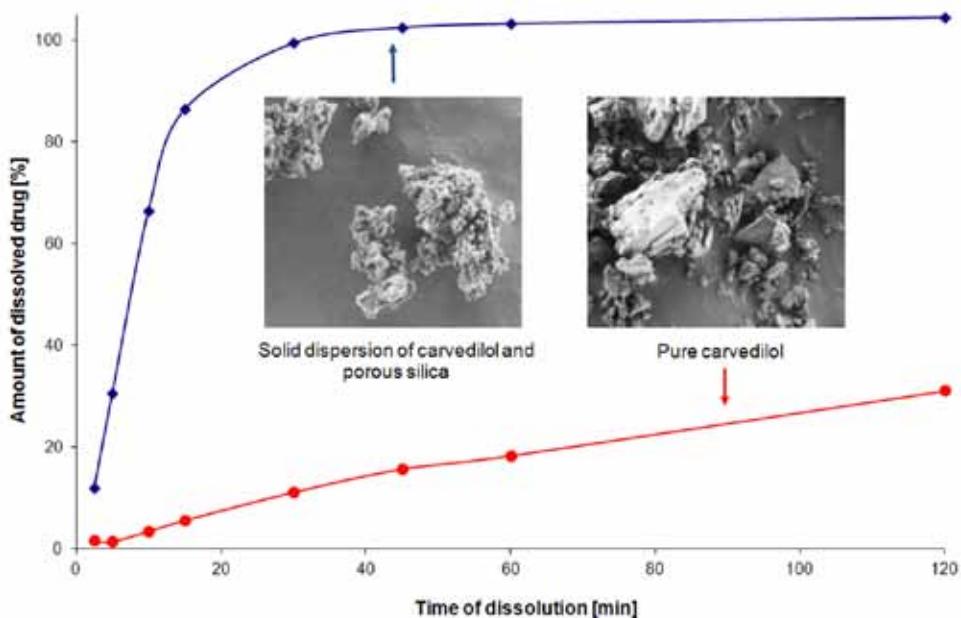


Figure 1. Comparison of SEM images and dissolution rate of pure carvedilol and carvedilol in solid dispersion with porous silica.

Preparation of solid dispersion by adsorption method is associated with greater solvent use and low

process yield, because the unadsorbed substance is flushed away during filtration. Therefore, we focused on preparation of solid dispersions by evaporating solvent with vacuum evaporator. In this way we assured an effective pore filling process into porous silica without wasting carvedilol. We can further decrease the loss of solvent and active pharmaceutical ingredient by using the solvent with highest solubility of active pharmaceutical ingredient. In that way more concentrated solution can be prepared. Different amounts of carvedilol were incorporated into solid dispersions, carvedilol contents were in range from 20% to 75%. Additionally, solid dispersions were prepared by either one-step or multiple-step pore-filling process. Amount of incorporated carvedilol and method of preparation of solid dispersions had great influence on crystalline form of carvedilol and on porosity or specific surface of solid dispersions, which influenced dissolution rate and physical stability of amorphous form of carvedilol. Physical stability of amorphous is associated to sterical space restriction as there is not enough space for formation of crystallization nuclei, meaning that crystallization of carvedilol is not possible. Above all, stability is enhanced by lower sorption of water from ambient air, which would otherwise cause crystallization of unprotected amorphous carvedilol into polymorph III.

Solid dispersion of carvedilol in magnesium aluminometasilicate (Neusilin® US2) was a basis for the development of uniform drug delivery system which releases two pulses of carvedilol. Granulation of solid dispersion with enteric polymer dispersion resulted in immediate release of first dose in acidic media and fast release of the remaining carvedilol in alkaline media. The ratio of quantities of first vs. second release was controlled with amount of enteric polymer dispersion used for granulation process. With such simple concept we are able to develop different dosage forms, which ensure once daily use of drug product that has comparable pharmacokinetic properties to twice a day use of classic dosage form with immediate release.

One of the methods for improving solubility or dissolution rate of active pharmaceutical ingredients is also the alteration of its solid state form. It is known, that active pharmaceutical ingredients are found in different solid state forms, such as salts, polymorphs, pseudopolymorphs (solvates, hydrates) and amorphous form, which differ in their chemical and physical properties. When salt formation is not an option, cocrystallization can be used as an additional alternative. It has a great potential for the preparation of new stable structures, and properties of active pharmaceutical ingredients can be improved in that way. In our thesis the preparation of cocrystal comprising of carvedilol and salicylic acid in molar ratio 1:1 is outlined. Cocrystallization was performed via solvent drop grinding of both components. Samples were characterized with different analytical techniques ((ATR FT-IR, DSC, XRPD in solid-state NMR) to obtain information of crystalline structure of prepared complex and to confirm cocrystal formation. Carvedilol had faster dissolution rate from cocrystal structure in comparison to ground carvedilol or physical mixture with salicylic acid.



Dr. MATJAŽ RAVNIKAR

»Že zelo zgodaj me je začelo zanimati naravoslovje in v farmaciji sem našel interdisciplinarno vedo, ki povezuje številne veje naravoslovja,« se spominja dr. Matjaž Ravnikar, ki je po končani gimnaziji nadaljeval študij na Fakulteti za farmacijo in se kasneje vpisal na podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti. Lani je doktoriral in se kot asistent zaposlil na Fakulteti za farmacijo, kjer se ukvarja z raziskovanjem biotehnologije in genetike, predvsem z razvojem novih bioloških zdravil in dostavnih sistemov za peroralno zdravljenje ter razvojem novih metod genskega zdravljenja luskavice.

V svoji raziskovalni nalogi je uspešno združil učinkovitost bioloških zdravil, ki jih zaradi njihovih kemijskih lastnosti večinoma ne moremo jemati peroralno, z bakterijskim dostavnim sistemom, ki omogoča peroralni vnos. To je osnova za ciljano lokalno zdravljenje bolezni prebavnega trakta, ki do sedaj ni bilo mogoče. Ljubljjančan še dodaja, da delo predstavlja temelj za razvoj široke palete bioloških peroralnih zdravil, vključno s peroralnimi cepivi. To bi lahko prineslo učinkovito, varnejše in cenovno dostopnejše zdravljenje številnih obolenj.

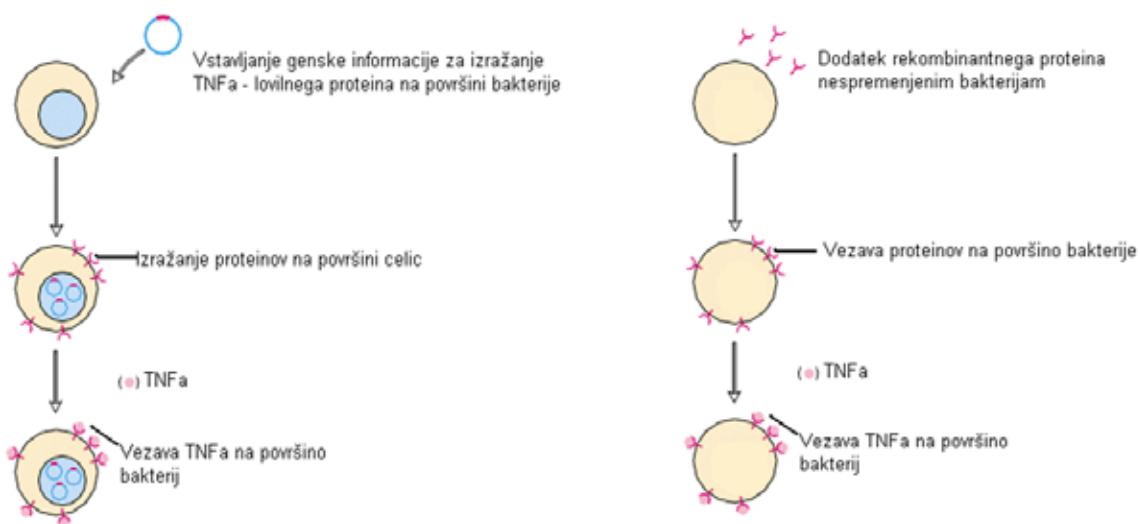
Krkina nagrada mu veliko pomeni, ker je potrditev dosedanjega dela in dodatna spodbuda za nadaljnje raziskovalno delo. Veseli ga, da je podelitev Krkinih nagrad postala prepoznaven dogodek, ki mladim raziskovalcem ponuja priložnost, da lahko predstavijo svoje delo.

Uspešni znanstveniki morajo po njegovem mnenju gojiti veselje in ljubezen do dela ter rado-vednost in željo po premikanju mej. »Za mlade znanstvenike na začetku raziskovalne poti je zelo pomembno tudi kakovostno mentorstvo, dobro vodenje in sodelovanje,« k čemur pri delu s študenti stremi tudi sam.

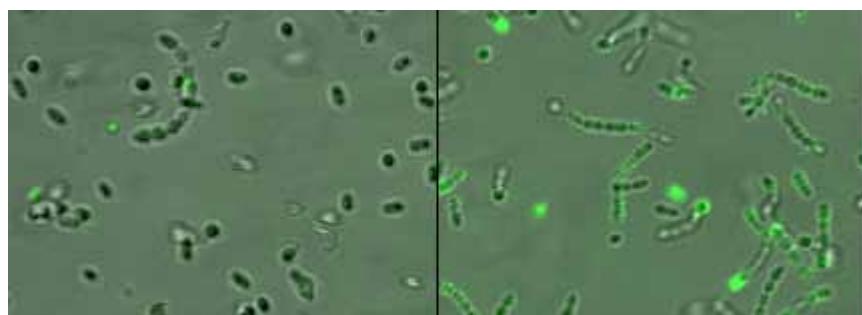
Razvoj rekombinantnih mlečnokislinskih probiotikov in interakcije probiotičnih mlečnokislinskih bakterij z zdravilnimi učinkovinami

MATJAŽ RAVNIKAR, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Borut Štrukelj, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Somentorica: Mojca Lunder, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mlečnokislinske bakterije so pomemben del mikrobiote v prebavnem traktu, ki ima velik vpliv na fiziološke procese tako v prebavnem traktu kot tudi drugje v telesu. So tudi obetaven sistem za dostavo bioloških zdravil v prebavni trakt. Imajo namreč obrambne mehanizme, ki jim omogočajo odpornost proti želodčni kislini in razgradnim encimom v prebavilih ter tako preživetje ali celo kolonizacijo prebavnega trakta. Prav ti mehanizmi so sposobni zaščititi tudi biološke molekule na površini mlečnokislinskih bakterij, kar lahko izkorisčamo za razvoj novih sistemov za dostavo bioloških zdravil. V času doktorskega dela smo razvili in ovrednotili rekombinantno mlečnokislinsko bakterijo *L. lactis*, ki je sposobna vezati vnetni citokin TNF- α in bi lahko pomenila pomemben napredek pri zdravljenju kroničnih črevesnih vnetnih bolezni, kot sta Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis.



Slika 1. Površinsko izražanje rekombinantnih molekul za vezavo in odstranjevanje TNF- α (levo) ter priprava gensko nespremenjene bakterije za vezavo in odstranjevanje TNF- α (desno).



Slika 2. Kontrolne celice (levo) in TNF- α -vezavne celice, tretirane s fluorescenčno označenim TNF- α (desno).

Kronične vnetne črevesne bolezni so resen družbeni problem, saj prizadenejo skoraj vsakega štiristotega v razvitem svetu. Najpogosteje jih še vedno zdravimo z zavirci imunskega sistema. Ta terapija je le delno učinkovita in zaradi sistemskega zaviranja imunskega sistema prinaša številne stranske učinke. Najučinkovitejša terapija vključuje biološka zdravila, kot so protitelesa proti vnetnemu citokinu TNF- α , vendar pa zaradi sistemskega vnosa zdravila tudi ta prinaša nevarnost stranskih učinkov. Bakterije, sposobne vezave in odstranjevanja TNF- α , bi tako pomenile varnejšo, cenejšo in bolniku primernejšo obliko zdravljenja.

Še en pomemben vidik mlečnokislinskih bakterij kot dela črevesne mikrobiote pa je njihov vpliv na razgradnjo in biološko uporabnost zdravilnih učinkovin v prebavnem traktu. Bakterije v prebavilih bi lahko zaradi širokega nabora encimov, ki jih izločajo, ter velike vezavne površine pomembno vplivale na zdravila, ki jih vnašamo v prebavni trakt. Preizkusili smo delovanje petih sevov bakterij na tri modelne učinkovine ter spremljali vsebnost in metabolizem učinkovin v gojišču. Preliminarni rezultati potrjujejo možnost vpliva bakterij na biološko uporabnost nekaterih zdravilnih učinkovin.

Research of Recombinant Probiotics and Interactions Between Probiotic Lactic Acid Bacteria and Drugs

MATJAŽ RAVNIKAR, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Borut Štrukelj, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Co-supervisor: Mojca Lunder, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Lactic acid bacteria are an important part of microbiota in the bowel which has an enormous influence on physiological processes in the bowel and elsewhere in the body. On the other hand lactic acid bacteria represent a promising system of delivery of biopharmaceuticals to the bowel. Namely they possess defense mechanisms which make them resistant to gastric acid and degradation enzymes in the bowel and thus give them the ability of surviving or even colonization of the bowel. Precisely these mechanisms are also capable of protecting biomolecules that are expressed on the surface of lactic acid bacteria which can be used for development of new systems of delivery of biopharmaceuticals. In this PhD work we have developed and assessed recombinant lactic acid bacteria *L. lactis* which has the ability to bind inflammatory cytokine TNF- α and could thus signify an important progress in the treatment of chronic inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis.

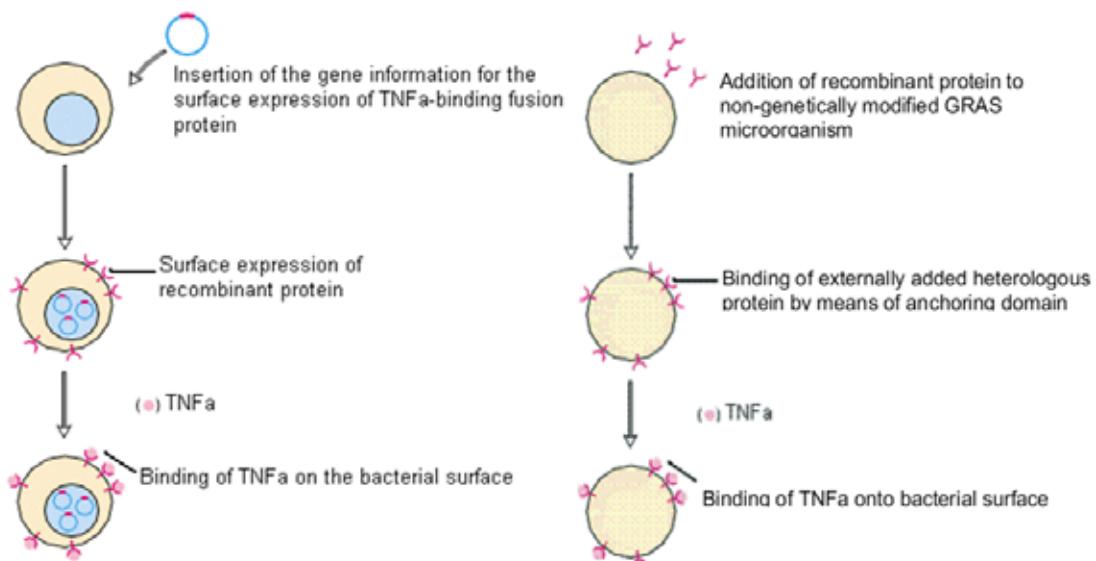


Figure 1. Surface expression of recombinant molecules for binding and elimination of TNF- α (left) and preparation of genetically unmodified bacteria for binding and elimination of TNF- α (right).

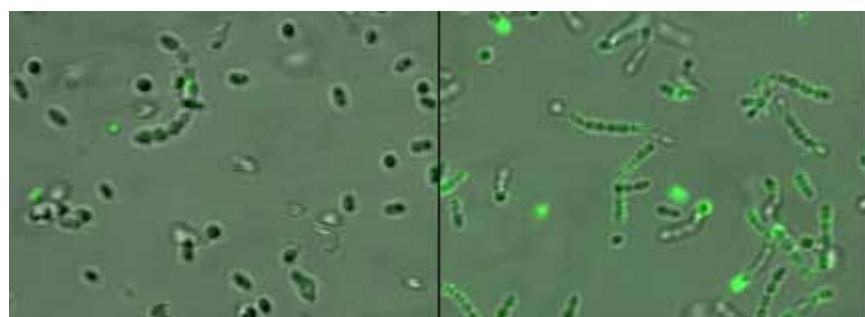


Figure 2. Control cells (left) and TNF- α -binding cells (right) detected with Alexa Fluor 488-conjugated TNF- α .

