

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/138



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

(za obdobje 1. 1. 2009 - 31. 12. 2014)

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

|  |  |
|--|--|
| <b>Šifra programa</b>  | P1-0140  |
| <b>Naslov programa</b>   | Proteoliza in njena regulacija<br>Proteolysis and its regulation                                     |
| <b>Vodja programa</b>  | 7561 Boris Turk  |
| <b>Obseg raziskovalnih ur (vključno s povečanjem financiranja v letu 2014)</b>                         | 104569   |
| <b>Cenovni razred</b>  | C  |
| <b>Trajanje programa</b>   | 01.2009 - 12.2014  |
| <b>Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)</b> | 106 Institut "Jožef Stefan"<br>103 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo |
| <b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>  | 1 NARAVOSLOVJE<br>1.05 Biokemija in molekularna biologija  |
| <b>Družbeno-ekonomski cilj</b>   | 13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)                                 |
| <b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>   | 1 Naravoslovne vede<br>1.06 Biologija  |

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

#### 2. Povzetek raziskovalnega programa<sup>1</sup>

SLO

Proteaze so pomembne signalne molekule, udeležene pri številnih

ključnih bioloških procesih, zaradi česar predstavljajo pomembno skupino tarč za farmakološko intervencijo. Glavni cilj našega programa je bil podrobno razumevanje signalnih poti preko katerih proteaze regulirajo fiziološke in patofiziološke procese ter razumevanje interakcij, ki uravnavajo to signalizacijo na molekularnem nivoju, vključno z regulacijo njihove aktivnosti. Ključni poudarek je bil na sledečih temah vključno z (i) razvojem orodij, kjer smo uspešno razvili več novih sond za spremljanje aktivnosti katepsinov in kaspaz, novo proteomsko metodo za identifikacijo specifičnosti proteaz in njihovih substratov in več novih nizkomolekularnih inhibitorjev; (ii) identifikacijo endogenih substratov katepsinov in kaspaz, kot os npr. transmembranski receptorji in adhezijski proteini, kemokini, sirtuin-1 in člani gvanilatnih kinaz, povezanih z membranami; (iii) regulacijo proteaznih z glavnim poudarkom na razumevanju mehanizma avtokatalitske aktivacije katepsinov in na vlogi glikozaminoglikanov pri regulaciji aktivnosti katepsinov, še posebej katepsina K; (iv) vlogo cisteinskih proteaz pri celični smrti in proliferaciji s poudarkom na lizosomotropnih spojinah; (v) vlogo cisteinskih proteaz in njihovih inhibitorjev pri raku, vključno z razvojem novih diagnostičnih in terapevtskih pristopov (inhibitorji, ciljani dostavni sistemi, ...) vključno z izbitjem genov za inhibitorje proteaz; in (vi) vlogo proteaz in inhibitorjev v imunskem sistemu, vključno z revmatoidnih artritidom. Naše rezultate smo objavili v vrhunskih revijah vključno z Nature Nanotechnology, Angew. Chem. Intl. Ed., Nature Commun., Autophagy in EMBO J, kar je vodilo do visoke citiranosti, številnih vabljenih predavanj na mednarodnih konferencah, več nagrad ter tudi 16 doktoratov in številnih diplomah. To tudi kaže, da je bil program zelo aktivno vključen v izobraževalni program v Sloveniji.

ANG

Proteases are extremely important signaling molecules, involved in numerous vital processes and represent an extremely important group of targets for therapeutic intervention. The major goal of our program was to further understand the signalling pathways by which proteases regulate physiological processes in health and disease and to understand interactions governing this signalling at the molecular level, including regulation of their activities. We focused on several topics, including (i) development of tools, where we successfully developed several novel activity-based probes for cathepsins and caspases, a novel proteomic approach for identification of protease specificities and their substrates and several novel small molecule inhibitors; (ii) identification of endogenous physiological substrates of cathepsins and caspases, such as transmembrane receptors and adhesion molecules, chemokines, sirtuin-1, members of membrane associated guanylate kinases; (iii) regulation of protease activity with major focus on understanding the mechanism of autocatalytic processing of cathepsins and on the role of glycosaminoglycans in regulation of cathepsin activity; (iv) role of cysteine proteases in cell death and proliferation with major focus on lysosomotropic compounds; (v) role of cysteine proteases and their inhibitors in cancer, including development of diagnostic and therapeutic approaches (inhibitors for therapy, targeted delivery systems, ...) and gene ablation studies and (vi) role of proteases and inhibitors in immune system, including diseases such as rheumatoid arthritis.

We were extremely successful and published our results in top journals, including in Nature Nanotechnology, Angew. Chem. Intl. Ed., Nature Commun., Autophagy and EMBO J, which resulted in high citation of the works and led to numerous invited talks of program members at international meetings and foreign universities, several awards, and also resulted in 16 PhD thesis and numerous diplomas. The latter clearly shows that the program was also very actively involved in education program in Slovenia.

