

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/56

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J1-0957
<b>Naslov projekta</b>	Farmakogenetske raziskave metabolizma in transporta raloksifena
<b>Vodja projekta</b>	6086 Aleš Mrhar
<b>Tip projekta</b>	J Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	5.313
<b>Cenovni razred</b>	B
<b>Trajanje projekta</b>	02.2008 - 01.2011
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	787 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13. Splošni napredek znanja - RIR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

#### 1.1. Družbeno-ekonomski cilj<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	07.
<b>Naziv</b>	Zdravje

#### 2. Sofinancerji<sup>2</sup>

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta<sup>3</sup>

V skladu s predlogom smo v projektu raziskali metabolizem in transport raloksifena. Glavni cilj našega dela je bil identificirati ključne dejavnike v procesih absorpcije ter predsystemskega in systemskega metabolizma raloksifena ter ugotoviti njihov pomen v farmakokinetiki in farmakodinamiki raloksifena. Raziskave znotraj projekta smo zastavili tako, da so si sledile po naraščajoči stopnji kompleksnosti. Tako smo izvajali poskuse z enostavnimi subceličnimi, kompleksnejšimi *in vitro* modeli z izoliranimi vitalnimi tkivi, tem pa je sledila *in vivo* klinična raziskava na pomenopavznih pacientkah z osteoporozo, ki so ob pričetku študije začele zdravljenje z raloksifenom.

Kot se je izkazalo med našimi eksperimenti, sta procesa transport in metabolizem raloksifena tesno povezana, zato smo skušali ta dva procesa z enostavnejšimi modeli preučevati ločeno in sicer tako, da smo uporabili modele, kjer bodisi poteka samo metabolizem raloksifena z mikrosomi bodisi samo transport s prenašalci (Sf9 membranski pripravki, HepG2 in CHO celice, Caco-2 celice). Celokupni učinek obeh procesov, transporta in metabolizma, pa smo preučevali na kompleksnejših modelih, ki so vsebovali tako prenašalce kot tudi metabolične encime (izolirano tanko črevo podgane in prašiča in podganje jetrne rezine).

Z namenom preučevanja metabolizma smo izvedli kinetične eksperimente konjugacije raloksifena z mikrosomi, pridobljenimi iz jeter in tankega črevesa prašiča in človeka. S tem modelom smo ugotovili, da je bila kinetika konjugacije raloksifena v prašičjih črevesnih mikrosomih v veliki meri podobna človeški encimski kinetiki. Rezultati te raziskave so bili objavljeni s povzetkom v **Farmaceutskem vestniku, 2008** in s predavanjem na **7. Evropskem Simpoziju Farmaceutske tehnologije in biodostavnih sistemov v Ljubljani, 2008**. S temi eksperimenti smo potrdili ustreznost modela, ki uporablja vitalno sluznico tankega črevesa prašiča namesto človeške za naše nadaljnje študije transporta in metabolizma raloksifena v tankem črevesu. Poleg tankega črevesa, smo konjugacijo raloksifena preučevali tudi v mikrosomih človeških jeter, črevesa, ledvic in pljuč. Ugotovili smo, da je intrinzični očistek najvišji pri inkubaciji raloksifena s črevesnimi mikrosomi, sledi intrinzični očistek določen na jeternih mikrosomih, temu pa intrinzični očistek na ledvičnih mikrosomih. V pljučnih mikrosomih je metabolizem potekal v zelo majhnem obsegu. Po ekstrapolaciji intrinzičnih očistkov na celotni organ smo ugotovili, da k metabolizmu raloksifena največ prispevajo jetra, sledi tanko črevo, metabolični očistek ledvic pa smo ocenili za približno desetkrat nižjega od črevesnega očistka. Poleg preučevanja metabolizma na združenih jetrnih mikrosomih, smo poskuse izvedli tudi na človeških jetrnih mikrosomih genotipiziranih za prisotnost polimorfizma UGT1A1\*28 (ang. [uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A1\\*28](#)). S poskusi na tem modelu smo opazili, da se kinetika konjugacije raloksifena med posameznimi izoformami precej razlikuje. Pri mikrosomih homozigotov za alel UGT1A1\*1 je bil intrinzični očistek najvišji, pri mikrosomih homozigotov za alel UGT1A1\*28 pa najnižji, medtem ko je pri mikrosomih heterozigotov očistek dosegal vmesne vrednosti. Pomen tega odkritja za farmakokinetiko in na farmakodinamiko raloksifena smo potrdili tudi v klinični raziskavi.

Eden od ciljev projekta je bil tudi ugotoviti mehanizme transporta raloksifena in njegovih metabolitov skozi biološke membrane. Raloksifen sam ima zelo nizko biološko uporabnost (2%), v centralnem krvnem obtoku ga je manj kot 1% v nekonjugirani obliki, vse ostalo so raloksifenovi konjugati z glukuronsko kislino, od katerih se odceplja prost raloksifen, ki je edini farmakološko učinkovit. Konjugati raloksifen-6-β-glukuronid (M1), raloksifen-4'-β-glukuronid (M2) ter raloksifen 4'-β-6-β-diglukuronid (M3) so transportne oblike za raloksifen, zato smo natančno preučevali ne samo transport raloksifena, temveč tudi transport teh metabolitov skozi biološke membrane. Še preden smo pričeli s poskusi, smo morali te metabolite sintetizirati, ker vsi niso bili komercialno dostopni. Pridobili smo jih z biosintezo z bakterijo iz rodu *Streptomyces*. Ko smo imeli na razpolago zadostno količino metabolitov, smo izvedli poskus permeabilnosti na najenostavnejšem modelu za preučevanje pasivne permeabilnosti, to je na PAMPA membrani (ang. parallel artificial membrane permeability assay), kjer smo ugotovili, da imata M1 in M2 precej nižjo permeabilnost kot raloksifen, permeabilnost M3 pa je še nižja. To je še dodatni dokaz, da so za prenos metabolitov skozi biološke membrane potrebni prenašalci. Vpliv slednjih pa smo preučevali na modelih za študije transporta: na membranskih pripravkih insektnih Sf9 celic s povečano ekspresijo prenašalcev, CHO celicah s povečano ekspresijo OATP1B1 (ang. organic anion transporting polypeptide 1B1) ali OATP1B3, membranskih veziklih Sf9 insektnih celic s povečano ekspresijo MRP2 (ang. multi drug resistance associated protein 2), s celičnima linijama HepG2 in Caco-2, na izoliranem vitalnem tankem črevesu podgane in prašiča ter na vitalnih podganjih jetrnih rezinah.