Inflammatory bowel diseases affect almost one person in four hundred in the developed world, thus representing a major social problem. Current therapy is based on the use of immunosuppressants. It is only partially effective and causes many side effects due to systemic immune suppression. Most effective therapy includes biomedicals such as antibodies against proinflammatory cytokine TNF- α but it also brings a risk of side effects due to systemic intake of the drug. Bacteria capable of binding TNF- α would therefore represent a safer, cheaper and more patient friendly therapy.

Another important aspect of lactic acid bacteria as a part of bowel microbiota is their influence on metabolism and bioavailability of drugs in the bowel. Bacteria in the bowel could have an important influence on drugs delivered into the bowel due to the wide range of enzymes they secrete and large binding surface. We have tested the effect of five different strains of bacteria on three model drugs and monitored the contents and metabolites of the drugs in the culture medium. Preliminary results confirm the possibility of bacteria's influence on bioavailability of several drugs.

Dr. DAVID ŠARLAH



Dr. David Šarlah je bil že kot osnovnošolec odločen, da postane kemik. Njegova strast do kemije se je z leti le še povečevala in ga vodila do raziskovalnega dela na Kemijskem inštitutu in na Fakulteto za kemijo v Ljubljani. Kasneje se mu je ponudila življenjska priložnost za raziskovanje področja totalne sinteze na ameriški fakulteti Columbia in delo v Scrippsovem raziskovalnem inštitutu v Združenih državah Amerike, ki ga je popolnoma navdušilo.

Štajerec, ki biva na Zveznem inštitutu za tehnologijo v Švici, kjer opravlja podoktorski študij na področju razvoja novih asimetričnih reakcij, se je v svoji raziskovalni nalogi ukvarjal s totalno sintezo, ki je močno povezana z naravo. Pravi, da smo na molekularni ravni nekakšni arhitekti in gradbinci hkrati, saj lahko sintetiziramo veliko kompleksnih naravnih spojin, ki so v naravi izjemno redke. »S tem zagotovimo zadostne količine spojin in njihovih derivatov za biološka vrednotenja. Tako odkrijemo, da so določene spojine biološko zelo aktivne in da so kot spojine vodnice odlično izhodišče za razvoj novih zdravil.« S svojim raziskovalnim delom je dal smernice za razvoj novih zdravil, saj se je pri testiranju spojin in njihovih analogov pokazalo, da učinkovito zavirajo določene patogene, kot so HIV, arenavirusi in tuberkuloza, in imajo povsem nov mehanizem delovanja.

Mladi raziskovalec, ki ga bolj vleče v akademske vode, se je moral v svoji karieri marsičemu odpovedati in biti zelo discipliniran, da je lahko uresničil svoje cilje. Pravi, da se na koncu uspeh meri v tem, kako dobro se znamo pobrati, ko se kakšna stvar ali eksperiment ne odvija, kot bi si želeli. Po njegovih besedah mora biti uspešen znanstvenik pozrtvovalen in strasten, kar zagotovo vodi do dobrih rezultatov. Njegova odločenost je že večkrat obrodila sadove, saj je že pred desetimi leti prejel Krkino nagrado za študente, Krkina nagrada za posebne dosežke pa mu pomeni predvsem spodbudo in motivacijo za nadaljnje delo. »Zelo lepo je videti, da podjetje, kot je Krka, ceni tvoje delo. Spoštujem dolgoletno tradicijo povezovanja podjetja z akademskim svetom in menim, da je Krka vzor sodobnega in uspešnega podjetja.«

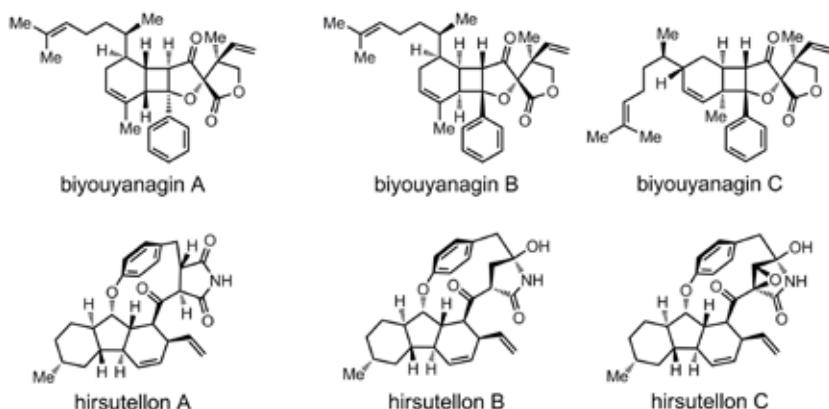
Totalna sinteza in biološko vrednotenje antiinfekcijskih naravnih spojin iz družine bijojanaginov in hirsutelonov

DAVID ŠARLAH, Scrippsov raziskovalni inštitut, La Jolla, Kalifornija

Mentor: K. C. Nicolaou, Scrippsov raziskovalni inštitut, La Jolla, Univerza v San Diegu, Kalifornija

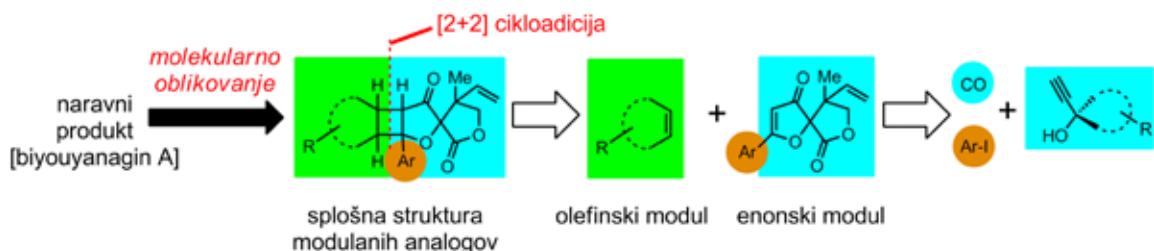
Naravne spojine (sekundarni metaboliti) so že od nekdaj daleč najbolj pomemben in učinkovit vir spojin vodnic pri razvoju zdravil. Tako je tudi danes, saj več kot polovica na novo odobrenih zdravil temelji na naravnih spojinah oziroma izhaja iz njih. Pri tem je ključnega pomena totalna sinteza, ki zagotavlja dostop do biološko aktivnih naravnih produktov, katerih izolacija je otežena iz naravnih virov, in do analogov naravnih spojin, do katerih je dostop mogoč le s kemijsko sintezo. Totalna sinteza je tudi vodilna sila pri odkrivanju novih kemijskih reaktivnosti in vrednotenju kemijskih sinteznih tehnologij ter napredka organske kemije nasprotno.

Pri delu smo se osredotočili na bijojanagine in hirsutelone (slika 1), dve strukturno edinstveni in kompleksni skupini sekundarnih metabolitov, pri katerih je bila izolacija iz naravnih virov še posebej problematična. Bijojanagini so bili izolirani na Japonskem iz cvetov rastlin roda *Hypericum* in inhibirajo replikacijo HIV-a. Hirsuteloni pa so bili najdeni v patogenih glibah tipa *Hirsutella nivea* na Tajske in imajo veliko antituberkulozno aktivnost. V okviru kemijskega dela smo razvili prvi dve totalni sintezi omenjenih naravnih spojin, ki sta vključevali vrsto kaskadnih reakcijskih sekvenc in kemoselektivnih reakcij.



Slika 1. Molekulske strukture bijojanaginov in hirsutelonov

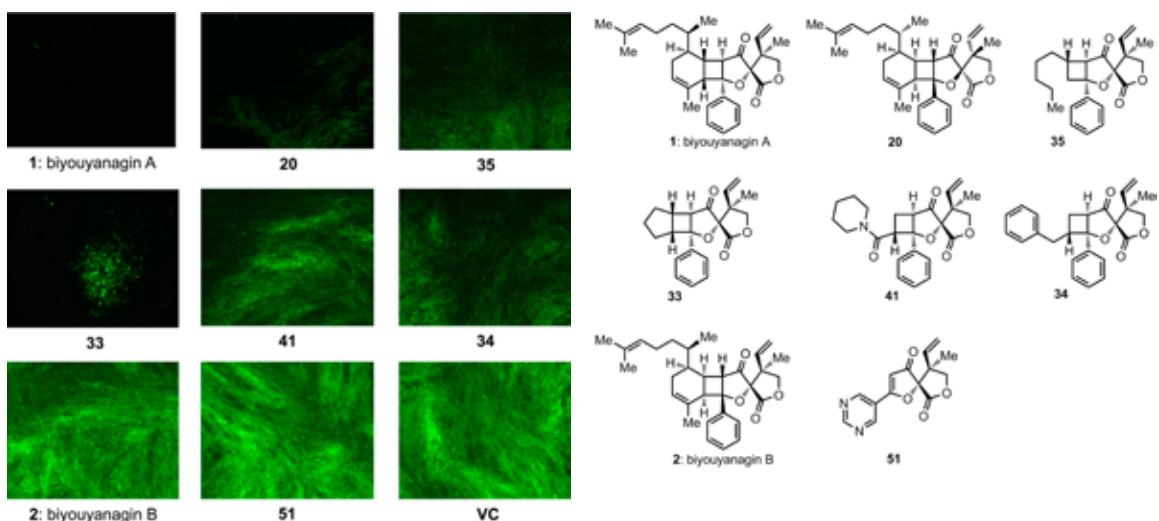
Zaradi konvergentno zasnovane kemijske sinteze smo s pomočjo modularnega pristopa izredno hitro in enostavno pripravili fokusirano knjižnico spojin na osnovi bijojanaginov (slika 2).



Slika 2. Modularni dostop do analogov bijojanagina A

To je pripeljalo do odkritja majhnih organskih molekul s povečano selektivno aktivnostjo proti infekciji s HIV-om. V dodatnih testiranjih pa smo odkrili, da določene spojine tudi uspešno zavirajo arenaviruse (slika 3). Zanimivo je, da nobena od aktivnih spojin ni pokazala virucidne aktivnosti in zaviranja pritrjevanja

virusa na celico (zaviranje vstopa); pogosteje so zavirale replikacijo virusov s pomočjo genske regulacije. Prav tako je pomembno omeniti, da nobena od aktivnih spojin ni povzročila zaznavne celične toksičnosti (pri koncentraciji, ki je zavrla več kot 99 % virusov).



Slika 3. Antiarenavirusna aktivnost bijojanaginov in njihovih analogov. Celice tipa BHK-21 so bile okužene z rekombinantnim virusom limfocitnega horiomeningitisa (LCM) v prisotnosti spojin ($50 \mu\text{M}$); 36 ur po infekciji pa se je virusno breme izmerilo s pomočjo GFP-ekspresije. Prikazani so primeri spojin z veliko (1 in 20), srednjo (35 in 33), majhno (41 in 34) in zanemarljivo (2 in 51) antiarenavirusno aktivnostjo. VC predstavlja kontrolni eksperiment.

V nadaljevanju smo pokazali, da imajo določene spojine iz knjižnice bijojanaginov znatno zmožnost modulacije imunskega odziva, saj zmanjšajo izločanje vnetnih citokinov IL-6 iz stimuliranih humanih mononuklearnih celic THP-1. Nekatere izmed teh aktivnih spojin pa tudi selektivno zavirajo izločanje raznih protivnetnih citokinov, kot so IL-1 β in TNF- α v primerjavi z IL-1 α oziroma IL-8.

Total Synthesis and Biological Evaluation of Anti-Infective Natural Products from the Biyouyanagin and Hirsutellone Families

DAVID ŠARLAH, *The Scripps Research Institute, La Jolla, California*

Supervisor: K.C. Nicolaou, *The Scripps Research Institute, University of California, San Diego*

Natural products have been the single most productive source of leads for the development of drugs. In fact, more than half of the drugs approved nowadays are based on natural products. For the past century, the total synthesis of natural products has served as the flagship of chemical synthesis and the principal driving force for discovering new chemical reactivity, evaluating physical organic theories, testing the power of existing synthetic methods, and enabling biology and medicine.

In this context, we have become interested in two structurally unique groups of secondary metabolites, namely the biyouyanagins (isolated in Japan from plants of the *Hypericum* genus) and the hirsutellones (isolated in Thailand from the pathogenic fungus *Hirsutella nivea*). They displayed impressive biological activities against HIV and tuberculosis. Due to their scarcity in nature we developed their first total syntheses, featuring a number of novel cascade sequences and chemoselective reactions.

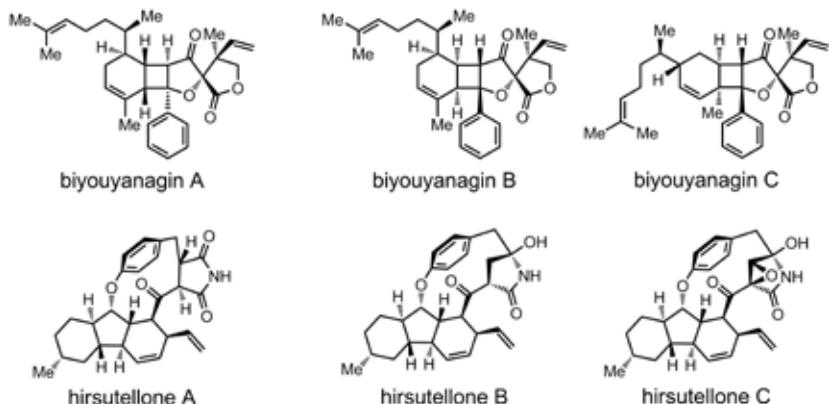


Figure 1. The structures of biyouyanagins and hirsutellones.

Motivated by the potentially useful biological activities reported for biyouyanagin A and our ability to synthesize the molecular framework of this complex structure, we proceeded to explore the molecular space around the biyouyanagin molecule in search of simpler structures with enhanced biological activities. As depicted on Figure 2, the design of our compound library was guided by the modular nature of the biyouyanagin structure and the convergent synthetic approach to biyouyanagins.

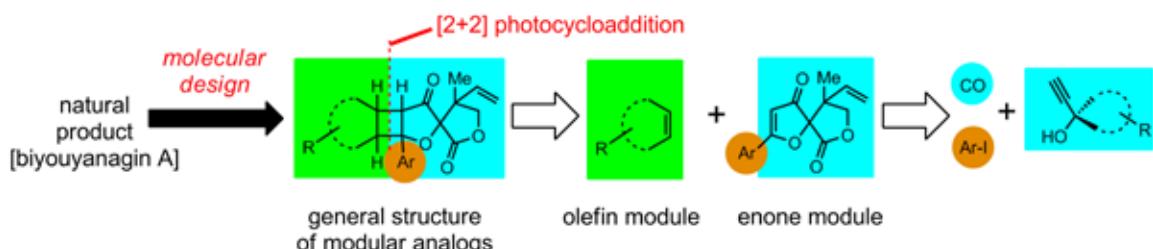


Figure 2. Modular compound library design and its retrosynthetic analysis.

The synthesized compound library was subjected to biological screening, aiming to detect lead compounds for antiviral (i.e., anti-arenavirus and anti-HIV properties) and anti-inflammatory (i.e., LPS-induced

cytokine production inhibitory properties) agents. Indeed, these investigations led to the discovery of a number of compounds that have higher potencies than natural product (biouyanagin A) in the HIV neutralization assay. Additionally, we screened several members of the biouyanagin compound library for their antiarenaviral activity against LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus). As shown on Figure 3, several analogs displayed significant activity against LCMV. For the most active compounds, maximal anti-arenaviral (greater than 99% inhibition of GFP expression) activity was observed at a concentration at which these compounds did not cause noticeable BHK-21 cell toxicity. In addition, none of the active compounds exerted virucidal activity or inhibition of virus binding to cells; rather, they inhibited virus replication and gene expression through a mechanism that remains to be determined.

