

<b>Kód projektu v ITMS2014+</b>	<b>313011ATT2</b>
<b>Názov projektu</b>	<b>Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na ochorenie COVID-19</b>
<b>Subjekt/prijímateľ pomoci</b>	<b>SITNO PHARMA s. r. o.</b>
<b>Partner 1</b>	<b>Centrum experimentálnej medicíny SAV</b>
<b>Partner 2</b>	<b>Chemický ústav Slovenskej akadémie vied</b>
<b>Partner 3</b>	<b>Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum</b>

**Záverečná správa:**

**Doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.**

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>Formát záverečnej monitorovacej správy.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Presná formulácia anotovaných aktivít.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Aktivita 1. ....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Aktivita 2. ....</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Aktivita 3. ....</b>	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Aktivita 4. ....</b>	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Aktivita 5. ....</b>	<b>13</b>

**Závěrečná monitorovací správa k projektu**  
**“Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich**  
**multimodálnych účinkov na ochorenie COVID-19”**  
**(ITMS kód: 313011ATT2)**

## **1 FORMÁT ZÁVEREČNEJ MONITOROVACEJ SPRÁVY**

Projekt bol riešený v podobe 5-tich jasne identifikovateľných, na seba vzájomne nadväzujúcich aktivít, pre prehľadnosť je záverečná monitorovacia správa (ďalej len akronym ZMS) koncipovaná príspevkom jednotlivých aktivít významovo na samostatnej strane. V zmysle, krátky popis činnosti a formulácia väzby k jednotlivým výstupom.

## **2 PRESNÁ FORMULÁCIA ANOTOVANÝCH AKTIVÍT**

Aktivita 1 : Výskum a syntéza vybraných látkových entít na základe chinolínu a chroménu v subgramových a gramových množstvách.

Aktivita 2: Analytické zabezpečenie k entitám z kategórii LE, ZE i PE.

Aktivita 3: Technologický vývoj a príprava zdrojov zmesných a polymérnych entít.

Aktivita 4: Hodnotenie látkových, zmesných a polymérnych entít na vybrané biologické a terapeutické parametre.

Aktivita 5: Vybudovanie a sprevádzkovanie technologického pracoviska na prípravu parenterálnych formulácií, ich lyofilizačnú stabilizáciu a skúmanie vplyvu jednotkových operácií na vybrané vlastností hodnotených entít.

### 3 AKTIVITA 1.

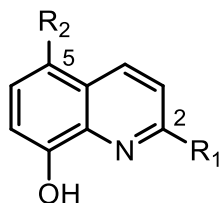
Výskum a syntéza vybraných látkových entít na základe chinolínu a chroménu v subgramových a gramových množstvách.

Prijímateľ: ChÚ SAV v Bratislave

Obdobie: 09/2019 – 06/2023

Riešenie a realizácia projektu prebiehalo na CHU SAV podľa plánu.

Pri plánovaní syntézy nových látok sa vchádzalo jednak z návrhu nových látok prostredníctvom výpočtov (CADD), jednak z štartovných, navrhovaných štruktúr, ktoré vykázali perspektívny antibakteriálny účinok: 5-nitor-8-hydroxychinolínu (Nitroxolín™), 8-hydroxy-5-nitrochinolínu, 2-amino-8-hydroxychinolínu a 8-hydroxychinolín-2-carboxaldehydu. Navrhnutý bol základný štruktúrálny model:

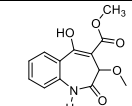
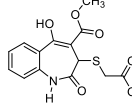
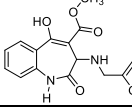
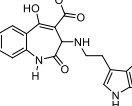
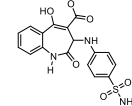
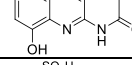
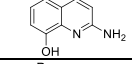
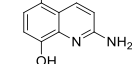
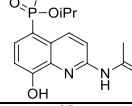
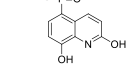
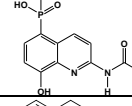
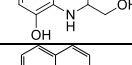
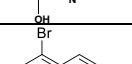
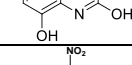
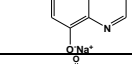
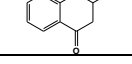