Z namenom natančne določitve posamičnih prenašalcev odgovornih za privzem in izločanje raloksifenovih zvrsti smo uporabili najenostavnejši model, membranske pripravke insektnih Sf9 celic s povečano ekspresijo prenašalcev. Ker ta eksperimentalni model deluje na principu ATPazne aktivnosti ABC (ang. ATP-binding cassette) prenašalcev, smo lahko z njim določali le substratno specifičnost za MRP1, MRP2, MRP3, BCRP (ang. breast cancer resistance protein)

in Pgp (ang. P-glycoprotein), ne pa tudi za OATP prenašalec, saj slednji nima ATPazne aktivnosti. S tem modelom smo ugotovili, da raloksifen in M2 vstopata v interakcijo z vsemi testiranimi prenašalci, M1 in M3 pa z MRP1, MRP3, BCRP in Pgp.

Za preučevanje prenašalcev odgovornih za privzem raloksifenovih zvrsti smo uporabili CHO celice s povečano ekspresijo OATP1B1 ali OATP1B3 prenašalcev. Ta *in vitro* model je pokazal, da so raloksifen, M2 in M3 substrati za OATP1B1, metabolita M2 in M3 pa sta tudi substrata za OATP1B3. Za preučevanje transporta z MRP2 prenašalcem na enostavnem *in vitro* modelu smo uporabili membranske vezikle Sf9 insektnih celic s povečano ekspresijo MRP2. Ta *in vitro* model je pokazal, da M2 in M3 inhibirata privzem tipičnega MRP2 substrata estradiol-17 $\beta$ -glukuronida v vezikle in bi lahko posledično bila substrata za preiskovani prenašalec.

Zgoraj omenjene predpostavke o prenašalcih smo potrdili z eksperimenti na Caco-2 celični liniji, ki jo uporabljamo kot model za transport učinkovin skozi epitelij tankega črevesa. Pri teh poskusih smo uporabljali specifične inhibitorje prenašalcev in ugotavljali njihov vpliv na efluksno razmerje raloksifena in njegovih metabolitov. Z uporabo specifičnih inhibitorjev za prenašalce Pgp, MRP, BCRP in OATP (verapamil, MK571, fumitremorgin C, DIDS (4,4'-diizotiociano-2,2'-stilbendisulfonska kislina), v istem vrstnem redu) smo ugotavljali prispevek posameznega prenašalca k transportu raloksifena. Ugotovili smo, da je prisotnost inhibitorja za Pgp zmanjšala efluksno razmerje, kar potrjuje že s Sf9 pripravki zastavljeno hipotezo, da je raloksifen substrat za Pgp prenašalec. V primeru, ko smo Caco-2 celicam dodali inhibitor MRP prenašalcev, pa je efluksno razmerje le rahlo zraslo, kar kaže na možno vpletenost tako privzemnih prenašalcev MRP1 ali MRP3 kot tudi izločevalnega MRP2 prenašalca. Po drugi strani pa smo opazili značilen porast efluksnega razmerja pri dodatku inhibitorja OATP prenašalca, kar kaže na to, da je raloksifen substrat tudi za privzemni prenašalec OATP. Pri dodatku BCRP inhibitorja pa ni prišlo do spremembe efluksnega razmerja.

Pomen teh prenašalcev smo preverili tudi na HepG2 celični liniji, ki se uporablja kot model za preučevanja transporta v hepatocite, ki predstavljajo pri absorpciji raloksifena drugo oviro, takoj za steno tankega črevesja. Pri teh poskusih smo po inkubaciji z raloksifenom merili vplive inhibitorjev prenašalcev na znotrajcelično koncentracijo raloksifena. Ugotovili smo, da inkubacija raloksifena s tipičnim inhibitorjem MRP prenašalcev (MK571) povzroči povečanje znotrajcelične koncentracije, kar ravno tako potrjuje prej nakazano hipotezo, da je raloksifen substrat za MRP prenašalce. Nadalje, s HepG2 celicami in s tipičnim Pgp inhibitorjem (PSC833) smo dokazali, da je tudi v jetrih raloksifen substrat za Pgp, saj se je znotrajcelična koncentracija v prisotnosti tega inhibitorja prav tako kot pri MRP inhibitorju značilno povečala. Po drugi strani pa smo v primeru inhibicije OATP prenašalca z DIDS ugotovili značilno zmanjšanje intracelularne koncentracije raloksifena, kar je dokaz za to, da je raloksifen substrat za ta privzemni prenašalec. Pri uporabi Ko143, ki je tipični inhibitor BCRP prenašalca, ni prišlo do značilnega povišanja znotrajceličnih koncentracij.