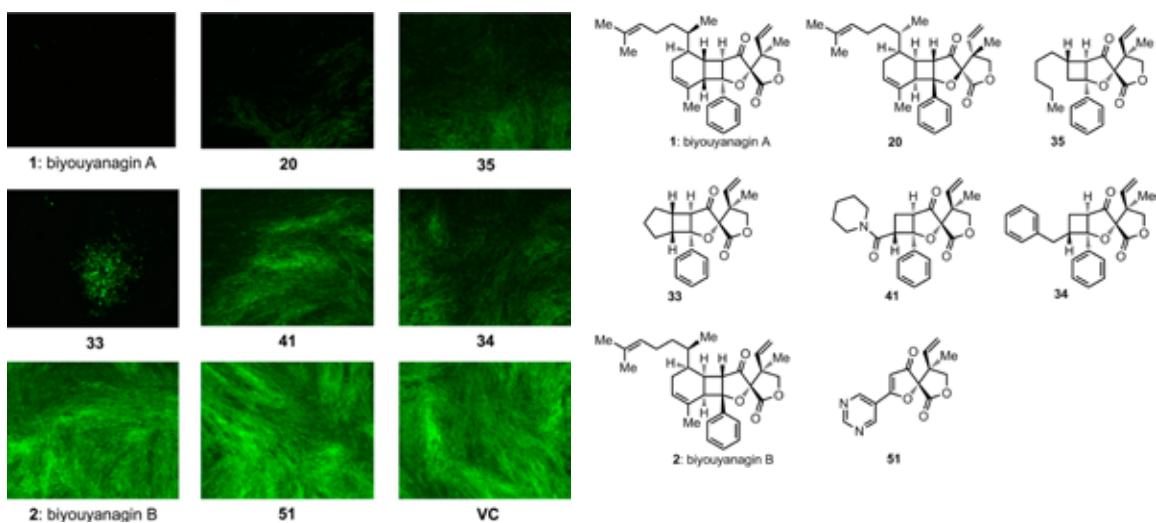
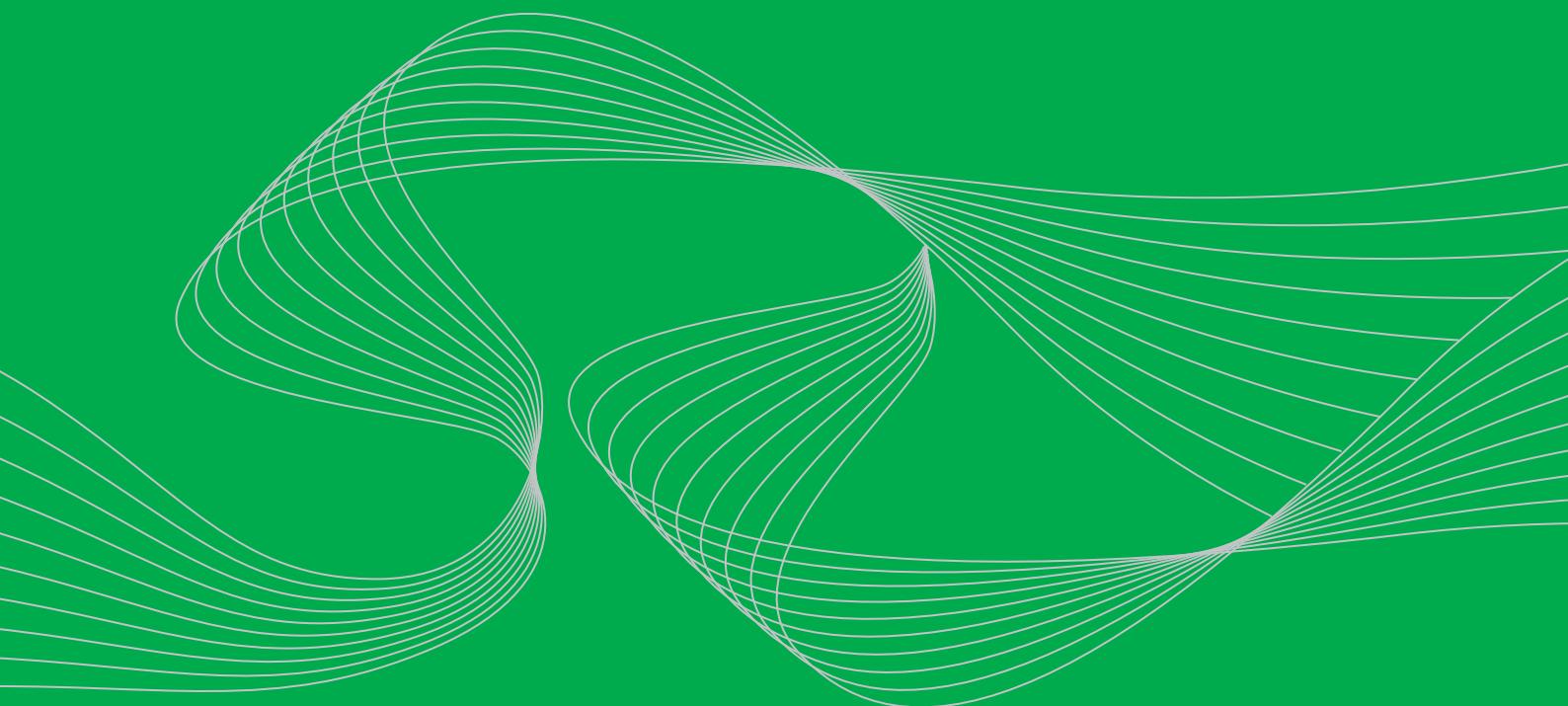


Figure 3. BHK-21 cells were infected with a recombinant LCM virus expressing GFP, called r3LCMV-GFP at a multiplicity of infection of 0.1 in the presence of the indicated compound (50 μ M). At 36 h postinfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, and viral load was assessed based on GFP expression. The figure shows examples of compounds with high (1 and 20), medium (35 and 33), low (41 and 34), or negligible (2 and 51) anti-LCMV activity. VC, treatment with vehicle (DMSO).

Finally, we show that several members of the biouyanagin library significantly reduce the levels of LPS-stimulated inflammatory IL-6 release in the human macrophage cell line THP-1. Furthermore, we show that several of these bioactive compounds also elicit selective effects on the production of other anti-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , with no effect on IL-1 α or IL-8 production.

42.



Krkine nagrade na področju raziskovalnega dela
Krka Prizes for Achievements in Research

*Povzetki
Abstracts*

Specifična vezava ekvinatoksina II, citolitičnega proteina iz morske vetrnice *Actinia equina*, na sfingomielin

BISERKA BAKRAČ, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
Mentor: Gregor Anderluh, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ekvintoksin II (EqTII) je citolitični protein iz morske vetrnice *Actinia equina*. Z uporabo površinske plazmonske rezonančne, metodo točkovnega odtisa itd. smo pokazali, da je EqTII sfingomielin (SM) specifičen protein. Neposredno se veže izključno na SM, ne pa tudi na druge sfingolipide ali holesterol. Z mutagenizo ključnih aminokislin in kombinacijo biofizikalnih metod smo pojasnili molekularni mehanizem prepoznavanja SM. Uporabili smo ga tudi v raziskavah na celičnih kulturah in pokazali, da je fizijski protein, sestavljen iz EqTII in zelenega fluorescentnega proteina (Green Fluorescent Protein, GFP) (EqTII-GFP), ohranol specifično vezavo SM in je zanesljiv in uporaben označevalc celičnega SM. Rezultati so presenetljivo pokazali, da EqTII-GFP kolokalizira z označevalcem, specifičnim za Golgijev aparat (GA), kar pomeni, da se mora SM v GA v nekem trenutku nahajati citosolno, pa čeprav njegova sinteza poteka v lumnu GA. To je v skladu z nekaterimi objavami, ki kažejo, da naj bi se tu nahajala neutralna sfingomyelinaza 2, ki je ključna pri celičnem signalizirjanju, v katerega je vpletен SM. SM je namreč pomemben celični lipid, ki ni le gradnik celičnih membran, ampak tudi vir pomembnih signalnih molekul, kakršni sta ceramid in sfingozin-1-fosfat, ki sta med drugim vključeni v patogenezo raka. EqTII bo lahko v prihodnosti prispeval k širitvi znanja o SM in z njim povezanih bolezni, kot so Niemann-Pickova bolezen tipa A, Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza itd.

Specific Binding of Equinatoxin II, Cytolytic Protein from the Sea Anemone *Actinia equina*, to Sphingomyelin

BISERKA BAKRAČ, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana
Supervisor: Gregor Anderluh, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Equinatoxin (EqTII) is a cytolytic protein from sea anemone *Actinia equina*. By using surface plasmon resonance experiments, dot blot assay, etc. we have shown that EqTII is a sphingomyelin (SM)-specific protein. It binds only to SM and not to other sphingolipids or cholesterol. By using site-directed mutagenesis and different biophysical methods we also clarified the molecular mechanism of SM recognition. We further used EqTII as a probe to detect cellular SM. Fusion protein with green fluorescent protein (GFP) was generated (EqTII-GFP) and it retained the SM specific binding. EqTII-GFP surprisingly colocalized with markers specific to Golgi apparatus (GA). These results indicate that some SM in GA is exposed to the cytosol, although its synthesis takes place in lumen of GA. This is in agreement with the notion that a small pool of SM should be available, via exposure to the cytosol, for ceramide signaling by neutral sphingomyelinase 2. We have shown EqTII is a reliable probe for studying cellular SM, which is not just important constituent of plasma membrane, but is also a source of signaling molecules, such as ceramide and sphingosine-1-phosphate, both important in cancer pathogenesis and treatment. Therefore EqTII as SM probe could expand the knowledge of the SM metabolism, its distribution and therefore of the SM-related diseases, such as Niemann-Pick disease type A, Alzheimers disease, multiple sclerosis, etc.

Sinteza blokkopolimerov različnih arhitektur na osnovi asparaginske kisline in laktida

BLAŽ BRULC, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentorica: Majda Žigon, Kemijski inštitut Ljubljana

S sintezo in z naknadno (ko)polimerizacijo z odpiranjem obroča (ROP) benzilno zaščitenih N-karboksianhidridov (NCA) L-asparaginske in L-glutaminske kisline ter uporabo različnih tipov polimerizacijskih iniciatorjev (bazičnih, nukleofilnih, mono-, di-, tri- in tetrafunkcionalnih) smo pripravili linearne in zvezdaste poli(β -benzil L-aspartate) ter poli(γ -benzil L-glutamate). S katalitsko hidrogenolizo lahko stranske benzilne estrske skupine kvantitativno pretvorimo v proste karboksilne skupine. Absolutna povprečja molskih mas in njihove porazdelitve smo določili z metodo velikostne izključitvene kromatografije z detektorjem na sisanje svetlobe. Z uporabo NMR smo opredelili sestavo pripravljenih polimerov in številčno povprečje molske mase ter potrdili in identificirali nekatere stranske produkte polimerizacij v odvisnosti od uporabljenega monomera, iniciatorja in temperature polimerizacije. Z izvedbo *in situ* NMR-eksperimentov polimerizacije z odpiranjem obroča N-karboksianhidridov (NCA ROP) smo ovrednotili kinetiko polimerizacije obeh uporabljenih NCA-monomerov v odvisnosti od koncentracije monomera in tipa uporabljenega iniciatorja. Dokazali smo, da je polimerizacija NCA »živa« polimerizacija in da je s sekvenčnim dodajanjem dveh NCA-monomerov moč pripraviti njune (multi)blokkopolipeptide z ozko porazdelitvijo molskih mas. Iz obeh sintetiziranih linearnih homopolipeptidov smo pripravili njune blokkopolimere z L-laktidom z uporabo kositrovega(II) oktanoata kot iniciatorja polimerizacije z ROP L-laktida in tako pokazali primernost novega uporabljenega sinteznega pristopa za pripravo amfifilnih blokkopolimerov poliesteramidov.

Synthesis of Block Copolymers of Different Architectures Based on Aspartic Acid and Lactide

BLAŽ BRULC, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Majda Žigon, National Institute of Chemistry Ljubljana

By synthesizing and (co)polymerizing benzylic protected L-aspartic acid and L-glutamic acid N-carboxyanhydrides (NCAs) by ring-opening polymerization (ROP) we prepared linear and star-like poly(β -benzyl L-aspartate)s and poly(γ -benzyl L-glutamate)s by using different types of initiators (basic, nucleophilic, mono-, di-, tri-, and tetrafunctional). Catalytic hydrogenolysis was shown to be a suitable strategy to quantitatively transform pendant benzylic ester groups into free carboxylic groups. The absolute molar-mass averages and molar-mass distributions were determined by size-exclusion chromatography coupled to a multi-angle laser light scattering detector. NMR enabled us to elucidate the composition and the structure of the synthesized polymers, to determine their number-average molar masses as well as to identify some side products formed during the polymerizations, depending on the monomer, the initiator or the temperature used in the individual reactions. By performing some *in situ* NCA ROP conversion experiments using NMR the kinetics of their polymerization was evaluated as a function of the type of initiator used and the initial monomer concentration. By sequential addition of two different NCA monomers the »living« nature of this type of ring-opening polymerizations was demonstrated by preparing a (multi)block copolymer having a narrow molar-mass distribution. Starting from both linear homopolypeptides, their block copolymers with L-lactide were prepared using Sn(Oct)₂ as the ROP initiator, thus showing the suitability of this novel approach to synthesize amphiphilic poly(esteramides).

Strukturno podprto načrtovanje novih zaviralcev DNA-giraze B

MATJAŽ BRVAR, Kemijski inštitut Ljubljana

Mentor: Tomaž Šolmajer, Kemijski inštitut Ljubljana

Somentor: Andrej Perdih, Kemijski inštitut Ljubljana

DNA-giraza je bakterijski encim iz družine topoizomeraz, ki je vpletен v proces podvajanja verižne molekule bakterijske DNA, imenovane plazmid. Njegova vloga je vpeljava dodatnih negativnih zavojev v molekulo. Sestavljen je iz dveh podenot A, na katerih je vezavno mesto za DNA-molekulo, in iz dveh podenot B, na katerih je ATP-vezavno mesto. Ker je giraza prisotna samo v bakterijah, predstavlja z vidika selektivne toksičnosti zelo dobro tarčo za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Na osnovi dosedanjih strukturnih podatkov o vezavi dveh skupin naravnih zaviralcev, kumarinov in ciklotrialidinov, smo pripravili različne modele ter s pristopom *in silico* odkrili tri nove razrede zaviralcev DNA-giraze B. Njihovo aktivnost smo ovrednotili z encimskim testom, ki je temeljil na merjenju fluorescence. Dvema razredoma smo *in vitro* določili tudi protibakterijsko aktivnost. Na podlagi dobljenih rezultatov smo zadetke ovrednotili z različnimi biofizikalnimi metodami, kot so diferenčna dinamična fluorimetrija (DSF), površinska plazemska resonanca (SPR) in mikrotermoforeza (MST). Na koncu smo s proteinsko kristalografijo določili tudi strukturo kompleksa med proteinom G24, ki predstavlja N-terminalni del podenote B, in najbolj učinkovitim zavircem, s čimer smo potrdili ustreznost našega modela za prepoznavanje novih potencialnih zaviralcev bakterijske giraze B z delovanjem na ATP-vezavno mesto. S to raziskavo smo prispevali k odkritju novih zaviralcev bakterijske giraze B iz novih strukturnih razredov ter s tem postavili odlično izhodišče za njihovo optimizacijo do novih protibakterijskih učinkovin, ki jih vsakodnevno potrebujemo za zdravljenje naraščajočega števila okužb.

Structure-Based Design of Novel DNA Gyrase B Inhibitors

MATJAŽ BRVAR, National Institute of Chemistry Ljubljana

Supervisor: Tomaž Šolmajer, National Institute of Chemistry Ljubljana

Co-supervisor: Andrej Perdih, National Institute of Chemistry Ljubljana

DNA gyrase is a bacterial enzyme from the family of topoisomerases involved in the circular DNA molecule replication cycle. Its role is the introduction of negative supercoils into the DNA molecule. It consists of two subunits A, with the DNA binding site, and two subunits B, possessing the ATP-ase activity. As it is present only in bacteria this enzyme represents a validated target for the design of novel antibacterials from the perspective of selective toxicity. Based on the available structural data of two groups of natural inhibitors, coumarins and cyclothialidines, several models were constructed and using *in silico* approach three different classes of DNA gyrase B inhibitors were discovered. Their activity was measured using fluorescence-based enzyme assay. *In vitro* antibacterial activity was determined for two classes. Based on the collected data, promising hits were further validated utilizing several biophysical techniques including differential scanning fluorimetry (DSF), surface plasmon resonance (SPR) and microscale thermophoresis (MST). Additionally, x-ray structure of the complex between the G24 protein and the most potent inhibitor was determined confirming the ability of our model to identify novel DNA gyrase B inhibitors. Our research contributed to the discovery of three novel classes of DNA gyrase B inhibitors making them a great starting point for further development to new antibacterials which are much needed for the treatment of increasing number of infections.

Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo

BILJANA GOVEDARICA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Stane Srčič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Miha Škarabot, Inštitut Jožef Stefan

Mehanske lastnosti definirajo obnašanje materialov ob obremenitvah in so izjemnega pomena za farmacevtsko-tehnološke procese, kot sta drobljenje in stiskanje. Mehanske lastnosti lahko proučujemo na makro-, mikro- in nanonivoju. Namen doktorske naloge je bil proučiti mehanske lastnosti farmacevtskih materialov na nivoju delcev ozziroma posameznih kristalov ter napovedovati njihovo obnašanje na razsežnostnem nivoju (angl. bulk), npr. vrste deformacij in mehansko obnašanje v procesu stiskanja ali pa lastnosti gelskih plasti ksantanskih ogrodnih tablet. Za glavnino eksperimentov smo uporabili mikroskop na atomsko silo (AFM) ter nanoindenter. Dokazali smo, da mehanske lastnosti delcev pomožnih snovi, kot so mikrokristalna celuloza, laktosa, koruzni škrob, natrijev klorid, izomalt ter kalcijev dihidrogen fosfat, dominantno kontrolirajo obnašanje materialov med procesom stiskanja in da na ta način lahko napovedujemo potek procesa tabletiranja. To potrjujejo rezultati korelačijskih študij, pri katerih je ugotovljena visoka linearna korelacija med parametromi plastičnosti na osnovnem in razsežnostnem nivoju, kot sta vtisna trdnost (H) in Walkerjev koeficient (W). Pri proučevanju polimernih dostavnih sistemov smo dokazali, da so lastnosti gelske plasti ksantanskih ogrodnih tablet, ki primarno kontrolirajo hitrost sproščanja zdravilne učinkovine, odvisne od fleksibilnosti ksantanskih verig, tj. perzistenčne dolžine in njihovega urejanja ozziroma orientiranja v prostoru.

Evaluation of Mechanical and Surface Properties of Pharmaceutical Materials and Products on a Single Particle Level by Atomic Force Microscopy

BILJANA GOVEDARICA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Stane Srčič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: Miha Škarabot, Jožef Stefan Institute

Mechanical characteristics are properties of materials under an applied stress and they are important for pharmaceutical processes such as milling and compaction. Mechanical attributes of materials can be measured on macro-, micro- and nanoscale. The main goal of the thesis was to predict compaction of pharmaceutical excipients according to their single mechanical characteristics as well as to estimate swelling properties of xanthan matrix tablets. The majority of observations and measurements were performed by using atomic force microscope (AFM) and nanoindenter. We found out that mechanical properties of the tablet's materials (microcrystalline cellulose, lactose, corn starch, sodium chloride, isomalt and calcium dihydrogenphosphate) to a great extent control and anticipate their deformational behavior during tabletting. This is based on the results, where strong linear relationships were observed between plasticity parameters on a single and the bulk scale such as indentation hardness and Walker coefficient. We successfully came to the conclusion that microscopic polymer properties, such as radius of gyration and persistence length, are responsible for macroscopic polymer behavior and gel layer properties in matrix tablets.

Strukturna optimizacija novih antitrombotičnih učinkovin z dvojnim delovanjem in njihov vpliv na angiogenezo

MILOŠ ILIĆ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: **Danijel Kikelj**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: **Janez Ilaš**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Srčno-žilne bolezni so vodilni vzrok obolenja in smrti v razvitih družbah. V klinični praksi se kombinacija antikoagulacijskih in antiagregacijskih zdravil pogosto uporablja za doseganje sinergije antitrombotičnega učinka, povezanega z zaviranjem trombina in antagonističnim delovanjem na fibrinogenski receptor. Kombinacija antikoagulantnega in antiagregatornega delovanja v eni sami molekuli predstavlja nov pristop k razvoju antitrombotičnih učinkovin, s katerim bi lahko izboljšali pomanjkljivosti obstoječega zdravljenja. Naš namen je bil povečati učinkovitost spojin s potencialnim dvojnim antitrombotičnim delovanjem in pridobiti boljši vpogled v odnos med strukturo in delovanjem. Zato smo izvedli strukturno optimizacijo znanih 1,4-benzoksazinov z dvojnim delovanjem in pripravili tudi serijo enantiomerno čistih analogov z 1,4-benzodioksinškim ogrodjem namesto 1,4-benzoksazinskega. Trombin in integrin GP IIa/IIIb igrata pomembno vlogo pri spodbujanju tumorske angiogeneze in metastaziranju. Zato smo že leli raziskati, ali naše potencialno dualne antithrombotične spojine, ki zaviralno delujejo na trombin, antagonistično pa na fibrinogenski receptor, zaviralno delujejo tudi na angiogenezo. Na osnovi izvedenih standardnih testov *in vitro* in *in vivo* za ugotavljanje antiangiogenega delovanja smo ugotovili, da so estri benzoksazinske in benzodioksinške serije močni zaviralci angiogeneze.

Structural Optimization of Novel Dual Antithrombotic Compounds and Their Effect on Angiogenesis

MILOŠ ILIĆ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: **Danijel Kikelj**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Co-supervisor: **Janez Ilaš**, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Thromboembolic disorders are still the leading causes of morbidity and mortality in developed societies. In clinical practice, a combination of anticoagulant and antiaggregatory drugs is frequently used to achieve an additive antithrombotic effect by suppressing both blood coagulation and platelet function. Combination of anticoagulant and antiplatelet activity in the same chemical entity, indicate a possibility to develop novel beneficial types of antithrombotic drugs. In order to enhance dual antithrombotic activity and obtain better information about the structure-activity relationship, we have performed structural optimization of already known 1,4-benzoxazine dual antithrombotic compounds and synthesized enantiomeric pure analogs with 1,4-benzodioxin central scaffold instead of 1,4-benzoxazine core. Thrombin and GP IIa/IIIb play important role in angiogenesis and metastasis. Therefore, we investigated whether our dual antithrombotic compounds with thrombin inhibitory and platelet antiaggregatory activity are endowed with antiangiogenic activity by inhibition of thrombin and by binding on fibrinogen receptor. Based on *in vitro* and *in vivo* antiangiogenic tests, it was found out that the esters with 1,4-benzoxazine and 1,4-benzodioxin central scaffold are potent inhibitors of angiogenesis.

Razvoj metod in vrednotenje lokalnih karakteristik toka trdnih delcev v vrtinčnoslojnih napravah za oblaganje ter njihov vpliv na enakomernost obloge delcev

MATEVŽ LUŠTRIK, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Stane Srčič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Zaradi možnosti izdelave velikih količin produkta in tvorbe kakovostnih oblog za oblaganje delcev pogosto uporabljamo naprave, ki temeljijo na tehnologiji z vrtinčenjem. V doktorski disertaciji smo ovrednotili vpliv različnih konstrukcijskih modifikacij vrtinčnoslojne opreme za oblaganje delcev na enakomernost nanosa oblage, izkoristek procesa in stopnjo tvorbe aglomeratov. Z ukrivljeno porazdelitveno ploščo na dnu procesne naprave v primerjavi s klasično Wursterjevo komoro dosežemo boljše izkoristke in zmanjšamo tvorbo aglomeratov. Z vgradnjem generatorja vrtinčnega toka smo izboljšali enakomernost nanosa oblage po površini delcev v primerjavi s klasično komoro, ne glede na začetno porazdelitev velikosti delcev. Z vgradnjem obroča z režami, prek katerih smo v spodnji del komore, tik nad porazdelitveno ploščo, uvajali zrak, smo izboljšali enakomernost nanosa oblage. Z vgradnjem porazdelitvenih lamel v klasično in z generatorjem vrtinčnega toka opremljeno komoro smo zmanjšali tvorbo mehurčkastega toka in mešanje delcev v spodnjem delu naprave. Izdelali smo meritno napravo, s katero smo določili območja značilnih frekvenc trkov pelet in porazdelitev gostote delcev znotraj razmejitvenega valja klasične in z generatorjem vrtinčnega toka opremljene komore. Sklepamo lahko, da do odstopanj v porazdelitvi količine oblage delcev, obloženih v klasični ali modificirani komori, pride zaradi lokalnih razlik v gibanju delcev.

Development of Methods and Evaluation of Solid Particle Local Characteristic in the Fluid-Bed Coaters and Their Influence on Patricle Coating Uniformity

MATEVŽ LUŠTRIK, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Stane Srčič, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

The fluid bed coaters are common for particle coating, due to production of high batch quantities and uniformly coated particles. In our research work the influences of different construction modifications of conventional Wurster process chamber on the coating uniformity, yield and degree of agglomeration, were evaluated. Funnel-shaped distribution plate was found to improve process yield and decreased the degree of agglomeration at selected process parameters. The distribution plate fitted with the swirl airflow generator was tested and more uniform deposition of the coating material, compared to a conventional coating process, was achieved, regardless the particle size distribution. The implementation of tangentially oriented air intake slots, enabling the introduction of air directly above the distribution plate, resulted in improved coating uniformity. The distribution lamellas installed in conventional and swirl generator equipped coating chamber, decreased bubble formation and mixing of particle in the annular region. Piezoelectric based probe for determination of characteristic frequencies of particle impacts and particle number density profiles inside the draft tube of conventional and swirl generator equipped coating chamber was developed. Difference in particle number density profiles for both process chambers can be understood as the underlying cause for difference in performance of both process chambers.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje diazenov ter njihovih analogov kot možnih inhibitorjev nekaterih encimov

VITA MAJCE, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Slovenko Polanc, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Stanislav Gobec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

V okviru doktorske disertacije sem sintetizirala diazene in njim sorodne ogljikove analoge ter primerjala njihovo kemijsko in biološko (re)aktivnost. Pripravila sem diazenkarboksamide in diazendikarboksamide ter njihove C=C analoge cinnamamide in fumaramide. Za pripravo nesimetričnih fumardiamidov sem optimizirala novo pot, pri kateri sem maleinamide izomerizirala ($Z \rightarrow E$) pri segrevanju pod mikrovalovi ob dodatku katalitske količine piperidina. Maleinamide sem s katalitskim hidrogeniranjem pretvorila v sukcinamide; pri pripravi rigidnih analogov pa sem izhajala iz 3-aminobenzojske kisline. Spojine z reaktivnim fragmentom CH=CH-COOR sem nato uporabila za ciklizacije z 1,2-fenylediaminom, pri katerih glede na 2D NMR-spektre intermediatov sklepam, da nastanejo benzodiazepini. Pri sintezi sem si pomagala s sidranjem spojin v aktivno mesto esencialnega bakterijskega encima D-alanin-D-alanine ligaze (Ddl), na katerem sem vse sintetizirane spojine tudi testirala. Diazeni so se pokazali za preveč reaktivne, pri njihovih C=C analogih pa je bila ta reaktivnost zelo zmanjšana, saj v večini primerov niso inhibirali ne Ddl ne drugih encimov. Pri spojinah z zmerno aktivnostjo je slaba topnost v vodnem mediju onemogočala določanje vrednosti IC₅₀. Odkrila sem dva nizkomikromolarna inhibitorja encimov Ddl in VanA. S testiranjem analogov kombretastatinov na encimih COX pa sem odkrila nekaj dobro aktivnih in selektivnih inhibitorjev COX-2.

Design, Synthesis and Evaluation of Diazenes and Their Analogues as Potential Inhibitors of Some Enzymes

VITA MAJCE, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Slovenko Polanc, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Stanislav Gobec, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

In my dissertation I synthesized diazenes and their carbon counterparts and compared their chemical and biological (re)activity. I prepared diazenecarboxamides and diazenedicarboxamides and their C=C analogues cinnamamides and fumaramides. I optimized a new route for the synthesis of non-symmetrical fumaramides starting from maleamides, which isomerized upon heating under microwave conditions in the presence of catalytic amounts of piperidine. With catalytic hydrogenation of maleamides I prepared succinamides, while rigid analogues were synthesized starting from 3-aminobenzoic acid. Compounds with the reactive fragment CH=CH-COOR were used for cyclizations with 1,2-phenylenediamine that, based on the 2D NMR spectra of intermediates, yielded benzodiazepines. During synthetic work I docked the compounds in the active site of essential bacterial enzyme D-alanine-D-alanine ligase (Ddl), on which I also tested all synthesized compounds. Diazenes were shown to be too reactive, while in their C=C analogues this reactivity appears to be greatly reduced, as in most cases they did not inhibit neither Ddl, nor other enzymes. With compounds that have shown some moderate activity, the solubility in aqueous media was too low to enable the measurement of IC₅₀ values. I found two low-micromolar inhibitors of both Ddl and VanA. By testing combretastatin analogues on COX enzymes I found some moderately active and COX-2 selective inhibitors.

NMR-študije konformacij in interakcij funkcionaliziranih indolov kot anionskih receptorjev

DAMJAN MAKUC, Kemijski inštitut Ljubljana
Mentor: Janez Plavec, Kemijski inštitut Ljubljana

S pomočjo heteronuklearne NMR-spektroskopije in kvantnomehanskih izračunov smo študirali konformacijsko predorganizacijo anionskih receptorjev na osnovi indolnega obroča in njihove konformacijske spremembe po dodatku anionov. V prvi skupini teh spojin je indolni skelet funkcionaliziran s kombinacijo amidne in (tio)sečinske skupine na mestih C2 in C7. NOE-eksperimenti so pokazali, da v raztopini acetona- d_6 ob odsotnosti anionov prevladuje konformacija *anti-anti* vzdolž vezi C2–C2 α in C7–N7 α . Po vezavi anionov na receptor v raztopini prevladuje konformacija *sin-sin*. Druga skupina receptorjev vsebuje dodatni indolni obroč. Na podlagi NOE-ojačitev sklepamo, da je prevladujoča konformacija diindolil(tio)sečnin v raztopini DMSO- d_6 v odsotnosti anionov vzdolž vezi C7–N7 α *anti-anti*. Spremembe kemijskih premikov ob dodatku kloridnih anionov kažejo na njihovo šibko vezavo. Ob dodatku okso anionov smo opazili močno odsenčenje sečinskih, kar kaže na to, da se anioni preferenčno vežejo na sečinske NH-skupine. Ob vezavi okso anionov je posledično prišlo do konformacijskih sprememb vzdolž vezi C7–N7 α , tako da za komplekse anion–receptor prevladuje konformacija *sin-sin*. Konformacijske spremembe funkcionaliziranih indolov in diindolil(tio)sečnin ob vezavi anionov se dobro ujemajo z izračunanimi *ab initio* energetskimi preferencami.

NMR Conformational Studies on Interactions of Functionalized Indoles as Anion Receptors

DAMJAN MAKUC, National Institute of Chemistry Ljubljana
Supervisor: Janez Plavec, National Institute of Chemistry Ljubljana

The conformational preorganization and anion-induced conformational changes of indole-based receptors have been studied by a combination of heteronuclear NMR spectroscopy and quantum mechanical calculations. In the first group of receptors, a single indole scaffold has been functionalized with a variety of amide and (thio)urea moieties at C2 and C7. NOE enhancements showed that *anti-anti* conformation across C2–C2 α and C7–N7 α bonds is preferred in an acetone- d_6 solution in the absence of anions. Upon anion binding to receptors, *syn-syn* conformation becomes predominant. The second group of receptors exhibited an extra indole group. NOE experiments showed that the *anti-anti* conformer along the C7–N7 α bonds was favored for diindolyl(thio)ureas in DMSO- d_6 solution in the absence of anions. Anion-induced ^1H and ^{15}N chemical shift changes suggested weak binding of chloride anions. Strong deshielding of the ureido protons has been observed upon addition of oxoanions, which indicates that the predominant hydrogen bond interactions occurred at urea NH groups. Binding of oxoanions caused conformational changes along the C7–N7 α bonds and the *syn-syn* conformer was preferred for anion–receptor complexes. The conformational changes in functionalized indoles and diindolyl(thio)ureas upon anion binding are in good agreement with the energy preferences established by *ab initio* calculations.