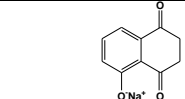
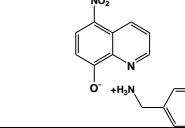
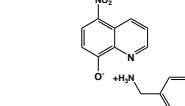
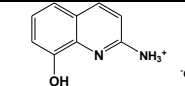
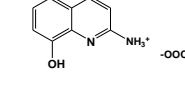
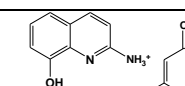
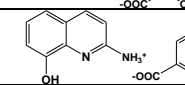
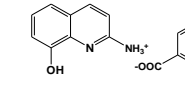
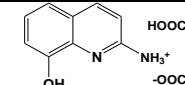
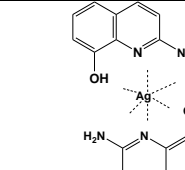
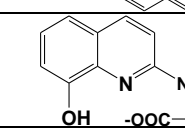
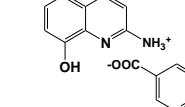
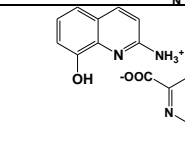
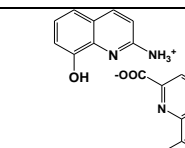
kde R<sub>1</sub>= OH, NH<sub>2</sub>, iné substituenty s ponukou donorov vodíkových väzieb priamo alebo cez „spacer /linker“, R<sub>2</sub>= COOH, COO<sup>-</sup>, NO, =O, =S, iné substituenty s ponukou akceptorov vodíkových väzieb priamo alebo cez „spacer“.

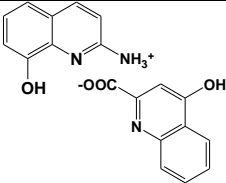
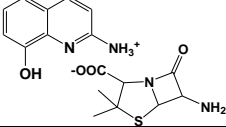
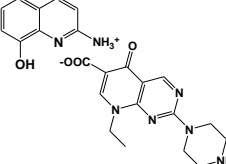
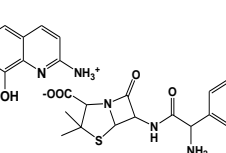
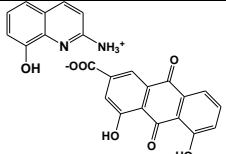
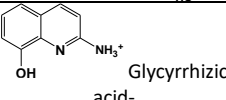
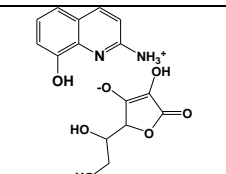
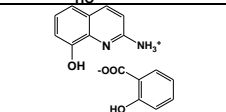
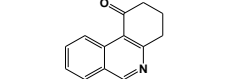
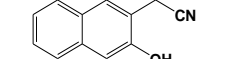
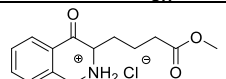
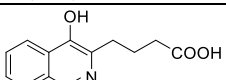
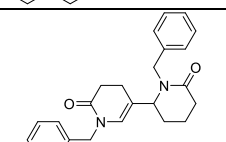
Štartovné štruktúrne typy boli ďalej poskytnuté kolektívu Dr. Májekovej na CEM SAV a v rámci Aktivity 3 boli predmetom výpočtov a ďalších štruktúrnych návrhov. V rámci tejto Aktivity 1, v spolupráci s ďalšími aktivitami bolo pripravených celkovo 52 originálnych látok, či parciálne purifikovaných reakčných zmesí na testovanie na úrovni *in vitro*. Presný výpočet jednotlivých látkových entít prezentuje nasledovná Tabuľka 1.

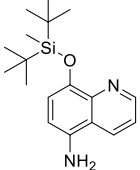
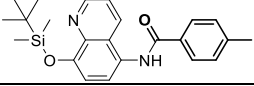


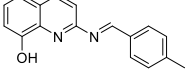
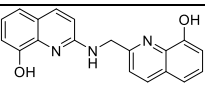
**Tabuľka 1. Prehľad pripravených látkových entít /LE/, odovzdaných na testovanie na úrovni *in vitro*.**