*In vivo* pomen teh prenašalcev na serumske koncentracije raloksifena in na njegove terapevtske učinke smo dokazali v klinični študiji, kjer smo odkrili, da prisotnost polimorfizma 388A>G v genu za OATP1B1 značilno poveča koncentracije raloksifenovih zvrsti in posledično terapevtske učinke. Prav tako se je pokazal značilen vpliv prisotnosti polimorfizma 3435C>T v genu za Pgp prenašalec, kjer smo izmerili značilno večje povečanje kostne gostote kolka in opazili tudi trend povečanja serumskih koncentracij raloksifenovih zvrsti. Več o teh ugotovitvah in procesu objave bo navedeno kasneje v tem tekstu.

Kot bolj kompleksna modela, kjer potekata hkrati tako transport kot tudi metabolizem raloksifena, smo uporabili podganje in prašičje črevesne rezine vpete v difuzijske celice tipa Sweetana Grass, ki nam omogočajo merjenje vitalnosti tkiva med eksperimentom in izvajanje poskusa v privzemni in izločevalni smeri. Na izoliranem tankem črevesu prašiča in podgane smo ugotovili, da sta črevesji obeh živali zelo visoko metabolno aktivni, kar kaže na pomembno funkcijo črevesne sluznice kot mesta intenzivnega predsystemskega metabolizma. Tako pri podgani kot tudi pri prašiču smo opazili zelo nizko efluksno razmerje (kvocient permeabilnosti v smeri izločanja in permeabilnosti v smeri privzema) pri podgani in pri prašiču, kar se ujema s prej predpostavljenim pomenom privzemnih prenašalcev za aktivni privzem oz. absorpcijo raloksifena iz črevesnega lumna prek MRP1, MRP3 in OATP prenašalcev.

Na modelu podganjih jetrnih rezin smo ugotovili intenzivni metabolizem raloksifena. Tudi ta kompleksni *in vitro* jetrni model, kjer smo tanke rezine inkubirali v prisotnosti prej omenjenih inhibitorjev prenašalcev, nam je potrdil pomen privzemnega prenašalca OATP ter izločevalnih prenašalcev Pgp in MRP. Hkrati smo tudi opazili, da se je v prisotnosti inhibitorjev prenašalcev značilno zmanjšala znotrajcelična koncentracija metabolitov (z izjemo PSC833, kjer nismo odkrili signifikantne spremembe glede na kontrolo). Ta pojav zmanjšanja koncentracije glukuronidov je bržkone posledica upočasnjenega transporta raloksifena in metabolitov, kar je upočasnilo metabolično reakcijo nastanka glukuronidov in kar potrjuje vse bolj splošno sprejeto dejstvo o tesni sklopitvi transporta in metabolizma.

Dobršen del časa in pozornosti smo v naših raziskavah namenili tudi razvoju analiznih metod za

določanje koncentracij raloksifena in njegovih metabolitov v kompleksnih bioloških matriksih. To je bil namreč prvi predpogoj za kvantitativno preučevanje procesov metabolizma in transporta raloksifena ter za ugotavljanje koncentracij raloksifena in metabolitov v bioloških vzorcih. Razvili smo več metod za kvantifikacijo raloksifena ter njegovih metabolitov M1, M2 in M3 v različnih bioloških vzorcih iz *in vitro* eksperimentov in za kvantifikacijo raloksifenovih zvrsti v človeškem serumu in urinu. Za razvoj teh metod smo potrebovali analitske standarde za metabolite M1, M2 in M3, ki so bili komercialno nedostopni. Standarde metabolitov smo sintetizirali z inkubacijo raloksifena z bakterijo *Streptomyces* sp. ATCC 55043. Rezultati razvoja analitske metode za določanje raloksifena, M1 in M2 v serumu, ki so bili objavljeni v reviji **Journal of Chromatography B 2007**, so pritegnili pozornost strokovnjakov s tega področja, tako da smo dobili vabilo za predavanje na ugledni mednarodni konferenci **Ehrlich II: Magic Bullets v Nuernbergu novembra 2008** (Trontelj J. et al., Ehrlich II, 2008).

Ker je bil raloksifen pred kratkim uvrščen na seznam prepovedanih zdravil pri športnikih, smo razvili tudi analitsko metodo za določanje raloksifena in njegovih metabolitov v urinu. Rezultate razvoja metode smo v obliki izvirnega znanstvenega članka z naslovom **Determination of raloxifene and its glucuronides in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay poslali v revijo Journal of Chromatography B**.