Reakcije fenolov s tetraalkilamonijevimi solmi in sinteza 3-acetamido- β -rezorcinskih kislin s prilagojeno Kolbe-Schmittovo reakcijo

NENAD MARAŠ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Marijan Kočevar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Raziskava je bila osredotočena na kemijo fenolov in v prvem sklopu predstavlja izsledke študij reakcij alkiliranj z različnimi kvartarnimi amonijevimi solmi. O-metiliranje fenolov s tetrametilamonijevim kloridom se je pokazalo kot uporabna metoda za sintezo anizolov. Predvsem se je za zanimivo pokazala sinteza 1,4-dialkilpiperazinov na osnovi alkiliranja fenolov in drugih nukleofilov z 1-alkil-4-aza-1-azoniabiciklo[2.2.2]oktani. To sintezo je možno izvesti po *one-pot* postopku iz ustreznega fenola, alkil halogenida ali *in situ* aktiviranega alkohola, ter 1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktana (DABCO). Takšen pristop omogoča preprosto modularno sintezo piperazinov s potencialnim biološkim delovanjem. Drugi sklop raziskav predstavlja uporabo različice Kolbe-Schmittove reakcije v sintezi 3-acetamido- β -rezorcinskih kislin (tj. antibiotiku platensimicinu podobnih spojin). Pripravljena je bila vrsta spojin kot kandidatov za biološko testiranje. Tretji sklop je študija sintezne metode ciklokondenzacije karboksilnih kislin v 2-substituirane benzimidazole, ki temelji na katalizi z borovo kislino. Na osnovi rezultatov je predlagan katalitski cikel. Sintezna metoda, katere novost je v tem, da kondenzacija poteka pod skoraj nevtralnimi pogoji, je bila uporabljena za pripravo večjega števila benzimidazolov.

Reactions of Phenols with Tetraalkylammonium Salts and the Synthesis of 3-Acetamido- β -Resorcylic Acids with a Modified Kolbe-Schmitt Reaction

NENAD MARAŠ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Marijan Kočevar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

The research was focused on the chemistry of phenols, primarily on their alkylation using various quaternary ammonium salts. The O-methylation with tetramethylammonium chloride was found to be a practical method for the synthesis of anisols. The synthesis of 1,4-dialkylpiperazines based on the alkylation of phenols and other nucleophiles with 1-alkyl-4-aza-1-azoniabicyclo[2.2.2]octanes is particularly promising. This synthesis can be performed using a one-pot methodology from a phenol, an alkyl halide or an *in situ* activated alcohol, and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). Such an approach allows for a simple modular synthesis of potentially biologically active piperazines. The second study describes the use of a modified Kolbe-Schmitt reaction in the synthesis of 3-acetamido- β -resorcinic acids (as platensimycin analogues with potential antibiotic activity). A library of compounds as candidates for biological tests was prepared. The third study is the development of a cyclocondensation method for the synthesis of 2-substituted benzimidazoles based on the boronic acid catalysis. The main novelty of this synthetic method is that the condensation occurs under nearly neutral conditions. Its scope is demonstrated by the synthesis of a large number of benzimidazoles. The results enabled the elucidation of the catalytic cycle.

Kontrola kakovosti trdih farmacevtskih izdelkov s strojnim vidom

MIHA MOŽINA, *Sensum, d. o. o.*

Mentor: Dejan Tomaževič, *Sensum, d. o. o., Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani*

Ključni ukrep za zagotavljanje kakovosti je kontrola kakovosti, ki vključuje spremljanje vhodnih, vmesnih in končnih izdelkov ter izločanje neustreznih izdelkov. Bistvo kontrole kakovosti je merjenje različnih parametrov kakovosti in vrednotenje izdelkov glede na izmerjene parametre. Eden od bistvenih parametrov kakovosti farmacevtskih izdelkov je videz, ki je pomemben v funkcionalnem in estetskem smislu. Kljub temu so postopki merjenja in dovoljena odstopanja slabo definirani. Doktorsko delo se osredotoča na vizualno kontrolo trdih farmacevtskih izdelkov s sistemi s strojnim vidom, ki omogočajo avtomatsko stootstveno ali statistično vizualno kontrolo, so objektivni, ponovljivi, časovno konstantni, hitri in ponujajo veliko možnosti uporabe. Načrtovanje in razvoj sistemov za avtomatsko vizualno kontrolo kakovosti v farmaciji sta zahtevna postopka zaradi velikega obsega proizvodnje ter strogih zahtev po kakovosti in raznolikem videzu farmacevtskih izdelkov. Ti izdelki so namreč lahko različno veliki, imajo različno obliko, barvo in oznake. Videz izdelka, ki je ključen za avtomatsko kontrolo izdelkov, je odvisen tudi od sistema strojnega vida, predvsem od svetila in optičnih gradnikov. Ugotovitve tega raziskovalnega dela združujejo razvoj in vrednotenje postopka za razgradnjo slik v realnem času za namen vizualne kontrole kakovosti farmacevtskih izdelkov, razvoj postopka za kontrolo kakovosti oznak farmacevtskih tablet ter razvoj sistema za spremljanje procesa oblaganja pelet.

Quality Control of Solid Dose Products Using Machine Vision Systems

MIHA MOŽINA, *Sensum, d. o. o.*

Supervisor: Dejan Tomaževič, *Sensum, d. o. o., Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana*

Quality control with the goal of ensuring final product quality is one of the key quality assurance procedures. It is based on measurements of quality parameters of input materials and final products, and their assessment according to the measured parameter values. One of the key quality parameters of pharmaceutical products is their visual appearance. Improper visual appearance can be a functional defect, a defect that adversely affects product's identification or just a cosmetic defect. Nevertheless, the methods and deviations of visual appearance are poorly defined. In this dissertation, we have focused on visual control of solid dose products with machine vision systems, which enable 100% automated or statistical visual control and are objective, precise, time invariant, fast, and can be used for a number of different measurements. Design and development of automated visual inspection systems for solid dose products is an especially challenging task due to high capacities of pharmaceutical production, high quality demands and large diversity of product appearances, as they come in different sizes, shapes, colors and have different imprints. In addition, product appearance, which is critical for automated visual inspection, also depends on the inspection system itself, especially on the illumination and other optical elements. The main contribution of this work are the development and validation of a real-time image segmentation method for visual inspection of pharmaceutical tablets, the development of a method for automated visual inspection of imprint quality of pharmaceutical tablets and the development of a machine vision system for pellet coating process monitoring.

Uporaba superparamagnetnih nanodelcev za magnetofekcijo reporterskih in terapevtskih genov v celice, mišice in eksperimentalne tumorje miši

SARA PRIJIČ, Nanotesla institut

Mentor: **Gregor Serša**, Onkološki inštitut Ljubljana

Genska terapija raka s spodbujanjem imunskega odziva je zdravljenje z nukleinskimi kislinami z zapisom za proteine, ki stimulirajo imunski odziv zoper tumor. Magnetofekcija je vnos nukleinskih kislin v celice z magnetnimi nanodelci, izpostavljenimi magnetnemu polju. Pripravili smo superparamagnetne nanodelce železovega oksida (SPIONs), oplaščene in funkcionalizirane z dvojnim slojem endosomolitičnih polimerov, poliakrilno kislino (PAA) in polietileniminom (PEI). Na SPIONs-PAA-PEI smo prek elektrostatskih interakcij vezali plazmidno DNA z vključenim reporterskim genom za zeleni fluorescenčni protein (pDNAGFP) ozziroma terapevtskim genom za citokin interlekin-12 (pDNAIL-12). Biokompatibilni SPIONs so primerni vektorji za vnos nukleinskih kislin z magnetofekcijo v celice in tumorje, ne pa tudi v skeletne mišice. Učinkovitost magnetofekcije celic in tumorjev s pDNAGFP ozziroma pDNAIL-12, vezano na SPIONs-PAA-PEI, je večja od učinkovitosti magnetofekcije s komercialno dostopnimi magnetnimi nanodelci ozziroma lipofekcije ter primerljiva z električno posredovanim vnosom. Glede na to, da je protitumorski učinek po magnetofekciji tumorjev s SPIONs-PAA-PEI-pDNAIL-12 primerljiv s tistim po električno posredovanem vnosu, katerega varnost in učinkovitost se že preverjata v kliničnih študijah, ima tudi magnetofekcija izredno velik potencial za prenos v kliniko za gensko terapijo raka s spodbujanjem imunskega odziva.

The Use of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetofection of Reporter and Therapeutic Genes into Cells, Muscles and Experimental Tumors in Mice

SARA PRIJIČ, Nanotesla Institut

Supervisor: **Gregor Serša**, Institute of Oncology Ljubljana

Cancer immuno-gene therapy is a treatment using nucleic acids encoding immunostimulatory proteins to stimulate an immune response against a tumor. Magnetofection is a transfection based on binding of nucleic acids onto magnetic nanoparticles with subsequent exposure to magnetic field. We synthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), coated and functionalized with a double layer of endosomolytic polymers, polyacrylic acid (PAA) and polyethylenimine (PEI). Onto SPIONs-PAA-PEI we bound plasmid DNA carrying reporter gene for green fluorescent protein (pDNAGFP) or therapeutic gene for cytokine interlekin-12 (pDNAIL-12). Biocompatible SPIONs are suitable vectors for gene delivery via magnetofection into cells and tumors, but not into skeletal muscles. Magnetofection of cells and tumors with pDNAGFP or pDNAIL-12 bound to SPIONs-PAA-PEI, was superior in transfection efficiency to commercially available SPIONs or lipofection, and comparable to electrically-mediated transfer. Antitumor effect was after magnetofection with pDNAIL-12, bound to SPIONs-PAA-PEI, comparable to that of electrically-mediated transfer. The results of our study show that magnetofection of tumors using SPIONs-PAA-PEI-pDNAIL-12 holds great potential for the further refinement aimed at cancer immuno-gene therapy since the safety and efficacy of correspondingly efficient electrically-mediated transfer is already being tested in clinical studies for gene therapy.

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje inhibitorjev D-aspartat ligaze in D-alanyl-D-alanin ligaze

VERONIKA ŠKEDELJ, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Mentorica: Anamarija Zega, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Za preživetje bakterij je ključnega pomena integriteta strukture njihove celične stene, za kar bakterije poskrbijo tako, da sintetizirajo rigidno strukturo, imenovano peptidoglikan, ki je značilen le za prokariotske celice. Zato je poseganje v mehanizem biosinteze peptidoglikanskega sloja ena izmed pomembnih in še precej neizkoriščenih strategij za razvoj protibakterijskih učinkovin. V okviru doktorskega dela smo se posvetili dvema bakterijskima encimoma, D-aspartat ligazi in D-alanyl-D-alanin ligazi, ki sta del zapletenega in za bakterijo značilnega procesa sinteze peptidoglikanskega dela celične stene. Obe ligazi sta od ATP odvisna encima, kar nam omogoča načrtovanje novih potencialnih zaviralcev obeh encimov, ki bi se vezali na ATP-vezavno mesto encima. Ker je D-aspartat ligaza (Asl_{fm}) še sorazmerno neraziskan encim, smo najprej razvili postopek izolacije rekombinantnega encima Asl_{fm} , postavili spektrofotometrični encimski test ter poiskali model kinetičnega mehanizma Asl_{fm} . Z rešetanjem manjše banke že znanih ATP-kompetitivnih inhibitorjev bakterijskih encimov smo odkrili prve do sedaj znane inhibitorje encima Asl_{fm} , ki zavirajo delovanje tarčnega encima v nizkem mikromolarnem območju, s pomočjo postavitve farmakofornega modela in virtualnega rešetanja pa nam je uspelo dobiti tudi nov strukturni tip inhibitorjev encima Asl_{fm} . Z rešetanjem iste banke spojin in nadaljnjo optimizacijo smo prišli tudi do novega tipa ATP-kompetitivnih inhibitorjev encima DdlB. Dobljene inhibitorje obeh tarčnih encimov smo biofizično ovrednotili z metodama površinske plazmonske resonance in izotermne titracijske kalorimetrije. Predstavljeni delo je temelj za nadaljnjo optimizacijo zaviralcev Asl_{fm} in DdlB z izboljšano protibakterijsko aktivnostjo.

Design, Synthesis and Evaluation of Inhibitors of D-Aspartate Ligase and D-Alanyl-D-Alanine Ligase

VERONIKA ŠKEDELJ, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana
Supervisor: Anamarija Zega, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Integrity of bacterial cell wall structure is of crucial importance for the survival of bacteria, which bacteria maintain with the synthesis of a rigid structure, called peptidoglycan that is exclusive to prokaryotic cells. Therefore, interference with the mechanism of peptidoglycan biosynthesis represents one important and still quite unexploited strategy for the development of antibacterial drugs. We have worked on two bacterial enzymes, namely D-alanyl-D-alanine ligase and D-aspartate ligase, which are involved in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. Both ligases are ATP-dependent enzymes and therefore enable the design of new potential inhibitors of both enzymes, which would target the ATP-binding site. Since D-aspartate ligase (Asl_{fm}) is still relatively unexplored enzyme, we developed a procedure for the isolation of recombinant Asl_{fm} , a spectrophotometric enzymatic test and searched for a kinetic model of Asl_{fm} . We discovered the first known low micromolar inhibitors of Asl_{fm} by screening the small library of bacterial ATP-competitive inhibitors. A new structural type of Asl_{fm} inhibitors was also discovered by a generated pharmacophore model and virtual screening. By re-screening the bank and additional optimization we also discovered new ATP-competitive inhibitors of DdlB. The discovered inhibitors of both target enzymes were additionally characterized by surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. Presented work is a good foundation for further optimization of Asl_{fm} and DdlB inhibitors with improved antibacterial activity.

Razvoj monolitnih kolon in metod za odstranjevanje proteinov iz bioloških vzorcev in določevanje virusnih delcev

LIDIJA URBAS, BIA Separations, d. o. o.

Mentor: Aleš Štrancar, BIA Separations, d. o. o.

Somentor: Boris Pihlar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Monolitni kromatografski nosilci se zaradi svoje zgradbe in konvektivnega masnega prenosa snovi uporabljajo za ločevanje in čiščenje biomolekul, kot so virusi, virusom podobni delci ter plazmidna DNA. Ker gre za molekule, ki se uporabljajo kot cepiva ali kot virusni vektorji v genskih terapijah, sta njihova čistost in učinkovitost v končnem produktu zaključnih procesov čiščenja ključnega pomena. V okviru doktorskega dela smo razvili kromatografsko metodo za določevanje celega virusa gripe na CIM-kationsko izmenjevalni monolitni koloni. Raziskali smo parametre, ki vplivajo na izkoristek vezave virusa, in ugotovili, da sta ključnega pomena gostota ionsko izmenjevalnih skupin na nosilcu in premer por nosilca. Koncentracija virusa gripe se lahko določa tudi posredno prek koncentracije hemaglutinina, proteina, ki se nahaja na beljakovinski ovojnici virusa gripe. V ta namen smo razvili metodo in monolitno kolono na osnovi hidrofobne stacionarne faze, s katero lahko določamo različne seve in podtipe virusa, primerna pa je tudi za določanje virusa v cepivih iz podenot. V drugem delu doktorske disertacije smo na monolitnih ionsko izmenjevalnih kolonah razvili metodo za čiščenje virusu podobnih delcev adenovirusa tipa 3 (Ad3 VLP), ki so bili proizvedeni v bakulovirusnem ekspresijskem sistemu v insektnih celicah. Ad3 VLP so ohranili biološko sposobnost prodiranja v celice, proces čiščenja pa se je skrajšal s petih dni na samo en dan.

Development of Monolithic Columns for the Isolation of Proteins from Biological Samples and the Determination of Virus Particles

LIDIJA URBAS, BIA Separations, d. o. o.

Supervisor: Aleš Štrancar, BIA Separations, d. o. o.