P. č.	Kód /šarža/	Názov látky	Štruktúra	MW (g/mól)	Cieľ syntézy	Línia štruktúr látok
1	DB-3	methyl 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-1-benzazepine-4-carboxylate		231,21	ABA	BA
2	DB-4	methyl 3-(4-chloroanilino)-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1-benzazepine-4-carboxylate		358,78	ABA	BA
3	DB-5	methyl 3-(4-((2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl)carbonyl)piperazin-1-yl)-5-		479,49	ABA	BA

		hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepine-4-carboxylate				
4	DB-6	methyl 5-hydroxy-3-methoxy-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepine-4-carboxylate		263,25	ABA	BA
5	DB-7	{[5-hydroxy-4-(methoxycarbonyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-3-yl]sulfanyl}acetic acid		323,32	ABA	BA
6	DB-9	methyl 3-[(furan-2-yl)methylamino]-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepine-4-carboxylate		328,32	ABA	BA
7	DB-12	methyl 5-hydroxy-3-[[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl]amino]-2-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepine-4-carboxylate		391,43	ABA	BA
8	DB-15	methyl 5-hydroxy-2-oxo-3-(4-sulfamoylanilino)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepine-4-carboxylate		403,41	ABA	BA
9	MB-476	N-(8-hydroxyquinolin-2-yl)acetamide		202,21	ABA	Q
10	MB-477	2-amino-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid		240,24	ABA	Q
11	MB-488	2-amino-5-bromoquinolin-8-ol		239,07	ABA	Q
12	MB-495	diisopropyl (2-acetamido-8-hydroxyquinolin-5-yl)phosphonate		366,35	ABA	Q
13	MB-497	diisopropyl (2,8-dihydroxyquinolin-5-yl)phosphonate		325,30	ABA	Q
14	MB-498	(2-Acetylamino-8-hydroxyquinolin-5-yl)-phosphonová kyselina		282,19	ABA	Q
15	MP-999	2-(Hydroxymethyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-8-ol		179,22	ABA	iné
16	MP-1011	2-hydroxymethyl-8-quinolin-8-ol		175,06	ABA	Q
17	MB-04-68	5-bromoquinoline-2,8-diol		240,05	ABA	Q
18	TM-2022-1	Nitroxolín, sodná soľ		212,16	ABA	Q
19	TM-2022-2	2-hydroxy-1,4-naphthaquinone (Lawsone), sodná soľ		196,15	ABA	Q

20	TM-2022-3	5-hydroxy-1,4-naphthaquinone (Juglone), sodná soľ		196,15	ABA	Q
21	TM-2022-4	RP: Nitroxoline, 4-benzylamín soľ		297,31	ABA	Q
22	TM-2022-5	RP: Nitroxoline, 4-(aminometyl)pyridín soľ		299,31	ABA	Q
23	TM-2022-6	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou šľavelovou		286,24	ABA	Q
24	TM-2022-7	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou 2,3-pyrazíndikarboxylovou		328,28	ABA	Q
25	TM-2022-8	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou chelidónovou		344,27	ABA	Q
26	TM-2022-9	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou chinaldovou		333,34	ABA	Q
27	TM-2022-10	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou 3,5-dinitrosalicylvou		388,29	ABA	Q
28	TM-2022-11	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín soľ s kyselinou pyridín-3,4-dikarboxylovou		327,29	ABA	Q
29	TM-2022-12	RP: 2-Amino-8-hydroxychinolín komplex s AgNO <sub>3</sub>		427,21	ABA	Q
30	TM-2023-1	RP: 2-amino-8-hydroxychinolínu + oxalic acid /A <sup>+</sup> B <sup>-</sup> /		250,06	ABA	Q
31	TM-2023-2	RP: Soľ quinoline-3-carboxylic acid s 2A8OHQ /A <sup>+</sup> B <sup>-</sup> /		333,11	ABA	Q
32	TM-2023-3	RP: Soľ quinoline-2-carboxylic acid s 2A8OHQ /A <sup>+</sup> B <sup>-</sup> /		333,11	ABA	Q
33	TM-2023-4	RP: Soľ xanthurenic acid s 2A8OHQ /A <sup>+</sup> B <sup>-</sup> /		365,10	ABA	Q