Kot je bilo načrtovano, smo pridobili tudi serumske vzorce iz klinične študije na 47 pacientkah z osteoporozo na terapiji z raloksifenom. Uspešnost zdravljenja je bila ocenjena z meritvijo kostne gostote, ultrazvočnih parametrov petnice in označevalcev kostne premene na začetku ter po enem letu terapije. Iz krvi smo izolirali DNA in določili vrsto genotipa za metabolični encim UGT1A1 in prenašalce OATP1B1, OATP1B3, MRP2 in Pgp. V istih krvnih vzorcih smo določili tudi koncentracije raloksifena in metabolitov M1, M2 in M3. V skladu z našimi zaključki poskusov z *in vitro* modeli se je po statistični analizi korelacije pokazala pomembna povezava med prisotnostjo polimorfizma UGT1A1\*28 v homozigotnem stanju – takih je med belci od 10-13% - in koncentracijami celokupnega raloksifena v krvi in sicer so imeli homozigoti \*28/\*28 kar dvakrat višjo izpostavljenost celokupnemu raloksifenu kot heterozigoti in homozigoti za divji tip (\*1/\*28 in \*1/\*1). Izsledke te raziskave smo objavili v ugledni reviji **British Journal of Clinical Pharmacology, 2009**, kjer smo potrdili tudi značilen pozitiven vpliv tega polimorfizma na klinični učinek raloksifena, to je na povečanje kostne gostote v kolku. Na področju vpliva genotipa prizemnih prenašalcev se je pokazalo, da prisotnost polimorfizma 388A>G v genu za OATP1B1 vpliva na višje koncentracije raloksifenovih zvrsti v serumu in posledično tudi na izboljšanje kliničnih učinkov zdravila. Homozigoti za polimorfizem 388A>G v genu za OATP1B1 imajo približno dvakrat višje koncentracije raloksifenovih zvrsti od heterozigotov in homozigotov za divji tip alela in s tem tudi večje terapevtske učinke, saj je korelacijska analiza pokazala, da višje koncentracija raloksifenovih zvrsti korelirajo z večjim znižanjem serumskih koncentracij fragmentov C-terminalnega telopeptida kolagena tipa I in povečanjem mineralne kostne gostote vratu stegenice. Polimorfizma 521T>C v genu za prenašalec OATP1B1 in int7C>G v genu za prenašalec OATP1B3 nimata značilnega vpliva na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena. Rezultate tega dela smo poslali v obliki izvirnega znanstvenega članka z naslovom **Organic anion transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 and their genetic variants influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of raloxifene v revijo Journal of Bone and Mineral Research**. Na področju ekskretornih prenašalcev se je pokazalo, da polimorfizem 3435C>T v genu za Pgp sicer statistično ne vpliva na koncentracije raloksifenovih zvrsti v serumu, opaziti pa je trend višjih koncentracij nekaterih raloksifenovih zvrsti pri pacientih z več kopijami polimorfne alela. Vpliv genotipa Pgp na farmakodinamske učinke pa je pokazal, da prisotnost polimorfizma povzroči večje povišanje mineralne kostne gostote kolka. Preučevanje vpliva polimorfizma 2972C>T v genu za MRP2 prenašalec na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena ni pokazalo pozitivnih rezultatov.

Če povzamemo, je raloksifen učinkovina z visokim obsegom predsistemskega metabolizma, poleg tega pa k omejitvi absorpcije doprinese Pgp ekskretorni prenašalec, ki raloksifen izloča nazaj v črevo. Poleg tega ekskretornega prenašalca, ki deluje v nasprotni smeri absorpcije, pa na dispozicijo raloksifena značilno vpliva tudi OATP, ki raloksifen v absorptivni smeri prenaša v enterocite. Iz enterocitov se raloksifen in njegovi metaboliti izločajo deloma v portalno kri, deloma pa nazaj v črevo, kjer se metaboliti cepijo z  $\beta$ -glukuronidazo do prostega raloksifena, ki je ponovno na razpolago za absorpcijo. Del raloksifenovih zvrsti, ki preide v portalno kri, se absorbira v hepatocite. Raloksifen v hepatocite prehaja pasivno in preko prenašalca OATP1B1. S pomočjo tega prenašalca v hepatocite vstopata tudi metabolita M2 in M3, ki pa sta substrata tudi za OATP1B3 jetrni prenašalec. S PAMPA poskusom smo ugotovili, da je metabolit M1 nekoliko bolj permeabilen od M2 in M3, kar bi lahko deloma razložilo vzrok, zakaj za M1 nismo ugotovili prenašalca, s katerim bi se lahko prenašal ali pa je morda M1 substrat za neki drugi prizemni prenašalec. Iz hepatocitov se raloksifen in njegovi metaboliti izločajo v sinusoidalno kri in v žolč. Pokazalo se je, da se raloksifen v žolč prenaša s pomočjo Pgp

prenašalca, v sinusoidalno kri pa verjetno preko MRP1 in/ali MRP3 prenašalcev. Ista prenašalca sta najverjetneje udeležena tudi pri prenosu M1, M2 in M3. V žolč se metabolita M2 in M3 prenašata s pomočjo prenašalca MRP2, morda tudi prenašalca BCRP. Po izločanju raloksifena in njegovih metabolitov v žolč, se metaboliti v črevesu cepijo do raloksifena in so zopet na razpolago za ponovno absorpcijo.

Sinergistična uporaba različnih *in vitro* eksperimentalnih modelov rastoče kompleksnosti nam je dala vpogled v procese metabolizma in transporta raloksifena v več organih. Poleg *in vitro* raziskav pa smo z *in vivo* študijo pokazali, da posamezni polimorfizmi v metabolnih encimih in prenašalcih vplivajo na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena in lahko pojasnijo velik del variabilnosti.

Raziskava na primeru raloksifena je lep primer translacijske medicine, ki variabilnost procesov in učinkov *in vivo* pojasnjuje z *in vitro* eksperimenti.

#### 4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>4</sup>

Tekom trajanja projekta smo dosegli večino zastavljenih ciljev, saj smo z »*in vitro*« modeli v veliki meri pojasnili ključne procese za farmakokinetiko raloksifena, to sta transport in metabolizem. Nadalje, identificirali smo polimorfizem v genu *UGT1A1\*28* kot potencialno pomemben dejavnik, ki vpliva na procese metabolizma in transporta raloksifena. To hipotezo smo s farmakogenetsko klinično študijo na preiskovankah z osteoporozo na terapiji z raloksifenom tudi uspešno potrdili. S tem smo odkrili enega od genetskih dejavnikov, ki so vzrok za veliko variabilnost v farmakokinetiki raloksifena. V nadaljevanju dela na projektu smo raziskovali mehanizme transporta raloksifena in njegovih metabolitov skozi biološke membran tudi na drugih »*in vitro*« modelih, saj z »*in vitro*« modeli, ki so bili opisani v prijavi projekta nismo uspeli razložiti omenjenega mehanizma. Poleg tega smo identificirali še druge dejavnike, ki vplivajo na variabilnost v farmakokinetiki raloksifena, kot so polimorfizmi v genih za OATP1B1 in Pgp.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>5</sup>

Zastavljeni časovni načrt uresničevanja posameznih ciljev znotraj projekta oz. njihovo zaporedje smo nekoliko spremenili. Poskuse z »*in vitro*« modeli smo izvajali hkrati z analizo serumskih vzorcev iz klinične študije na pacientkah z osteoporozo. Najpomembnejši razlog za to pospešitev je bil potencialna nestabilnost že odvzetih krvnih vzorcev, ki bi se s časom (kljub hranjenju v zamrznjeni obliki) lahko degradirali in postali s tem neuporabni.