Co-supervisor: Boris Pihlar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Due to their structure and convective mass transport monolithic chromatographic supports are suitable for the purification and separation of biomolecules e.g. viruses, virus-like particles and plasmid DNA. Since these molecules are applied as vaccines or viral vectors for gene therapy, it is crucial that the final products after the purification process remain biologically active and reach an appropriate level of purity. In this work a chromatographic method for the determination of the influenza virus using a CIM monolithic cation exchange column was developed. Parameters that effect recovery of the virus from the column were examined and ligand density of the ion-exchange groups and pore size of the media were proven to be crucial. The concentration of the virus can be determined also via haemagglutinin, a protein present on the lipid envelope of the virus. For this purpose, a method and a column based on hydrophobic monoliths were developed. With this method we were able to determine different strains and subtypes of the influenza virus as well as the concentration in the split vaccines. In the second part of this work a method for purification of adenovirus 3 virus-like particles (Ad3 VLP) expressed in a baculovirus/insect cell system was developed. Purified Ad3 VLP retained their morphology and penetration capacity and purification process was shortened from five to just one day.

Kombinatorna sinteza 4-(1-fenil-5-oksopirolidin-3-il) pirimidin-5-karboksamidov

BOJANA ČRČEK, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Mentor: Jurij Svetec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

2-[(hetero)aryl]ethylamines, kot so na primer dopamin, histamin, triptamin, serotonin in melantonin, so reprezentativni prenašalci kemijskih signalov v bioloških procesih, ki potekajo v telesu. Zaradi te vloge je sinteza njihovih novih analogov v medicinski in sintezi organski kemiji ključnega pomena. S klasično sintezo smo v več stopnjah prek pretvorbe ustreznegra enaminona iz pirolidinona pripravili 2-substituirani 4-(1-fenil-5-oksopirolidin-3-il)pirimidin-5-karboksilni kislini. V prvem primeru je bil substituent na kislini fenilna skupina, v drugem primeru pa metilna skupina. Sledila je paralelna sinteza karboksamidov, pri čemer smo kislini aktivirali z uporabo bis(pentafluorofenil)karbonata (BPC). Uporabili smo dvanajst različnih aminov in uspešno pripravili knjižnico 24 karboksamidov.

Combinatorial Synthesis of 4-(5-Oxo-1-Phenylpirrolidine-3yl) Pyrimidine-5-Carboxamides

BOJANA ČRČEK, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana
Supervisor: Jurij Svetec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

2-[(hetero)aryl]ethylamines, such as dopamine, histamine, tryptamine, serotonin, and melatonin are representatives of chemical messengers, which are playing a crucial role in biological processes. Therefore the preparation of libraries of their novel synthetic analogues is of a particular interest and represents an important target in medicinal, synthetic organic, and combinatorial chemistry. 2-substituted 4-(5-oxo-1-phenylpirrolidine-3-yl)pyrimidine-5-carboxylic acids were prepared classically from pyrrolidinone in several-step synthesis via suitable enaminone derivative. In the first case, the phenyl group and in the second case, methyl group was used as a substituent on carboxylic acid. Carboxamides were then synthesized in a parallel manner. Both acids were activated with bis(pentafluorophenyl)carbonate (BPC) and treated with various primary and secondary amines. Twelve amines were used and a library of 24 carboxamides was successfully prepared.

Vpliv pufrskih sistemov na topnost izbranih soli naproksena in ciprofloksacina pri konstantnem pH

TADEJ DOLENC, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Franc Vrečer, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Krka, d. d., Novo mesto

Somentor: Darko Uršič, Krka, d. d., Novo mesto

Namen diplomske naloge je bil raziskati vpliv pufrske kapacitete, ionske moči, ionske sestave pufra in natehtanega odmerka zdravilne učinkovine na topnost natrijevega naproksenata in ciprofloxacinovega klorida v različnih pufrih z isto pH-vrednostjo. Topnost smo določali s klasično saturacijsko metodo stresanja bučke. Ugotovili smo, da je bila topnost obeh zdravilnih učinkovin zaradi večje spremembe končnega pH po dodatku zdravilne učinkovine večja v pufrih z manjšo kapaciteto. Rezultati so pokazali, da je bila topnost obeh izbranih soli povečana v pufrih z večjo ionsko močjo in da se je topnost natrijevega naproksenata povečala kljub dodatku skupnih natrijevih ionov. Pokazali so tudi, da sta topnost in čas za doseglo ravnotežnega stanja odvisna tudi od odmerka zdravilne učinkovine. Rezultati naloge so še nakazali, da je pomembno določiti obliko neraztopljene zdravilne učinkovine, ki je v ravnovesju po doseženem ravnovesnem stanju, saj se je prvotna oblika lahko pretvorila v drugo, slabše topno obliko.

The Influence of Buffer Systems on Solubility of Selected Salts of Naproxen and Ciprofloxacin at Constant pH

TADEJ DOLENC, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Co-supervisor: Darko Uršič, Krka, d. d., Novo mesto

The aim of our study was to investigate the influence of buffer capacity, ionic strength and composition of the buffer and the quantity of the active substance on the solubility of naproxen sodium and ciprofloxacin chloride in different buffers with the equal pH value. Solubility was determined by conventional saturation shake-flask method. We found out that the solubility in buffers with lower capacity was greater due to bigger changes in pH after addition of the solute. Solubility of both selected salts was higher in buffers with higher ionic strength. We showed that even though common sodium ions were added, the solubility of naproxen sodium increased due to the increase of ionic strength. We also showed that the solubility and equilibrium time depend on the quantity of selected salt. In this work we also demonstrated the importance of determining the form of excess of solid solute, which is in equilibrium with dissolved solute after reaching steady state. The original form of the solute was converted into other, less soluble form.

Vpliv pogojev kristalizacije na izbrane lastnosti delcev modelne zdravilne učinkovine

ALEŠA DULAR, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Franc Vrečer, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Krka, d. d., Novo mesto

Somentorica: Polona Bukovec, Krka, d. d., Novo mesto

Pogoji kristalizacije vplivajo tako na notranjo strukturo kristalov kot tudi na njihovo zunanjo obliko, kar povzroči različne fizikalno-kemijske lastnosti substance. Namen naloge je bil proučiti vpliv kristalizacijskega topila in načina kristalizacije na izbrane fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine. Z rentgensko praškovno difrakcijo in DSC-analizo smo najprej dokazali, da imajo kristali naših vzorcev enako notranjo strukturo, rezultati analize porazdelitve velikosti delcev, BET-analize ter opazovanja z optičnim in elektronskim mikroskopom pa so pokazali, da imajo pripravljeni kristali različno zunanjo obliko, velikost delcev in specifično površino. S preizkusi raztapljanja smo žeeli določiti predvsem vpliv polarnosti kristalizacijskega topila na hitrost raztapljanja. Rezultati vrednotenja s pretočno celico so pokazali, da se najhitreje raztaplja vzorec, prekristaliziran iz bolj polarnega topila, rezultati določanja intrinzične hitrosti raztapljanja, na katero velikost delcev in specifična površina vzorcev nimata vpliva, pa so pokazali, da se najhitreje raztaplja vzorec, pripravljen iz bolj nepolarnega topila. Pri preiskovanju monokristalov, pripravljenih iz izbranih topil, z mikroskopom na atomsko silo je spremljanje raztapljanja ploskve kristala z največjo površino pokazalo, da se najhitreje raztaplja kristal, pripravljen iz bolj polarnega topila. Vpliva polarnosti prekristalizacijskega topila na hitrost raztapljanja nismo mogli povsem pojasniti.

The Influence of Crystallisation Conditions on Selected Properties of Model Active Ingredient Particles

ALEŠA DULAR, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Franc Vrečer, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Krka, d. d., Novo mesto

Co-Supervisor: Polona Bukovec, Krka, d. d., Novo mesto

Crystallization conditions affect both the crystal form and the crystal habit. The purpose of the study was to examine the influence of a crystallization solvent and a method of crystallization on selected physicochemical properties of a model active ingredient. First, X-ray powder diffraction and DSC analysis indicated that the crystals from the prepared samples have the same crystal form. Despite this fact, the analysis of the particle-size distribution, BET analysis and observations of the samples with an optical and electron microscope demonstrated that our samples had different habit, particle size distribution and specific surface area. Dissolution experiments are intended to determine the influence of polarity of a crystallization solvent on the dissolution rate. The results of the flow-through cell dissolution suggest that a sample crystallized from a more polar solvent reached a higher dissolution rate, however determination of the intrinsic dissolution rate, which is not affected by the specific surface area and the particle size, shows that a sample from a less polar solvent dissolves the fastest. The dissolution analysis of the largest crystal plane of single crystals made from the selected solvents with the atomic force microscopy suggests that the crystal made from a more polar solvent dissolved faster, so the influence of polarity of a crystallization solvent on the dissolution rate cannot be fully explained.

NMR-struktura G-kvadrupleksa iz genoma človeškega papilomskega virusa

MAJA MARUŠIČ, Kemijski inštitut Ljubljana
Mentor: Janez Plavec, Kemijski inštitut Ljubljana

Z gvanini bogata zaporedja DNA lahko tvorijo G-kvadruplekse – helične strukture, v katerih so s Hoogstenovimi vodikovimi vezmi med seboj povezane štiri verige DNA. Osredotočili smo se na z gvanini bogato zaporedje iz genoma človeškega papilomskega virusa (HPV) tipa 52. Okužbe z nekaterimi tipi HPV lahko povzročijo predrakave in rakave spremembe, zato je zanimanje za razvoj specifičnega zdravila proti HPV veliko. Eden izmed pristopov bi lahko bil stabilizacija z gvanini bogatih zaporedij v regulatornih regijah genoma HPV, kar bi lahko vplivalo na podvajanje in prepisovanje genov ali celotnega genoma HPV. Cilj raziskave je bil določiti prostorsko strukturo visoke ločljivosti G-kvadrupleksa iz genoma HPV tipa 52. S pomočjo jedrske magnetne rezonance smo ugotovili, da zaporedje iz genoma HPV tipa 52 v prisotnosti ionov K^+ tvori G-kvadrupleks. Za nedvoumno določitev resonanc imino protonov smo posneli dušikove 1D $^{15}N\text{-}^1H$ HSQC spektre ^{15}N označenih oligonukleotidov. S pomočjo 2D-spektrov $^{13}C\text{-}^1H$ JRHMBC smo določili nedvoumno asignacijo H8 protonov gvaninov. Asignacija neizmenljivih protonov je potekala s pomočjo 2D-spektrov DQF-COSY, NOESY in TOCSY. Ugotovili smo, da zaporedje iz genoma HPV tipa 52 tvori G-kvadrupleks s tremi vzporednimi in eno antiparalelno verigo, povezujejo pa jih propellerska, diagonalna in robna zanka, dolga dva, pet in tri nukleotide. Prostorska struktura z atomsko resolucijo 3+1 G-kvadrupleksa iz genoma HPV tipa 52 omogoča načrtovanje specifičnih ligandov, ki bi lahko vplivali na izražanje genov HPV 52.

NMR Structure of a G-Quadruplex from Human Papilloma Virus Genome

MAJA MARUŠIČ, National Institute of Chemistry Ljubljana
Supervisor: Janez Plavec, National Institute of Chemistry Ljubljana

Guanine rich DNA sequences can form helical structures called G-quadruplexes where Hoogsten hydrogen bonds connect four DNA chains. Our work was focused on guanine rich sequence from human papillomavirus (HPV) type 52 genome. There is a growing interest in developing HPV specific therapeutic agents, because infections with certain types of HPV can lead to the development of precancerous warts and cancer. One of the approaches could be ligand induced stabilization of guanine rich sequences in regulatory regions of HPV genome that could down-regulate replication and transcription of HPV genome. Our aim was to determine high-resolution structure of G-quadruplex from HPV type 52 genome. First we showed that guanine rich sequence from HPV type 52 genome forms G-quadruplex in presence of K^+ ions. Assignment of guanine imino protons was obtained by 1D $^{15}N\text{-}^1H$ HSQC experiments, using site-specific ^{15}N labeling. The unambiguous assignment of guanine H8 protons was achieved with 2D $^{13}C\text{-}^1H$ JRHMBC experiments. 2D DQF-COSY, NOESY and TOCSY experiments were used to assign the nonexchangeable proton chemical shifts. The G-quadruplex structure adopts intramolecular 3+1 quadruplex conformation with edgewise, diagonal and propeller loop with the length of two, five and three nucleotides, respectively. Atomic resolution structure of this G-quadruplex provides important information for the design of specific ligands that could modulate HPV type 52 gene expression.

Razvoj avtomatizirane metode za določevanje olmesartana v humani plazmi

JANJA MEDVED, Krka, d. d., Novo mesto

Mentor: Helena Prosen, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentorica: Lea Cvitkovič Maričič, Krka, d. d., Novo mesto

V okviru naloge smo razvili hitro, občutljivo in natančno avtomatizirano metodo za določevanje olmesartana v humani plazmi. Določevano komponento smo od neželenih snovi, prisotnih v plazemskih vzorcih, spomočjo ekstrakcijskih kolon Strata-X ločili z ekstrakcijo na trdno fazo. Dobijeni eluat sem injiciral v tekočinski kromatograf, opremljen s kromatografsko kolono Gemini C18 v kombinaciji z izokratsko mobilno fazo acetonitrila in 0,5-odstotne mravljične kisline (80 : 20, v/v). Za detekcijo smo uporabili tandemsko masno spektrometrijo v SRM-načinu z uporabo pozitivne ionizacije z elektrorazprševanjem. Po končanem razvoju metode sem njene lastnosti tudi statistično ovrednotila v koncentracijskem območju 1–700 ng/ml v humani plazmi in pri tem uporabila metodo internega standarda. V praksi se je pokazalo, da je razvita in ovrednotena metoda zelo učinkovita, saj lahko z njo hitro analiziramo večje število vzorcev. Validacija znotraj študije ter analize za potrditev ponovljivosti metode pa so pokazale, da je metoda tudi zelo ponovljiva v daljšem časovnem obdobju.

Development of Automated Method for Determination of Olmesartan in Human Plasma

JANJA MEDVED, Krka, d. d., Novo mesto

Supervisor: Helena Prosen, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Lea Cvitkovič Maričič, Krka, d. d., Novo mesto

The purpose of my research work was the development of fast, sensitive and precise automated method for determination of olmesartan in human plasma, which was separated from undesirable substances present in plasma samples by a solid phase extraction using Strata-X extraction columns. The obtained eluate was injected into liquid chromatograph equipped with a Gemini C18 chromatography column in combination with an isocratic mobile phase of acetonitrile and 0.5 % formic acid (80:20, v/v). Tandem mass spectrometry in SRM mode with positive electrospray ionization was used for detection. The developed method was statistically validated in the concentration range 1–700 ng/ml in human plasma, using the internal standard method. The developed and validated method proved to be very effective in practice since the number of the samples processed at the same time is much higher. Furthermore, the study and validation within the ISR analysis showed that the method is also highly reproducible over a long period of time.

Izdelava laboratorijskega modela za testiranje aktivnosti ketoreduktaz pri njihovi večkratni uporabi v procesih biokatalize

MARKO MIHELIČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Aleksander Pavko, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Somentor: Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto

Pripravili smo laboratorijski model za testiranje aktivnosti ketoreduktaz pri njihovi večkratni uporabi v membranskem reaktorju. Dva pogoja, pH 6 in 60-odstotni prostorninski delež 2-propanola v TEA-pufru, ki sta determinirala enantioselektivnost pretvorbe intermediata derivata tiofena v ketonski obliki v derivat tiofena v alkoholni obliki, smo določili eksperimentalno. Ostali parametri, in sicer temperatura 35 °C ter koncentracija encima in kofaktorja NADPH, so vplivali le na hitrost reakcije. Reakcijo smo nato pri istih pogojih izvedli v testnem sistemu z modelnim substratom acetofenonom, ki nam je zaradi enostavne TLC- in spektrofotometrične analitike omogočal izvedbo širokega nabora testov in simulacij reakcijskih pogojev. V membranskem reaktorju je bila učinkovitost pretvorbe acetofenona v acetofenol v primerjavi s šaržnim reaktorjem pri prvi uporabi encima 80-odstotna, pri drugi približno 60-odstotna in pri tretji 40-odstotna. Primerjava celotne pretvorbe substrata na enoto encima je potrdila pričakovane rezultate. S ponovno uporabo ketoreduktaze smo na enoto encima proizvedli 1,8-krat več proizvoda kot s standardnim šaržnim sistemom. Na osnovi rezultatov sklepamo, da je testni model ustrezen in dovolj informativen za oceno aktivnosti encima pri večkratni uporabi v membranskem reaktorju.