34	TM-2023-5	RP: Sol' kynurenic acid s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		349,11	ABA	Q
35	TM-2023-6	RP: Sol' 6-APA s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		376,12	ABA	Q
36	TM-2023-7	RP: Sol' pipemidic acid s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		463,2	ABA	Q
37	TM-2023-8	RP: Ammpicillin s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		509,58	ABA	Q
38	TM-2023-9	RP: Rhein s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		444,39	AVA/AB A	Q
39	TM-2023-10	RP: Glycyrrhizic acid s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		992,09	AVA/AB A	Q
40	TM-2023-11	RP: Ascorbic acid s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		336,10	AFA/ABA	Q
41	TM-2023-12	RP: Salicylic acid s 2A8OHQ /A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> /		298,29	AFA/ABA	Q
42	PŠ-2022-02	3,4-Dihydro-2H-phenanthridin-1-one		197,24	ABA	Q
43	PŠ-2022-03	(3-Hydroxy-naphthalen-2-yl)-acetonitrile		183,21	ABA	N
44	PŠ-2022-04	methyl 4-(4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl)butanoate hydrochloride		283,75	ABA	N
45	PŠ-2022-05	4-(4-hydroxyisoquinolin-3-yl)butanoic acid		231,25	ABA	IQ
46	PŠ-2022-06	1-benzyl-5-(1-benzyl-6-oxopiperidin-2-yl)-3,4-dihydropyridin-2(1H)-one		374,48	ABA	N

47	PŠ-2022-07	8-((di-tert-butyl(methyl)silyl)oxy)quinolin-5-amine		316,52	ABA	Q
48	PŠ-2022-08	N-(8-((tert-butyl(dimethyl)silyl)oxy)quinolin-5-yl)-4-methylbenzamide		392,57	ABA	Q
49	PŠ-2022-1 PŠ0809202 2-1	8-hydrochinolín-N-oxid		161,16	ABA	Q
50	PŠ-2022-2 PŠ0809202 2-2	2-amino-5,7-dinitro-8-hydroxy chinolín		250,17	ABA	Q
51	PŠ-2022-08 PŠ0809202 2-3	2-[(4-Methyl-benzylidene)-amino]-quinolin-8-ol		262,31	ABA	Q
52	PŠ-2022-09 PŠ0809202 2-4	2-[(8-Hydroxy-2-quinoliny)amino]methyl]-8-quinolínol		317,12	ABA	Q

### Formulácia väzby obsahu riešenia aktivity k výstupom:

Vo výstupoch sú formulované predovšetkým jednotlivé syntetické postupy pri príprave látkových entít /LE/, uvedených v Tabuľke 1, aj vo väzbe k bio-aktivite.

## 4 AKTIVITA 2.

**Analytické zabezpečenie k entitám z kategórii LE, ZE i PE.**

**Prijímateľ:** ChÚ SAV v Bratislave

**Obdobie:** 09/2019 – 06/2023

V rámci tejto aktivity boli všetky látkové entity /LE/, uvedené v Tabuľke 1. separačnými metódami (HPLC, GC, CEZ) a metódami štruktúrnej analýzy (NMR, hmotnostná spektrometria, IČ spektrometria). V rámci Aktivity 2 boli tiež analyzované extrakty rastlín s antivirálnou, antibakteriálnou a protizápalovou aktivitou.

Počet pripravených rastlinných extraktov – zmesných entít /ZE/ n = 220, počet účinných rastlinných extraktov, odovzdaných na testy /ABA/, n= 4 z 200 (2,5%), počet /ZE/ významne účinných na /AFA/ n = 7 z 8 (87,5%), počet /ZE/ významne účinných na /AVA/ n = 10 z 15 (66%),

Stratégia výberu /ZE/:

- I. sub-kolekcia („*random collection*“), n= 100,
- II. sub-kolekcia – výber podľa účinnosti a taxonomického zatriedenia,
- III. sub-kolekcia – kombinácia drog so saponínmi,
- IV. sub-kolekcia – extrakcia promovovaná fyzikálnym faktorom (teplo tlak, ultrazvuk, elektrické pole), čo je predmetom podaného patentu.

**Výsledok, prínos, riešené problémy:**

- extrakt koreňa Rebarbory dlanitej /*Rheum rhabarbarum* L./ zaujímavé miera /ABA/, /AFA/, predpokladaný obsah antrachinónov, istý problém so zabezpečením drogy,
- extrakt listov a konárikov Vrbí bielej /*Salix alba* L./, zaujímavá miera /ABA/, /AFA/ predpokladaný obsah procaynidínov, istý problém s verifikáciou výsledkov,
- extrakt drogy listov a kôry duba letného (zimného) /*Quercus robur* L./, zaujímavá miera /ABA/, /AFA/, /AVA/ predpokladaný obsah tanínov, istý problém s odlišením účinku od precipitácie proteínov,
- extrakt kôry niektorých samorodých odrôd Viniča /*Vitis vinifera* L./, stredná až vysoká miera /ABA/, /AFA/ a /AVA/ istý problém s odlišením účinku od precipitácie proteínov,
- extrakt z listov a konárikov Brezy previsnutej /*Betula pendula* L./, zaujímavá miera /ABA/, /AFA/, /AVA/ istý problém s verifikáciou výsledkov,
- extrakt zo semien Ovsu siateho /*Avena sativa* L./, nízka až stredná miera /ABA/, obsah farmakologicky zaujímavých látok AVNs, protizápalová aktivita /AFA/.