Med našim delom so se pojavili novi izzivi, ki so terjali nekoliko drugačne pristope, kot smo jih opredelili v prijavi projekta. Spoznali smo, da je transport in metabolizem raloksifena zelo težko preučevati ločeno v kompleksnem sistemu, kot je npr. izolirano tanko črevo. Zato smo morali poseči po dodatnem naboru enostavnejših »*in vitro*« sistemov, kot so celice HepG2 in Caco-2, membrane z bakulovirusom transficiranih insektnih celic, CHO celice s povečano ekspresijo OATP1B1 ali OATP1B3 in vezikli insektnih Sf9 celic s povečano ekspresijo MRP2. Spremenil se je tudi način pridobivanja metabolitov raloksifena, saj smo ugotovili, da se v serumih žensk poleg M1 in M2 nahaja tudi M3, ki ga s pomočjo mikrosomov ni bilo mogoče pridobiti. V nadaljevanju smo za pridobivanje metabolitov uporabili bakterije *Streptomyces* sp. Kot dodaten kompleksen model smo poleg izoliranega tankega črevesa uporabili tudi podganje jetrne rezine.

Tekom raziskave smo se poleg vpliva polimorfizma UGT1A1 na metabolizem raloksifena odločili raziskati tudi vplive polimorfizmov v naslednjih prenašalcih: OATP1B1, OATP1B3, MRP2 in Pgp.

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

Znanstveni rezultat		
1.	Naslov	SLO Razvoj in validacija LC-MS/MS metode za določevanje raloksifena in njegovih

		metabolitov v človeški plazmi	
	ANG	Development and validation of a LC-MS/MS assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma	
Opis	SLO	Sintetizirali smo standarde metabolitov s pomočjo rekombinantnih človeških encimov, jih izolirali, kromatografsko očistili in karakterizirali z LC-MS/MS. Razvili in validirali smo metodo, ki omogoča kvantifikacijo raloksifena in obeh metabolitov v samo 500 mikrolitrih plazme ali seruma z limito kvantifikacije za raloksifen 88 pg/mL.	
	ANG	Raloxifene glucuronide standards were synthesized by human recombinant enzymes and isolated, purified and characterized by LC-MS/MS. The developed method was validated for an accurate and precise quantification of raloxifene and its two glucuronides in only 500 microliters of human plasma or serum with a limit of quantification for raloxifene of just 88 pg/mL.	
Objavljeno v		TRONTELJ, Jurij, BOGATAJ, Marija, MARC, Janja, MRHAR, Aleš. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2007, vol. 855, no. 2, str. 220-227	
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID		2107505	
2.	Naslov	SLO	Predsistemski metabolični očistek raloksifena v steni tankega črevesa in v jetrih
		ANG	Raloxifene pre-systemic metabolic clearance in the intestinal wall and in the liver.
Opis	SLO	Transport in predsistemski metabolizem raloksifena do sedaj še nista bila zadovoljivo raziskana, kljub temu, da sta ključnega pomena za njegovo farmakokinetiko. Pri našem delu smo uporabili človeške in prašičje jetrne in črevesne mikrosome ter difuzijske celice z vitalno sluznico tankega črevesa prašiča. Ugotovili smo veliko podobnost v kinetiki konjugiranja raloksifena pri prašičjih in človeških črevesnih mikrosomih in zelo visok metabolični očistek tako v jetrnih kot tudi v črevesnih mikrosomih, s čimer smo razložili zelo nizko biološko uporabnost (<2%) in počasno absorpcijo raloksifena.	
	ANG	Until now, raloxifene transport and metabolism have not been studied adequately, even though they strongly affect raloxifene pharmacokinetics. Therefore, human and porcine liver and intestinal microsomes and diffusion chambers were used to address this issue. The results showed a pronounced similarity between human and porcine raloxifene conjugation kinetics in intestinal microsomes and a very high metabolic clearance both in liver and intestinal microsomes. Our results explain the extremely low bioavailability of raloxifene (<2%) and its slow intestinal absorption.	
Objavljeno v		TRONTELJ, Jurij, BOGATAJ, Marija, ŽAKELJ, Simon, MRHAR, Aleš. V: MRHAR, Aleš (ur.), BAUMGARTNER, Saša (ur.). 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, September 18-20, 2008, Hotel Mons, Ljubljana, Slovenia : Proceedings from the Symposium, (Farm. Vestn., 59, special issue). Ljubljana: Slovenian Pharmaceutical Society, 2008, str. 59-60.	
Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
COBISS.SI-ID		2382705	
3.	Naslov	SLO	Določanje raloksifena in njegovih glukuronidov v človeški plazmi z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in masnim spektrometrom
		ANG	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its two glucuronide metabolites in human plasma.
Opis	SLO	Razvili in validirali smo metodo za določevanje raloksifena in njegovih glukuronidov M1 in M2 v človeški plazmi in serumu, ker je to nujen pogoj za nadaljnje raziskave farmakokinetike raloksifena. Metoda temelji na čiščenju vzorcev z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) in na kvantifikaciji s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z masnim spektrometrom (LC-MS-MS).	
	ANG	In order to study raloxifene pharmacokinetics in vivo, a new assay was developed and validated for determination of raloxifene and its two metabolites M1 and M2 in human plasma and serum. The method is based on solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography with tandem	