Construction of Laboratory Model for Testing of Ketoreductase Activities by Their Multiple Use in Biocatalysis Processes

MARKO MIHELIČ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Aleksander Pavko, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor: Aleš Gasparič, Krka, d. d., Novo mesto

We have provided a laboratory model for testing activities of ketoreductases in their repeated use in a membrane reactor. Two conditions, pH 6 and 60 % volume fraction of 2-propanol in TEA buffer determined enantioselectivity in the conversion of intermediate thiophene derivative in ketone form into thiophene derivative in alcohol form, were determined experimentally. Other parameters, temperature of 35 °C, enzyme and cofactor concentration affected only the reaction rate. The reactions were then performed under the same conditions in the test system with acetophenon as a model substrate. With simple TLC and spectrophotometric analysis we were able to perform a wide range of tests and simulations of reaction conditions. Effectiveness in converting acetophenone into acetophenol in membrane reactor was according to batch reactor 80 % with the first use of enzyme, 60 % with second and 40 % with the third. The comparison of whole substrate conversion per unit of enzyme confirmed the expected results. With re-using of enzyme we were able to produce 1.8 times more product per unit of enzyme, than with batch system. Based on the results we concluded that the test model is adequate and sufficiently informative to estimate enzyme activity after multiple application in a membrane reactor.

Določanje strupenosti in razgradljivosti hidrofobnih ionskih tekočin

NINA PEKOLJ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Andreja Žgajnar Gotvajn, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

V industriji običajno uporabljena organska topila so zaradi hlapne in vnetljive narave nevarna za ljudi in okolje. Ionske tekočine imamo za zelena topila. V diplomskem delu smo ocenili vpliv izbranih hidrofobnih ionskih tekočin na osnovi imidazola na okolje. Biorazgradljivost ionskih tekočin smo ovrednotili z dvema metodama, in sicer z metodo na podlagi merjenja porabe kisika v zaprtem respirometu in metodo na podlagi merjenja koncentracije raztopljenega organskega ogljika (DOC). Za oceno strupenosti smo uporabili ekotoksikološke teste z različnimi organizmi iz prehranjevalne verige, kot so morske bakterije *Vibrio fischeri*, mikroorganizmi v aktivnem blatu, mala vodna leča *Lemna minor*, bela gorušica *Sinapis alba*, vrtna kreša *Lepidium sativum*, čebula *Allium cepa*, solinarski raki *Artemia salina*. Nobene izmed testiranih izbranih ionskih tekočin na osnovi imidazola ne moremo uvrstiti med lahko biorazgradljive snovi glede na ISO-standard. Vse za teste izbrane hidrofobne ionske tekočine so zelo strupene, saj povzročajo specifičen učinek na 50 % testiranih organizmov že v zelo majhnih koncentracijah ne glede na njihovo hidrofobno naravo. Velika strupenost ionskih tekočin na aktivno blato pomeni, da bi ionske tekočine lahko imele neželen vpliv na biološko čistilno napravo. Glede na naše pridobljene rezultate izbranih ionskih tekočin ne moremo ovrednotiti kot zelena topila. Prav tako je treba premisliti o njihovi uporabi v industrijskem merilu.

Determination of Biodegradability and Toxicity of Hydrophobic Ionic Liquids

NINA PEKOLJ, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Andreja Žgajnar Gotvajn, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Most of organic solvents commonly used in industrial applications cause a major concern to the people exposed and the environment as well as due to their volatile and flammable nature. Ionic liquids have gained attention as green solvents. In this thesis the effect of selected imidazolium-based hydrophobic ionic liquids on the environment has been assessed. Biodegradability of ionic liquids has been evaluated by two methods, by measurement of oxygen demand in closed respirometer and by analysis of dissolved organic carbon (DOC). For assessment of toxicity, ecotoxicological tests using different organisms from the food chain have been applied. They are marine bacteria *Vibrio fischeri*, microorganisms in activated sludge, duckweed *Lemna minor*, white mustard *Sinapis alba*, garden cress *Lepidium sativum* and onion *Allium cepa*, crustacean *Artemia salina*. None of the chosen imidazolium-based ionic liquids could be classified as readily biodegradable corresponding to the ISO standard. All tested hydrophobic ionic liquids show high toxicity, because they cause specific effect on 50% testing organisms in very low concentrations in spite of their hydrophobic nature. Ionic liquids could have negative impact on a biological treatment plant due to the high toxicity of ionic liquids to activated sludge. According to our presented results investigated hydrophobic ionic liquids cannot be assessed as green solvents and their industrial scale application should be considered.

Izdelava tablet s stiskanjem hidroksipropilcelulozne obloge za dosego dvopolznega sproščanja zdravilne učinkovine

ALEŠ PRŠINA, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Odon Planinšek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Priprava trdne disperzije učinkovine z uporabo poroznih pomožnih snovi je ena izmed uporabnih metod za izboljšanje topnosti in hitrosti raztopljanja. Z metodo odparevanja topila pri znižanem tlaku smo izdelali trdno disperzijo modelne učinkovine karvedilol s poroznim magnezijevim aluminometasilikatom Neusilin® US2 v razmerju 1 : 2. Izzmesi, ki je vsebovala trdno disperzijo, vezivo in razgrajevalo, smo pripravili jedrne tablete ter jih po metodi oblaganja s stiskanjem obložili s polimerom hidroksipropilcelulozo tipa GF. Nato smo izdelali še dvoplastne tablete, in sicer tako, da smo na plast, ki je bila enaka sestave kot zmes za tabletiranje jedra, stisnili obloženo tableto. Vrednotili smo raztopljanje kristalne oblike učinkovine, trdne disperzije, fizikalne zmesi in jedrnih tablet v 50 ml in 250 ml medija ter izdelanih obloženih in dvoslojnih tablet v 250 ml medija. Učinkovina se je iz trdne disperzije sproščala bolje od kristalnih delcev same učinkovine v vseh medijih takoj v 50 ml kot 250 ml. Potrdili smo tudi, da so dvoplastne tablete, obložene s hidroksipropilcelulozo, časovno odvisen in glede pH neodvisen sistem, saj smo pri različnih vrednostih pH dosegli primerljiv zakasnitveni čas sproščanja modelne učinkovine.

Formulation of Tablets by Compressing Hydroxypropylcellulose to Achieve Bimodal Release of Active Ingredient

ALEŠ PRŠINA, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Supervisor: Odon Planinšek, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana

Dispersing active substances in solid dispersions is a good way of improving solubility and rate of dissolution. We developed solid dispersions of carvedilol by using porous magnesium aluminometasilicate Neusilin® US2 with the method of solvent evaporation. The mass ratio between drug and Neusilin® US2 was 1 : 2. We also prepared core tablets from mixture of solid dispersion, binder and disintegrant followed by coating the core tablets with hydroxypropylcellulose type GF by using the press-coating method. Afterwards we prepared bilayer tablets by pressing the coated tablet on the powder bed of the first layer which had the same composition as the core tablet. We evaluated solubility characteristics of pure crystalline active substance, active substance from solid dispersion and physical mixture, core and bilayer tablets in 50 ml and 250 ml volume of medium. Results showed that the dissolution of active substance was highest in the form of solid dispersion regardless the volume of medium. Pure crystalline active substance had the lowest solubility in all media. We confirmed that bilayer tablet, coated with hydroxypropylcellulose polymer, is time- and not pH-dependent delivery system.

Oblikovanje embalaže po meri vseh uporabnikov

TJAŠA SAJE, Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor: Boštjan Botas Kenda, Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentor: Domen Fras, Naravoslovnotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Veliko ljudi naleti pri uporabi vsakdanjih izdelkov in storitev na težave. Pojavijo se, ker izdelki niso bili oblikovani tako, da bi bili primerni za celoten obseg uporabnikov z različnimi funkcionalnimi sposobnostmi. Rešitev predstavlja tako imenovano inkluzivno oblikovanje. Diplomsko delo ponuja vpogled v koncept inkluzivnega oblikovanja, ga natančno opredeli, razloži razlike v poimenovanju in poveže z vprašanjem invalidnosti. V okviru teh opredelitev razišče pomen inkluzivnega oblikovanja tako na individualni kot na kolektivni ravni ter poudari prednosti takšne prakse oblikovanja tudi s tržnega stališča. Predstavi tudi primer preoblikovanja embalaže v skladu z načeli inkluzivnega oblikovanja oziroma po meri vseh uporabnikov. Poskuša najti vzroke za to, da embalaža izključuje določene skupine ljudi, in te skupine identificira. Podrobno pregleda tudi pomanjkljivosti obstoječe embalaže in razišče njihov vpliv na uporabnost ter jih poskuša odpraviti. Prav tako se poglobi v zahteve, ki jih je treba upoštevati predvsem pri oblikovanju embalaže za potrebe v farmaciji. Diplomsko delo se konča s predstavitvijo končnega izdelka, ki predstavlja embalažo, oblikovano po načelu inkluzivnosti.

Inclusive Packaging Design

TJAŠA SAJE, Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana

Supervisor: Boštjan Botas Kenda, Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana

Co-supervisor: Domen Fras, Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana

Many people encounter problems using everyday products and services. These problems arise on account of their products not being designed to accommodate full range of users with different functional capabilities. This issue can be solved with the introduction of inclusive design. This case study offers insight into the concept of inclusive design, offering a precise definition, explaining the causes of differences in terminology and solving the existing link to the issue of disability. Within these definitions, it explores the importance of inclusive design on an individual as well as collective scale and highlights the benefits of such design practice from the marketing point of view. It presents an example of packaging redesign in accordance with the principles of inclusive design, suitable for all of users. By examining the existing packaging, it evaluates the reasons that contribute to redesign. It also investigates the causes that may lead to exclusion of certain users and identifies those user groups. The shortcomings of the existing packaging and their effect on the accessibility are closely examined. The demands which need to be taken into account particularly in the design of pharmaceutical packaging are discussed in detail. The conclusion of this thesis is a presentation of the final product, a pharmaceutical packaging design for an OTC drug, designed with respect to the principles of inclusivity.

Sinteza novih pirazolo[1,2-*a*]pirazolonskih peptidomimetikov

ANA TESTEN, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Jurij Svetec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Raziskovalno delo je obsegalo večstopenjsko pripravo ($4R^*,5R^*$)-4-benziloksikarbonilamino-5-izopropilpirazolidin-3-ona ter njegovo pretvorbo z benzaldehidom in 2,6-diklorobenzaldehidom v dva ustreznega modelna azometin imina. Sledile so 1,3-dipolarne cikloadicije nastalih azometin iminov s *tert*-butil metilakrilatom kot dipolarofilom, pri čemer je bil stereokemijski potek reakcije odvisen od *ortho*-substituentov na aromatskem obroču na položaju C(1') azometin imina. Nadaljevala sem s selektivno odstranitvijo zaščitnih skupin ter tvorbo proste karboksilne in aminske skupine nastalih dipeptidov, kateri je sledila vezava različnih aminokislinskih derivatov. Z vezavo derivatov (*S*)-alanina sem na sistem uvedla nov kiralni center. Nastali diastereoizomeri so bili ločeni s preparativno tekočinsko kromatografijo (MPLC). Z akiralnimi glicinskimi derivati sem pripravila tudi ustreznega tetra- in heksapeptida, katerih struktura spominja na strukturo zavoja β -proteinov.

Synthesis of New Pyrazolo[1,2-*a*]Pyrazolone Peptidomimetics

ANA TESTEN, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor: Jurij Svetec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

($4R^*,5R^*$)-4-Benzylloxycarbonylamo-5-izopropylpyrazolidin-3-one was prepared via Wittig reaction from α,β -dehydroleucine derivative with excess hydrazine hydrate and afterwards transformed into the corresponding model azomethine imines by condensation with benzaldehyde and 2,6-dichlorobenzaldehyde. 1,3-Dipolar cycloadditions of these two dipoles to *tert*-butyl methylacrylate gave the corresponding cycloadducts. Stereochemistry of cycloadditions was controlled by the *ortho*-substituents at position C(1') in azomethine imines. Bicyclic pyrazolo[1,2-*a*]pyrazolones were afterwards selectively deprotected at the C- and the N-terminal, followed by coupling with amino acid derivatives to give the corresponding tri-, tetra- and hexapeptides. Coupling with (*S*)-alanine derivatives afforded diastereoisomeric tripeptides, which were separated by MPLC. The structure of final products reminds on the potential peptidomimetics, such as β -sheet motif in proteins.

Sintezenobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov

JERNEJ TURNŠEK, Kemijski inštitut Ljubljana
Mentor: Gregor Anderluh, Kemijski inštitut Ljubljana
Somentor: Roman Jerala, Kemijski inštitut Ljubljana

Optimizacija številnih metabolnih procesov v naravi je posledica organizacije encimov v multiencimske komplekse. Po tem zgledu smo v diplomskem delu predstavili sintezenobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Z zaznavanjem prenosa energije s fluorescenčno resonanco (FRET) med rekonstituiranimi cepljenima fluorescenčnima proteinoma, vezanima na programsko DNA, smo dokazali princip delovanja načrtovanega sintetičnega biološkega sistema. Okarakterizirali smo tudi dva fuzijska proteina za funkcionalizacijo DNA origamija, ki razširja pojem DNA-ogrodij v dve oziroma tri razsežnosti in bi lahko v prihodnje imel pomembno vlogo pri inženiringu biosinteznih poti. Končno smo pripravili plazmidne vektorje z geni za fuzijske proteine med encimi karotenoidne biosintezne poti in DNA-vezavnimi domenami iz cinkovih prstov ter plazmidne vektorje s programsko DNA, zaporedjem vezalnih mest, kamor se takšni fuzijski proteini lahko vežejo. Kopičenje encimov na DNA-ogrodju je v *E. coli* vodilo v 4-kratno oziroma 3,5-kratno povečanje produkcije likopena in β-karotena. Predstavljena biomimetična strategija znotrajcelične prostorske organizacije heterolognih encimov je komplementarna z uveljavljenimi pristopi metabolnega inženiringa za izboljševanje (komercialno zanimivih) biosinteznih poti.

Synthetic Biology Approach Towards Improvement of Carotenoid Biosynthetic Pathway Using Zinc Fingers

JERNEJ TURNŠEK, National Institute of Chemistry Ljubljana
Supervisor: Gregor Anderluh, National Institute of Chemistry Ljubljana
Co-supervisor: Roman Jerala, National Institute of Chemistry Ljubljana

Many metabolic processes in nature are optimised via enzyme organisation into multienzyme complexes. Inspired by nature, we have devised a synthetic biology approach towards improvement of carotenoid biosynthetic pathway using zinc fingers. We have shown the proof of concept for designed synthetic biological system by detecting fluorescence resonance energy transfer (FRET) between reconstituted split fluorescent proteins anchored to a program DNA. In addition, we have characterized two fusion proteins for functionalizing DNA origami which expands DNA scaffolds in 2 and 3 dimensions and might have an important role in the future when it comes to biosynthetic pathway engineering. Finally, we have constructed plasmid vectors with genes encoding fusion proteins comprised of carotenoid biosynthetic pathway enzymes and zinc finger DNA binding domains as well as plasmid vectors carrying a rationally designed program DNA, a sequence of DNA binding sites which serve to anchor such fusion proteins. DNA scaffold-assisted clustering of enzymes in *E. coli* has led to 4-fold and 3,5-fold increase of lycopene and β-carotene production, respectively. The presented biomimetic strategy for intracellular spatial organisation of heterologous enzymes offers a complementary route to the already established metabolic engineering approaches for improving (commercially appealing) biosynthetic pathways.

Matematični modeli in algoritmi pri zvijanju proteinov

JASNA ZADNIK, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

Mentor: Tomaž Košir, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani

V diplomskem delu so predstavljeni matematični modeli in algoritmi zvijanja proteinov. Opisana je zgradba proteinov ter metode in orodja za določanje molekulske strukture z najnižjo energijo. Celotna energija molekule je opisana s približnimi rešitvami Schrödingerjeve enačbe in jo je mogoče določiti tako z metodami *ab initio* kot z molekulsko mehaniko. Ravnovesje sil in dinamiko molekule opisuje diferencialna enačba, ki se imenuje Langevinova dinamika. Pri nizkih temperaturah je celotna energija sistema potencialna. Geometrija molekule pa je definirana z minimizatorjem površine potencialne energije. Ta je polna lokalnih minimumov, takolahko molekula prehaja v različna stanja. S pomočjo harmoničnih aproksimacij je opisano visokofrekvenčno gibanje molekul. Ker se algoritmi, ki iščejo rešitve diferencialnih enačb, izvajajo prepočasi, v diferencialno enačbo vpeljemo omejitve. Natančneje so opisani algoritmi za omejeno gibanje molekule in postopek za modeliranje potenciala. Podrobnejše so razložena vsa orodja in rezultati programskega paketa CHARMM. Na koncu pa je prikazan še primer njegovega delovanja na proteinu BPTI.