**Formulácia väzby obsahu riešenia aktivity k výstupom:**

Vo výstupoch sú formulované predovšetkým výsledky a postupy pri analýze rastlinných extraktov, teda zmesných entít /ZE/.



## 5 AKTIVITA 3.

### Technologický vývoj a príprava zdrojov zmesných a polymérnych entít.

**Prijímateľ:** NPPC Lužianky

**Obdobie:** 09/2019 – 06/2023

Podstatou tejto aktivity boli výskumné a technologické štúdie ktoré sa viažu ku zabezpečeniu zdrojov zmesných entít /ZE/ a polymérnych entít /PE/. Na základe publikovaných, verejne dostupných údajov i na základe nameraných výsledkov, boli vybrané zmesné entity: rastlinné extrakty, ktoré vykázali simultánny (aspoň dva z troch menovaných účinkov) antivirálny, antibakteriálny a antioxidačný účinok a publikovaný je i protizápalový a antivirálny účinok. Z kategórie polymérnych matric sa študovali vybrané vzorky beta-glukánu z fungálnych, zdrojov s predpokladaným imunostimulačným účinkom.

Stanovené boli nasledovné kritéria pre výber zmesných entít (extrakty prírodných materiálov):

- látka je povolená pre použitie v potravinárstve bez obmedzenia,
- vieme ju získať v koncentrovanej forme vhodnej na ďalšie spracovanie a aplikáciu,
- e dostupná na báze domácich surovín,
- 

Na základe týchto kritérií boli získané extrakty z nasledovných zdrojov: Pamajorán obyčajný / *Origanum vulgare* L./ (3 lokality, 2 druhy kvetenstva – pred kvetom vs. plný kvet), Čiernohlávk obyčajný / *Prunella vulgaris* L./ (3 lokality, 2 druhy kvetenstva – pred kvetom vs. plný kvet), Borievka obyčajná / *Juniperus communis*/ (3 lokality, staré vs. mladé ihličie), Obnôžkový peľ, Hroznové výhonky / *Vitis vinifera*/ (Svätovavrinské, Rizling rýnsky, Amerikán, Hybrid).

Extrakty boli pripravované v okyslenom 60% EtOH, z čerstvých bylín, ihneď po usušení a po 30 dňoch od usušenia. Extrakty boli ďalej zhodnotené na antioxidačnú aktivitu. Hodnotili sa schopnosť vzoriek zhasť radikál ABTS, antioxidačná aktivita vyjadrená ako ekvivalent štandardu TROLOX (TEAC), koncentrácia polyfenolov (TPC) a koncentrácia flavonoidov (TFC).

Zo získaných hodnôt vyplynuli nasledovné poznatky: sušené byliny vykazujú výrazne vyšší výťažok antioxidačné pôsobiacich látok, zrejmy je rozdiel medzi jednotlivými lokalitami zberu, zrejmy je rozdiel v čase zberu (na začiatku a v plnom kvete), výrazne vyšší obsah polyfenolických látok a flavonoidov bol nameraný pre obnôžkový peľ. Z toho dôvodu bol tento ako potenciálny zdroj bohatý na flavonoidy a polyfenoly zvolený ako najvhodnejší zdroj za zmesné entity /ZE/.

V terminálnej fáze riešenia projektu bolo pripravených 100 l extraktu obnôžkového včelieho peľu (60% etanol, pomer 1:4 , 25 kg pelu), vzorky extraktu boli poskytnuté na ďalšie experimenty a začali práce na optimalizácii postupu získavania lipozomálnej a liofilizovanej formy účinných látok. Na spôsob výroby liofilizovaného extraktu včelieho obnôžkového peľu bola spracovaná výrobná dokumentácia v podobe procesovej knihy a ponúknutá na realizáciu firmám Biomin a.s., Calendula a.s a Bio-centrum s.r.o. Rovnako ma spôsob extrakcie bola spracovaná a podaná prihláška patentu Spôsob extrakcie a zariadenie na šetrnú extrakciu rastlinných látok s kombinovaným akceleračným účinkom( PP -81-2023).