		mass spectrometry (LC-MS-MS).
	Objavljeno v	TRONTELJ, Jurij, BOGATAJ, Marija, MARC, Janja, MRHAR, Aleš. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its two glucuronide metabolites in human plasma and serum, invited presentation at EHRlich-2nd World Conference on Magic Bullets, Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich: program. Nürnberg, Germany, October 3-5, 2008.
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)
	COBISS.SI-ID	2415729
4.	Naslov	<i>SLO</i> Vpliv polimorfizma UGT1A1*28 na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena <i>ANG</i> Effect of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics
	Opis	<i>SLO</i> Osebe z UGT1A1*28 genotipom izkazujejo dvakrat višje koncentracije raloksifena kot hetero- in homozigoti z divjim tipom alela. To pomeni, da je zelo verjetno, da UGT1A1*28 polimorfizem značilno vpliva na farmakokinetiko raloksifena. Pokazalo se je tudi, da imajo osebe z *28 homozigotom bistveno višjo mineralno gostoto po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom <i>ANG</i> Subjects with UGT1A1*28 genotype exhibited a twofold higher raloxifene exposure compared to hetero- and homozygotes for the wild-type allele. This indicates that raloxifene pharmacokinetics is very likely affected by the UGT1A1*28 polymorphism. It was also demonstrated that *28 homozygotes gained a significantly greater increase in hip bone mineral density after 12 months of raloxifene treatment.
	Objavljeno v	TRONTELJ, J., MARC, J., ZAVRATNIK, A., BOGATAJ, M., MRHAR, A.. Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. Br. J. Clin. Pharmacol., 2009, 67(4), 437-444.
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	2510705
5.	Naslov	<i>SLO</i> Matematični model praznjenja pelet iz želodca v stanju na tešče <i>ANG</i> Gastric emptying of pellets under fasting conditions: a mathematical model
	Opis	<i>SLO</i> V članku smo razvili dvojni Weibullovo model, s katerim je mogoče opisati zelo različne vzorce praznjenja pelet iz želodca. Ta model omogoča povezavo procesa praznjenja večnotnih dostavnih sistemov iz želodca s procesi sproščanja, absorpcije in presistemskega metabolizma. Še več, razviti koncept je mogoče prenesti tudi na enoenotne farmacevtske oblike, kot je naprimer filmsko obložena tableta, v kateri se daje raloksifen. S pomočjo tega pristopa bo mogoče razviti biorelevantne in vitro teste sproščanja, ki bodo omogočali boljšo napovedljivost obnašanja dostavnih sistemov v pogojih in vivo. <i>ANG</i> In the article a double Weibull model was developed to describe different patterns of gastric emptying of pellets. This model connects process of gastric emptying of multiunit drug delivery systems with processes of drug release, absorption and presystemic metabolism. Moreover, this concept can be successfully applied also to singleunit drug delivery systems, such as film-coated tablet in which raloxifene is administered. By the aid of the developed approach, biorelevant in vitro drug release test will be developed to improve prediction of drug delivery systems behaviour in in vivo situations.
	Objavljeno v	LOCATELLI, Igor, MRHAR, Aleš, BOGATAJ, Marija. Gastric emptying of pellets under fasting conditions: a mathematical model. Pharm. res., 2009, vol. 26, no. 7, str. 1607-1617
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	2517361

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat	
1.	Naslov	<i>SLO</i> A. Mrhar, Sopredsednik 8. Centralnoevropskega simpozija iz farmacevtske tehnologije, Univerza Karla-Franzena, 16.-18. september 2010, Graz, Avstrija