Mathematical Models and Algorithms for Protein Folding

JASNA ZADNIK, Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana

Supervisor: Tomaž Košir, Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana

In my diploma I focused on mathematical models and algorithms for protein folding. I described the structure of proteins and the methods and tools for determination of molecular structure with lowest energy. Total energy is described as an approximate solution of Schrödinger's equation. We can determine this solution with *ab initio* methods or with molecular mechanics. Force balance and molecular dynamics are described with differential equation called Langevin dynamics. The total energy of the system is approximately equal to the potential energy when temperatures are low. The geometry is given as a minimizer of the potential energy surface. It is full of minima, so the molecule can transfer into different states. Harmonic approximation describes the high frequency motions. To speed the algorithms for searching solution of differential equation we impose certain constraints. I described the algorithms for constrained molecular dynamics and potential modeling procedure. I specified all the tools and results of program CHARMM. I also showed an example of how CHARMM works on protein BPTI.

Akne – odpravljanje oziroma preprečevanje težav, značilnih za mladostniško kožo

MATEJ BURKAT, SIMONA GRIČAR, KATJA KELVIŠAR, Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Branka Klemenčič, Gimnazija Novo mesto

Somentorica: Maja Gabrič Zirkelbach, Dermis, specialistična dermatološka alergološka ambulanta, d. o. o.

Somentorica: Petra Vovko, Zavod za zdravstveno varstvo Novo mesto

Obdobje mladostništva velja za čas, v katerem se najbolj intenzivno oblikuje človekova osebnost. Zunanji videz in z njim povezana samopodoba pomembno vplivata na odraščanje. Za številne mlade so akne velik problem, zato smo raziskali, kakšen vpliv imajo na odraščanje mlade osebe, in še konkretnje, kako se mladostniki lotevajo njihovega odpravljanja. Iz ankete, ki smo jo izvedli med dijaki Gimnazije Novo mesto, smo izvedeli, da dokaj veliko mladostnikov uporablja čistilne kreme in tonike. Namenili smo se proučiti protimikrobnu učinkovitost benzoil peroksida, ki se pogosto uporablja za zdravljenje aken, in nekaterih eteričnih olj na bakterije *Propionibacterium acnes*, ki sodelujejo pri nastajanju aken, za kar smo uporabili difuzni test z diskami. Izbrali smo eterična olja čajevca, kamilice in limone, ki se pogosto pojavljajo v izdelkih za odpravljanje aken, ter eterično olje klinčkov, ki še ni razširjeno v izdelkih proti aknam, saj se njegovo delovanje nanje še proučuje, zato smo njegovo protibakterijsko učinkovanje testirali še z dilucijsko metodo.

Acne – Resolving and Preventing the Skin Problems, Typical for Teenagers

MATEJ BURKAT, SIMONA GRIČAR, KATJA KELVIŠAR, Novo mesto Grammar School

Supervisor: Branka Klemenčič, Novo mesto Grammar School

Co-supervisor: Maja Gabrič Zirkelbach, Dermis, specialistična dermatološka alergološka ambulanta, d. o. o.

Co-supervisor: Petra Vovko, Institute of Public Health Novo mesto

Adolescence is the period in which our personality is shaped. Both our physical appearance as well as self-esteem is extremely important in the time of growing up. Many adolescents have to face the problem of acne, which is why we decided to focus on the impacts the latter have on their lives and what do they do to solve the problem. We surveyed the students of the Novo mesto Grammar School and found out that they use a lot of cleansing tonics and facial creams that contain a variety of active ingredients, such as benzoyl peroxide. Thus, our intention was to see, how efficient benzoyl peroxide, which is so often used for resolving the problems with acne, really is. We tested the activity of some essential oils against bacteria *Propionibacterium acnes*, which are the key factors for acne's development and for that we used the disk diffusion method. The key ingredients, from which the essential oils were made, were tea plant, camomile and lemon. Recently there has been a lot of research into the usage of clove essential oil. Therefore we also tested it, not only with disc diffusion method, but also with dilution method.

Protimikrobnno delovanje različnih vrst medu na ustno mikrofloro

SARA KOKOLJ, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

Mentor: Irena Štrumbelj Drusany, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola

V projektni nalogi smo ugotavljali, ali različne vrste medu vsebujejo snovi, ki zavirajo rast mikroorganizmov normalne ustne mikroflore ljudi različnih starostnih skupin. Uporabili smo štiri vrste medu, in sicer kostanjevega, akacijevega, cvetličnega in lipovega ter propolis. Rezultati so pokazali, da rast mikroorganizmov normalne ustne mikroflore najbolj zavira kostanjev med, najslabše pa učinkuje lipov med. Iz rezultatov je razvidno, da učinkovitosti medu in propolisa na ustno mikrofloro ne moremo razporediti po starostnih skupinah in spolu posameznika, ampak je odvisna od občutljivosti normalne mikroflore posameznika.

Antimicrobial Activity of Different Types of Honey on Oral Microflora

SARA KOKOLJ, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

Supervisor: Irena Štrumbelj Drusany, Educational Centre of Biotechnology Ljubljana, Grammar School and Veterinary Secondary School

In the project work I have examined whether different types of honey contain substances that inhibit the growth of normal oral microbial flora of people of different age groups. I used four types of honey such as chestnut, acacia, floral, lime honey and propolis. The results showed that the chestnut honey stunts the growth of effects the most on the growth of normal oral microbial flora, whereas the lime honey has the least effect. The results showed that the effectiveness of honey and propolis on oral microflora cannot be grouped by age or sex of the individual, but depends on the sensitivity of the individual's normal microflora.

Problematika odpadnih zdravil in njihovo varno uničenje

TADEJ PEČAR, DAVID PEKOLJ, Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija
Mentorica: Dragica Budić Banović, Šolski center Novo mesto, Srednja elektro šola in tehniška gimnazija

Po podatkih Lekarniške zbornice Republike Slovenije je bilo v dveh letih od začetka veljave Uredbe o ravnanju z odpadnimi zdravili zbranih 71,5 tone odpadnih zdravil. Taka zdravila na območju Republike Slovenije niso več uporabna, saj ko zdravilo zapusti lekarno, izgubi sledljivost. Po veljavni zakonodaji se odpadna zdravila uničijo s sežigom v sežigalnici nevarnih odpadkov Pinus TKI, d. d., v Račah. V nalogi smo z metodo raziskovanja žeeli ugotoviti, kolikšna je ozaveščenost končnih uporabnikov zdravil o škodljivosti nepravilno odloženih odpadnih zdravil za okolje, kot tudi, ali je uničenje s sežigom za okolje res najvarnejši način uničenja odpadnih zdravil. Iz rezultatov ankete, izvedene večinoma med mladimi, je razvidno, da so slabo ozaveščeni o škodljivosti nepravilno odloženih odpadnih zdravil za okolje in o možnostih varnega zbiranja zdravil kot nevarnega odpadka. Ugotovili smo tudi, da je na območju Republike Slovenije in drugod po svetu sežig najpogosteje uporabljen metoda varnega uničenja odpadnih zdravil. A tuje raziskave, opravljene v preteklih letih, kažejo, da sežigalnice v ozračje spustijo veliko človeku in okolju škodljivih emisij, zaradi česar se lahko upravičeno vprašamo, ali je to res najvarnejši način uničevanja odpadnih zdravil.

The Issue of Waste Medicines and Their Safe Destruction

TADEJ PEČAR, DAVID PEKOLJ, School Center Novo mesto, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Grammar School
Supervisor: Dragica Budić Banović, School Center Novo mesto, Secondary School of Electrical Engineering and Technical Grammar School

According to the data of the Slovene Chamber of Pharmacy, 71.5 tones of waste medicines have been collected. The above mentioned medicines are regarded as non-useful in Slovenia since tracking is not possible once they have left the pharmacy. According to the current legislation in Slovenia, waste medicines are disposed off in the incineration plant PINUS TKI PLC in Rače. The first objective of the research paper is to explore the notion of the users' awareness about the hazardous effects of the unproperly disposed waste medicines, and the second one is to examine whether the disposals in incineration plants are the safest, environmentally friendly ways of disposals. The outcomes based on the questionnaires, carried out among the adolescents, indicate poor awareness of young people about the hazardous handling with waste medicines. Apart from that, they know very little about the possibilities of the safe collection of waste. The last issue of the research paper shows that currently the safest disposal of waste medicines by incineration plants is the most common way of disposal in Slovenia or elsewhere. However, some studies recently conducted abroad indicate that emissions by incineration plants are highly hazardous to both people and the environment; therefore the handling of waste in such a way is questionable.

Vpliv izbire topila in pogojev ekstrakcije na izkoristek ekstrakcije kofeina iz črnega čaja oziroma kave

SAŠA POČIVALŠEK, DEJAN SLAPŠAK, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo
Mentorica: Mojca Drofenik Čerček, Šolski center Celje, Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

V nalogi smo se odločili raziskati, kako izbira topila in metoda ekstrakcije vplivata na izkoristek ekstrakcije kofeina. Izbrali smo dve metodi: navadno ekstrakcijo in ekstrakcijo s Soxhletovim aparatom.. Uporabili smo tudi različna polarna in nepolarna topila. Najprej smo opravili preizkus topnosti čistega kofeina v različnih topilih in se odločili za pet topil, v katerih se je kofein najbolje raztopljal. Vzorca, iz katerega smo poskušali izolirati in pridobiti čim bolj čist kofein, sta bila kava in črni čaj. Prizadevali smo si tudi, da bi z okolju manj nevarnimi topili dosegli čim večji izkoristek. Ugotovili smo, da je najuspešnejša metoda ekstrakcije s Soxhletovim aparatom ob uporabi etanola, velik izkoristek ekstrakcije pa smo dosegli tudi s kloriranimi ogljikovodiki, vendar je bil produkt po uparjanju zelo nečist.

The Effect of Solvent Choice and Extraction Conditions for Efficiency of Caffeine Extraction from Black Tea or Coffee

SAŠA POČIVALŠEK, DEJAN SLAPŠAK, School Centre Celje – Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering
Supervisor: Mojca Drofenik Čerček, School Centre Celje – Secondary School of Chemistry, Electrical Engineering and Computer Engineering

In our research paper we decided to research how the selection of solvent and the extraction method influences on caffeine extraction yield. We chose two methods. The first method is an ordinary extraction and the second method is an extraction with Soxhlet extractor. We also used different polar and non-polar solvents. At the beginning we tested solubility of caffeine in different solvents and we decided to choose five solvents in which caffeine was the most soluble. Two samples, from which we tried to isolate the product and extract it as pure as possible, were coffee and black tea. Using solvents, which are less harmless to environment, we also tried to reach as high yield of product as possible. We found out that the most successful method of extraction is the extraction with Soxhlet extractor in combination with ethanol as a solvent. We also reached high yield of extraction with usage of chlorinated hydrocarbons, but after vaporization, the product was rather unpure.

Merjenje antioksidativnega potenciala *in vitro* z Briggs-Rauscherjevo reakcijo

JERNEJ ZORMAN, II. gimnazija Maribor
Mentorica: **Sanja Cvar, II. gimnazija Maribor**

V raziskovalni nalogi smo z Briggs-Rauscherjevo oscilirajočo reakcijo *in vitro* proučili antioksidativni potencial dvajsetih vzorcev hrane in pijače. Kompleksni mehanizem Briggs-Rauscherjeve reakcije med drugimi sestavlja tudi procesi, v katerih sodelujejo prosti radikali, natančneje peroksidni (HOO) in hidroksilni (OH) radikali. Z dodajanjem vzorcev hrane in pijače v reakcijski sistem smo proučevali inhibicijski čas, antioksidanti v uporabljenih vzorcih namreč reducirajo proste radikale in s tem prekinejo oscilacije. Z merjenjem inhibicijskega časa smo tako *in vitro* določili antioksidativni potencial uporabljenih vzorcev pri pH-vrednosti okrog 2, kar ustreza kemijskemu okolju v človeškem želodcu.

***In vitro* Determination of Antioxidant Potential with the Use of Briggs-Rauscher Oscillating Reaction**

JERNEJ ZORMAN, Maribor Second Grammar School
Supervisor: **Sanja Cvar, Maribor Second Grammar School**

The aim of our study was to investigate *in vitro* antioxidant potential of twenty food and beverage samples with the use of Briggs-Rauscher oscillating reaction. The complex mechanism of the Briggs-Rauscher reaction involves certain steps giving rise and consuming the high energy species, more specifically peroxy (HOO.) and hydroxyl radicals (OH.). By adding food and beverage samples into the reaction mixture we investigated the inhibition time resulting from sample antioxidants reducing free radicals and thus causing cessation in oscillations. From the recorded inhibition times we concluded about *in vitro* antioxidant capacities of food and beverage samples at the pH around 2, resembling chemical environment of human stomach.

KAZALO | INDEX

KAZALO AVTORJEV

51	Biserka Bakrač	79	Saša Počivalšek
20	Jernej Baškovč	61	Sara Prijič
52	Blaž Brulc	71	Aleš Pršina
53	Matjaž Brvar	38	Matjaž Ravnikar
76	Matej Burkat	8	Aleš Rotar
64	Bojana Črček	72	Tjaša Saje
26	Sabina Devjak Novak	79	Dejan Slapšak
65	Tadej Dolenc	44	David Šarlah
66	Aleša Dular	62	Veronika Škedelj
54	Biljana Govedarica	73	Ana Testen
76	Simona Gričar	74	Jernej Turnšek
55	Miloš Ilić	63	Lidija Urbas
76	Katja Kelvišar	14	Franc Vrečar
77	Sara Kokolj	75	Jasna Zadnik
32	Borut Kovačič	80	Jernej Zorman
56	Matevž Luštrik		
57	Vita Majce		
58	Damjan Makuc		
59	Nenad Maraš		
67	Maja Marušič		
68	Janja Medved		
69	Marko Mihelič		
60	Miha Možina		
78	Tadej Pečar		
78	David Pekolj		
70	Nina Pekolj		

KAZALO MENTORJEV IN SOMENTORJEV

51, 74	Gregor Anderluh	68	Helena Prosen
26	Saša Baumgartner	61	Gregor Serša
72	Boštjan Botas Kenda	54, 56	Stanko Srčič
78	Dragica Budić Banović	20	Branko Stanovnik
66	Polona Bukovec	64, 73	Jurij Svete
80	Sanja Cvar	54	Miha Škarabot
68	Lea Cvitkovič Maričič	53	Tomaž Šolmajer
79	Mojca Drofenik Čerček	63	Aleš Štrancar
72	Domen Fras	38	Borut Štrukelj
76	Maja Gabrič Zirkelbach	77	Irena Štrumbelj Drusany
69	Aleš Gasparič	60	Dejan Tomaževič
57	Stanislav Gobec	65	Darko Uršič
55	Janez Ilaš	76	Petra Vovko
74	Roman Jerala	26, 32, 65, 66	Franc Vrečer
55	Danijel Kikelj	62	Anamarija Zega
76	Branka Klemenčič	70	Andreja Žgajnar Gotvajn
59	Marijan Kočevar	52	Majda Žigon
75	Tomaž Košir		
38	Mojca Lunder		
44	K. C. Nicolaou		
69	Aleksander Pavko		
53	Andrej Perdih		
63	Boris Pihlar		
32, 71	Odon Planinšek		
58, 67	Janez Plavec		
57	Slovenko Polanc		

Glavni in odgovorni urednik dr. Miha Plevnik

Oblikovanje Krka, d. d., Novo mesto

Predstavitev nagrajencev Služba za odnose z javnostmi

Lektoriranje Ksenija Kosem

Prevajanje Mojca Ceferin

Produkcija Petra Dular Muhič
Andrej Petek
Aljoša Jelen

Fotografije Andrej Križ

Tisk Gorenjski tisk

Izdajatelj Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija
natisnjeno v nakladi 300 izvodov

www.krkinenagrade.si