V oblasti výskumu a vývoja polymérnych entít /PE/ bolo pripravených 10 kg beta-glukánu z hlivy ustricovej a pokračovali práce na príprave jej sulfatovanej formy . Sulfatáciou jemne mletého beta-glukánu v prostredí izoropylalkoholu a koncentrovanej kyseliny sírovej pri -5°C bol dosiahnutý stupeň sulfatácie zodpovedajúci jednej sulfátovej skupiny na glukózovú jednotku beta-glukánu. Overená bol a i možnosť prípravy gélu zmesi beta-glukánu a prírodného elektronegatívneho polysacharidu s sulfátovými skupinami iota-caragenanu. Pri testovaní sa potvrdila vysoká účinnosť takto pripravených vzoriek pri blokovaní vstupu vírusu do bunky formou externého výskumu na špecializovanom pracovisku ÚV BMC SAV v Bratislave. Na spôsob výroby gélu bola spracovaná výrobná dokumentácia v podobe procesovej knihy a ponúknutá na realizáciu spoločnostiam Biomin a.s. a Bio-centrum s.r.o.

**Formulácia väzby obsahu riešenia aktivity k výstupom:**

Vo výstupoch sú formulované predovšetkým výsledky aplikovaného výskumu a technologického vývoja pri výbere rastlinných extraktov, teda zmesných entít /ZE/ a „scale up“ procese vývoja technológie na prípravu extraktov technologickom merítku.

## 6 AKTIVITA 4.

### Hodnotenie látkových, zmesných a polymérnych entít na vybrané biologické a terapeutické parametre

**Prijímateľ:** CEM SAV v Bratislave

**Obdobie:** 09/2019 – 06/2023

CEM SAV naplnilo všetky míľniky i ciele projektu. V súlade s plánovanými aktivitami projektu CEM SAV poskytlo nasledujúce projektové výstupy:

Vypracovalo a zaviedlo metodiku pre stanovenie cytotoxicity na bunkovej línii VERO-6. Taktiež boli vypracované štandardné pracovné postupy (ŠPP) pre prácu s 3D re-konštituovanými modelmi EpiAirway a EpiIntestinal. Vybrané látky boli študované v testoch cytotoxicity na bunkovej línii VERO 6 a 3D modeloch. Z výsledkov je zrejmé, že niektoré testované /LE/ ako napríklad 2-amino-8-hydroxychinolín vykázali istú mieru cytotoxicity, ktorá sa však nepotvrdila v rámci toxicity *in vitro* na 3D modeloch

Bol vykonaný virtuálny skrining viac ako 1000 navrhovaných štruktúr pomocou programu MOE. Podľa získaného odhadovaného skóre boli navrhnuté látky na syntézu, výsledky sú súčasťou časti Tabuľky 1, jedná sa o návrhy na syntézu, ktoré boli realizované Okrem toho bol vykonaný aj virtuálny skrining komerčne dostupných látok so známou inhibičnou aktivitou, ktorý bol zhrnutý v publikácii. Ako výsledok tohto skriningu boli navrhnuté látky ako perspektívne entity na testovanie cytotoxicity a imunostimulačnej aktivity.

Pre perspektívne entity boli vykonané testy protizápalovej aktivity a imunostimulačnej aktivity. Z hodnotených látok vysokú mieru protizápalovej aktivity vykázali testované flavonoidy, hydroxy-substituované naftachinóny, ale predovšetkým aj 2-\*amino-8-hydroxychinolín a soli z neho pripravené a to na úrovni dvoch štandardov so známou protizápalovou aktivitou (kyselina salicylová, Ibuprofén<sup>TM</sup>).

Ako príklad celkového zhodnotenia v zmysle simultánneho biologického a potenciálne terapeutického účinku je nasledovná Tabuľka 2, ktorá prezentuje tri kľúčové, plánované účinky prezentované demonštráciou intenzity účinky podľa sýtosti sfarbenia.