	ANG	A. Mrhar, Co-president of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, Karl-Franzens-University, 16-18 September 2010, Graz, Austria
Opis	SLO	ZIMMER, Andreas, MRHAR, Aleš, KHINAST, Andreas, ROBLEGG, Eva. [Introduction]. V: 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, September 16th-18th, Graz, Austria. Abstracts of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, September 16th-18th, Graz, Austria
	ANG	ZIMMER, Andreas, MRHAR, Aleš, KHINAST, Andreas, ROBLEGG, Eva. [Introduction]. V: 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, September 16th-18th, Graz, Austria. Abstracts of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, September 16th-18th, Graz, Austria
Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja	
Objavljeno v	Scientia Pharmaceutica, vol. 78, iss. 3. Wien: Österreichischer Apothekerverlag, 2010, str. 519.	
Tipologija	1.20 Predgovor, spremna beseda	
COBISS.SI-ID	2991217	
2. Naslov	SLO	A. Mrhar, Urejanje posebne številke revije International Journal of Pharmaceutics
	ANG	A. Mrhar, Editing special issue of International Journal of Pharmaceutics
Opis	SLO	Urejanje številke revije z naslovom Challenges in Nano- Micro- and Macro-Systems, Int.j.pharm. 3. november 2009, vol. 381, št 2. Številka revije z izbranimi in recenziranimi najboljšimi prispevki iz 7. Centralnoevropskega simpozija iz farmacevtske tehnologije in biodostavnih sistemov, Ljubljana, september 2008
	ANG	Editing the issue of the journal titled Challenges in Nano- Micro- and Macro-Systems, Int.j.pharm. 3 November 2009, Vol. 381, No. 2. Issue of the journal containing best peer-reviewed full-length articles selected from the contributions presented at the 7th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biodelivery Systems, Ljubljana, September 2008
Šifra	C.03 Vabljeni urednik revije (guest-associated editor)	
Objavljeno v	International journal of pharmaceutics. Mrhar, Aleš (gostujoči urednik 2009). [Print ed.]. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1978-. ISSN 0378-5173	
Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo	
COBISS.SI-ID	3087631	
3. Naslov	SLO	Projekti za farmacevtsko industrijo
	ANG	Projects for pharmaceutical industry
Opis	SLO	V sodelovanju s strokovnjaki iz farmacevtskih družb Krke, d.d. (Novo mesto, Slovenija), Leka, d.d. (Ljubljana, Slovenija) in Polpharma, S.A. (Starograd Gdanski, Poljska) se vpeljujejo raziskave sproščanja, presistemskega metabolizma in permeabilnosti učinkovin kot "predformulacijske in formulacijske študije", ki bistveno pripomorejo k skrajšanju časa potrebnega za razvoj novih generičnih zdravil ter k zmanjšanju števila potrebnih kliničnih raziskav (bioekvivalenčnih študij) na zdravih prostovoljcih.
	ANG	In collaboration with the experts from pharmaceutical companies Krka (Novo mesto, Slovenia), Lek (Ljubljana, Slovenia) and Polpharma (Starograd Gdanski, Poland) drug dissolution, presystemic metabolism and permeability studies are being implemented as a part of preformulation and formulation studies which significantly shorten the time needed for the development of new generic drug products and reduce the number of necessary clinical trials (bioequivalence studies) on healthy volunteers.
Šifra	F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	



	Objavljeno v	Interna poročila za naročnike
	Tipologija	2.13 Elaborat, predstudija, študija
	COBISS.SI-ID	5033247
4.	Naslov	SLO Vloga terapevtskega spremljanja koncentracij pri optimizaciji farmakoterapije izbranih antiepileptikov
		ANG The role of therapeutic drug monitoring in optimizing pharmacotherapy of selected antiepileptics
	Opis	SLO Namen terapevtskega spremljanja koncentracij pri zdravljenju epilepsije je obvladovanje epileptičnih napadov s pomočjo izmerjenih plazemskih koncentracij antiepileptikov. Terapevtsko spremljanje koncentracij omogoča določitev individualne terapevtske koncentracije antiepileptika, hkrati pa lahko z uporabo populacijske farmakokinetike ocenimo tudi posameznikove individualne farmakokinetične parametre. Predstavljene populacijske farmakokinetične modele za karbamazepin, valprojsko kislino in topiramato lahko uporabimo za optimizacijo režima odmerjanja omenjenih zdravil v rutinski obravnavi bolnikov.
		ANG The goal of the therapeutic drug monitoring in the management of epilepsy is to control seizures with the assistance of measured antiepileptic drug concentration. Beside estimation of patients' individual therapeutic concentration therapeutic drug monitoring can serve also for individual patients' pharmacokinetic parameters estimation by the help of the population pharmacokinetics. The work presents the development of carbamazepine, valproic acid and topiramate population pharmacokinetic models which enable optimization of dosage regimen in routine care of individual patients.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v	VOVK, T., MRHAR, A. et al. The role of therapeutic drug monitoring in optimizing pharmacotherapy of selected antiepileptics. In: HINCAL, Atila A. (ur.), ČELEBI, Nevin (ur.), NILÜFER, Yüksel (ur.). 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences. New Progresses and Challenges in Pharmaceutical Sciences. TÜFTAD Pharmaceutical Sciences Series : 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences. [S.l.: s.n.], 2009, str. 309-323.
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)
COBISS.SI-ID	2695281	
5.	Naslov	SLO Umeščanje novih strategij zdravljenja raka v zdravstveni sistem
		ANG Uptake of new cancer treatment strategies by the health care system
	Opis	SLO Doktorska disertacija predstavlja doprinos na naslednjih področjih: Primerjalno je bilo proučeno umeščanje novih onkoloških zdravil v zdravstveni sistem v Sloveniji in drugih evropskih državah. Ovrednoteni so bili klinični in ekonomski izidi pri cepljenju proti HPV za preprečitev raka na materničnem vratu in pri določanju genotipa UGT1A1 za preprečitev pojave hudih nevtropenij pri zdravljenju bolnikov z rakom debelega črevesa in danke, ki prejemajo irinotekan. Proučeno je bilo kako slovenska splošna populacija vrednoti korist podaljšanja življenja.
		ANG Doctoral thesis brings contributions on the following areas: A comparative analysis of the uptake of new oncology drugs in Slovenia and selected European countries was performed. Clinical and economic outcomes evaluation of new technologies that have recently emerged in cancer therapy, specifically HPV vaccination to prevent cervical cancer and UGT1A1 genotyping to prevent severe neutropenia occurrence during colorectal cancer therapy with irinotecan, was carried out. The issue how the general population in Slovenia values survival prolongation was explored.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom
Objavljeno v	OBRADOVIĆ, Marko. Umeščanje novih strategij zdravljenja raka v zdravstveni sistem = Uptake of new cancer treatment strategies by the health care system : [doktorska disertacija]. Ljubljana: [M. Obradović], 2009. 155 str., ilustr., tabele	

	MRHAR, Aleš. Mentor
Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo
COBISS.SI-ID	245243392

## 8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>8</sup>

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>9</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>10</sup>