**Tabuľka 2. Príklad účinných látkových entít /LE/ a zmesných entít /ZE/s duálnym, respektíve triple účinkom, v testoch antibakteriálnej aktivity /ABA/, protizápalovej aktivity /AFA/ a antivirálnnej aktivity /AVA/.**

<b>Látkové entity /LE/</b>	<b>/ABA/</b>	<b>/AFA/</b>	<b>/AVA/</b>
<b>Nitroxolín<sup>TM</sup></b>			
2-amino-8-hydroxyquinolín /2A8OHQ/ ,			
1,4-naftachinón/1,4 NQ/ ,			
1,2-naftachinón /1,2 NQ/ ,			
<b>Zmesné entity /ZE/</b>			
Dub zimný <i>Quercus robur</i> L., kôra			
Breza, <i>Betula pendula</i> L., listy			
Vrba biela, <i>Salix alba</i> L., kôra			
Borievka obyčajná, <i>Juniperus communis</i> L., plod			

**Formulácia väzby obsahu riešenia aktivity k výstupom:**

Vo výstupoch sú formulované predovšetkým výsledky prehľadu inhibítorov Mproteázy vírusu SARS-Cov-2, zodpovedného za pandémiu COVID-19, časť výsledkov protizápalovej a antivirálnnej aktivity je súčasťou podaného patentu.

## 7 AKTIVITA 5.

**Vybudovanie a sprevádzkovanie technologického pracoviska na prípravu parenterálnych formulácií, ich lyofilizačnú stabilizáciu a skúmanie vplyvu jednotkových operácií na vybrané vlastností hodnotených entít.**

**Prijímateľ:** SITNO PHARMA s.r.o.

**Obdobie:** 09/2019 – 06/2023

Globálnym cieľom Aktivity 5 je vybudovanie a uvedenie do prevádzky poloprevádzkového laboratória, ktorého cieľom bude príprava parenterálnych formulácií, ich lyofilizačná stabilizácia a sledovanie zachovania terapeutického potenciálu (definovaného exaktne ako súbor biochemických vlastností v úzkom prepojení s fyzikálnymi vlastnosťami a analytickou realitou) hodnotených entít všetkých kategórií /LE, ZE i PE/ v procese postupnosti jednotkových operácií, nutných pre vývoj moderných, aplikačných foriem.

Aktivity žiadateľa a partnerov boli nastavené tak, aby za každú aktivitu zodpovedal jeden účastník projektu, ale na druhej strane medzi jednotlivými aktivitami je úzka logická nadväznosť, previazanosť a spolupráca.

Riešenie v rámci tejto Aktivity 5 bolo zamerané prevažne na zmesné entity/ZE/. Cieľom riešenia bola lyofilizácia a následná rekonštitúcia vzoriek, rekonštituované vzorky boli podrobené následným analýzám a opakovaným testom na úrovni *in vitro*. Pre tieto účely sme používali laboratórne lyofilizátory Chemického ústavu SAV ako aj poloprevádzkový policový lyofilizátor Ústavu chemického a environmentálneho inžinierstva STU. Pozornosť bola venovaná aj experimentálnemu a teoretickému štúdiu nehomogénnej lyofilizácie, ktorá je typickou vlastnosťou lyofilizačného sušenia a stabilizácie. Úspešne sme vysušili a stabilizovali extrakty niekoľkých zmesných entít (extrakt koreňa rebarbory, extrakt kôry vrby bielej, extrakt kôry duba zimného, extrakt listov brezy previsnutej a ďalšie). Vykonané testy potvrdili, že po lyofilizácii, následnom skladovaní a rekonštitúcii v etanolových rozpúšťadlách bolo zachované pôvodné zloženie ako aj sledované fyzikálne a biochemické roztoky týchto entít

Vytvorenie spoločného pracoviska lyofilizácie Sitno Pharma, s. r. o. a NPPC je ďalším aspektom spolupráce medzi inštitúciami výskumu a produktívnou sférou. V plnej miere sa osvedčila spolupráca detašovaných pracovísk lokalizovaných v Sanece Pharmaceuticals, a. s. v Hlohovci. Výskumné laboratórium FChPT STU, analytické laboratórium ChÚ SAV a spoločné pracovisko lyofilizácie Sitno Pharma a NPPC.

### **Formulácia väzby obsahu riešenia aktivity k výstupom:**

Vo výstupoch sú formulované predovšetkým výsledky optimalizácie procesu lyofilizácie a následnej rekonštitúcie procesovaných vzoriek z kategórie rastlinných extraktov, teda zmesných entít.