SLO

Z rezultati naših raziskav smo v veliki meri razjasnili zapletene mehanizme transporta in metabolizma raloksifena in razložili velika nihanja v njegovih farmakokinetičnih parametrih. Utemeljeno pričakujemo, da bodo naši rezultati pomembno prispevali k boljšemu razumevanju absorpcije, metabolizma, distribucije in eliminacije raloksifena. Vpeljali smo nove eksperimentalne pristope z integrirano uporabo več vrst in vitro modelov, s pomočjo katerih smo hkrati preučevali transport in metabolizem v sluznici vitalnega tankega črevesa in v jetrih. Ti modeli so nam dali temeljiti vpogled v dogajanje pri absorpciji ter predsistemskem in sistemskem metabolizmu raloksifena. Še pomembneje pa je, da bomo tak pristop lahko uporabili tudi pri preučevanju in napovedovanju absorpcije in metabolizma ne le raloksifena, ampak tudi drugih zdravil z učinkom prvega prehoda. V okviru tega projekta smo naredili še korak naprej in v raziskave vključili tudi vpliv genetskih faktorjev, ki značilno vplivajo na posameznikov odgovor na aplicirana zdravila. S tem smo prispevali tudi k vse bolj razvijajoči se in aktualni veji znanosti, farmakogenomiki, kjer s pomočjo odkrivanja genetskih lastnosti posameznika lahko prilagodimo farmakoterapijo za doseganje čim večje varnosti in učinkovitosti pri posameznem pacientu.

ANG

The results of the performed research clarify to a large extent the complex raloxifene transport and metabolic processes and provide explanation of the high variability in its pharmacokinetic parameters. We expect our findings to bring a significant contribution to better understanding of absorption, metabolism, distribution and elimination of raloxifene. New experimental approaches were introduced by applying an integrated use of several in vitro models for studying transport and metabolism at the same time in the viable intestinal mucosa and in the liver. These models gave a better insight into the absorption, presystemic and systemic metabolism of raloxifene. Moreover, the same approach can be used later, in studying and predicting the absorption and metabolism of other drugs with first-pass effect. The performed research is also an important step forward because we included in our investigations the study of influences of genetic factors on drug response. These factors significantly alter the response of an individual to drug therapy. By doing so, we significantly contributed to the development of an emerging and ever more interesting science – pharmacogenomics, the ultimate goal of which is to apply the knowledge of individual's genetic characteristics to adjust her/his drug therapy and thus to achieve a safer and more effective treatment.

### 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>11</sup>

SLO

Raziskave v tem projektu in dobljeni rezultati so izrazito usmerjeni k odkrivanju novih in za družbo pomembnih znanj ter zakonitosti na področju »zdravja in znanosti o življenju«, kar je eno izmed štirih najpomembnejših področij, kot jih je definirala Resolucija o nacionalnem raziskovalnem in razvojnem programu za obdobje 2006-2010 (ReNRRP), Uradni list RS, št. 3/2006. Odkritja in spoznanja v okviru tega projekta bodo predstavljala pomemben prispevek k vse bolj razvijajoči se veji znanosti, farmakogenomiki, ki odkriva, kako genetske lastnosti posameznika vplivajo na odziv na aplicirana zdravila. Učinkovina raloksifen, ki je predmet raziskav tega projekta, postaja vse bolj aktualna zaradi na novo odkritega učinkovitega delovanja pri preventivi invazivnega raka dojke ob hkratnem preprečevanju osteoporoze. Obe indikaciji sta zelo pomembni ob upoštevanju naglega povečevanja starejše populacije. S povsem novimi spoznanji na konkretnem področju farmakoterapije z raloksifenom in z novimi in vitro modeli, s katerimi smo raziskovali transport in metabolizma zdravil, s tem projektom in z dobljenimi rezultati vstopamo v sam svetovni vrh znanosti na tem področju. S tem pomembno prispevamo k večji prepoznavnosti in mednarodnemu ugledu Slovenije kot države z

vrhunskimi znanstveniki, ki dosegajo pomembna odkritja v svetovnem merilu.

ANG

The research within this project and the obtained results are especially focused on the discovery of new and socially relevant knowledge in the area of "health and life sciences". This is one of the four key research areas as defined by the Resolution of national research and development program for the 2006-2010 period (ReNRRP), Uradni list RS, št. 3/2006. The results of the project will significantly contribute to the development of an emerging science of pharmacogenomics, which studies the relationship between the individuals genetic characteristics and their responses to drug therapy. The interest in the investigated drug raloxifene is increasing because its primary indication (treatment of osteoporosis) has been broadened by a newly discovered preventive action on invasive breast cancer. Both indications are even more relevant when rapid increase of the elderly population is considered. The entirely new knowledge about the raloxifene drug therapy and the newly developed experimental approaches for the investigation of drug transport and metabolism that this project provides allow us to claim that Slovenian expertise can equally compete at the highest scientific level within this particular research area. This contributes to the international image of Slovenia as a country with top-level research scientists and highly appreciated scientific achievements.

#### 10. Samo za aplikativne projekte!

**Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni**

Cilj	
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

**Komentar**

**11. Samo za aplikativne projekte!**

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

**Komentar**

--

**12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)**

1.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
4.			
5.			
<b>Komentar</b>			
<b>Ocena</b>			
2.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>



	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		
3.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		

### C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

#### Podpisi:

Aleš Mrhar	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

18.4.2011

**Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/56**

<sup>1</sup> Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

**PRIMER** (v slovenskem jeziku):

**Naslov:** Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

**Opis:** Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

**Objavljeno v:** OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates  $\beta 2$  - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

**Tipologija:** 1.01 - Izvirni znanstveni članek

**COBISS.SI-ID:** 1920113 [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

74-40-20-51-17-BE-A7-7B-5A-59-31-65-3B-8E-05-C1-7A-48-53-89