**3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu, (vključno s predloženim dopolnjenim programom dela v primeru povečanja financiranja raziskovalnega programa v letu 2014)<sup>2</sup>**

SLO

Proteaze so pomembne signalne molekule, udeležene pri številnih ključnih bioloških procesih, zaradi česar predstavljajo pomembno skupino tarč za farmakološko intervencijo. Glavni cilj našega programa je bil podrobno razumevanje signalnih poti preko katerih proteaze regulirajo fiziološke in patofiziološke procese ter razumevanje interakcij, ki uravnavajo to signalizacijo na molekularnem nivoju, vključno z regulacijo njihove aktivnosti. Ključni poudarek je bil na sledečih temah:

1. **Razvoj orodij:** Z EU partnerji smo razvili številne (>80) nove substratopodobne (reverzni pristop) ali kovalentne aktivnostne sonde za cisteinske katepsine in kaspaze. Primernost nekaterih substratnih sond za in vivo uporabo je bila potrjena na živalskih modelih bolezni, vključno z rakom (Hu et al., 2014) in akutnim vnetjem (Caglič et al., 2011). Prav tako smo razvili nove selektivne sonde za kaspazo1 (Kindermann et al., 2010; Datta et al., vložen patent), vključno s prvo fluorescentno sondo za spremljanje vnetja, ki prehaja skozi celično membrano. Druga generacija sond je bila konjugirana s polimeri in nekatere med njimi kažejo zelo dobre preliminarne rezultate in vivo (številni članki v pripravi). Kovalentne sonde pa omogočajo identifikacijo posameznih katepsinov v kompleksnih celičnih vzorcih (Torkar et al., 2012; Repnik et al., v pripravi). Prav tako smo razvili številne inhibitorje, vključno z novim alosteričnim inhibitorjem katepsina K s potencialom za razvoj zdravil (Novinec et al., 2014). Dodatno pa smo razvili nov proteomski pristop za identifikacijo proteaznih substratov in njihove specifičnosti (Vizovišek et al., poslano v tisk).

2. **Določitev endogenih substratov proteaz:** To je ključen korak k razumevanju fiziološke vloge proteaz. Identificirali smo številne nove substrate katepsinov, med katerimi imajo zelo pomembno vlogo transmembranski receptorji in člani CAM družine, ki jih katepsina S in L cepita s celične membrane. Cepitve so bile potrjena in vivo v mišjem modelu raka in služijo kot potencialni bolezenski biopokazatelji (Sobotič et al., v reviziji). Določena je bila tudi struktura proteina EpCAM in razložen pomen cepitev za funkcijo proteina (Pavšič et al., 2014). Ostali pomembni identificirani substrati katepsinov so bili sirtuin1 (Chen et al., 2012), člani gvanilatnih kinaz, povezanih z

membranami (MAGUK) (Ivanova et al., 2011) in kemokini (Repnik et al., v pripravi).

**3. Regulacija proteazne aktivnosti:** Opisali smo mehanizem avtokatalitične aktivacije katepsinov, ki je pokazal, da so katepsini aktivni že kot proencimi (Rozman Pungerčar et al., 2009). Poleg tega smo pokazali povišano izražanje in izločanje katepsinov iz celic ob stimulaciji le-teh s citokini (Caglič et al., 2013). Pomembno smo prispevali tudi k napredku razumevanja regulacije aktivnosti katepsina K (Novinec et al., 2010; 2012; Novinec & Lenarčič, 2012, 2013). Pomembno smo napredovali tudi pri razumevanju vloge steina B v fibrilaciji in tvorbi agregatov, vključno z vlogo v stresnem odgovoru in avtofagiji, predvsem pri nevrodegeneraciji (Čeru et al., 2010, Škerget et al., 2010; Polajnar & Žerovnik, 2012). Odkrili smo tudi pomembno vlogo stefina B v jedru, kjer interagira s histonom H3 (Čeru et al., 2010a).

**4. Vloge cisteinskih proteaz v celični smrti in proliferaciji:** Številne raziskave so bile narejene v povezavi z vlogo lizosomov pri apoptozi. Podrobno smo raziskali mehanizem lizosomotropnih spojin siramezina in LLOMe ter njune vloge pri celični smrti in avtofagiji, pri čemer smo prepoznali razlike ter identificirali od LMPneodvisen mehanizem pri siramezinu (Melo et al., 2010; Hafner Česen et al., 2013; Repnik et al., v pripravi). Poleg tega smo pokazali, da cisteinski katepsini niso ključni za sprožitev apoptoze preko receptorjev smrti (TRAIL, Fas, TNFa).

**5. Vloge cisteinskih proteaz in njihovih inhibitorjev pri raku:** Preučili smo vloge stefina B in cistatina C v mišjem modelu raka mlečne žleze, pri čemer je izbitje gena za stefin B vodilo v zmanjšanje velikosti tumorjev, ni pa vplivalo na razvoj metastaz. Rakaste celice z izbitim genom za stefin B so bile bolj občutljive na oksidativni stres in apoptozo, inducirano z lizosomotropnimi spojinami (Butinar et al., 2013). Izbitje gena za cistatin C je vodilo k hitrejšemu razvoju tumorjev, ki pa so bili bistveno manjši, prav tako pa ni bilo vpliva na metastaze (Završnik et al., v pripravi). V sodelovanju z J. Kosom smo uspešno zavrla razvoj tumorjev in vivo z uporabo inhibitorja katepsina B nitroksolina (Mirkovič et al., revizija), prav tako pa smo identificirali nove organokovinske spojine s citotoksičnim potencialom (sodelava z I. Turel). Razvili smo dva zelo uspešna in učinkovita sistema za dostavo zdravil pri raku in vnetju. Prvi temelji na feriliposomih (Mikhaylov et al., 2011), drugi pa na aktivnem tarčenju liposomov, funkcionaliziranih s selektivnim lipidiranim katepsinskim inhibitorjem (Mikhaylov et al., 2014). Oba sistema sta pokazala izvrstne in vivo lastnosti brez toksičnosti, zaradi česar predstavljata velik potencial za teranostične aplikacije, saj omogočata hkratno tarčenje zdravil in MRI diagnostiko. Za oba sistema sta bila vložena patenta.

**6. Vloga proteaz in njihovih inhibitorjev v imunskem sistemu:** Pokazali smo, da so katepsini prevladujoče proteaze v sinovialnih tekočinah pacientov z revmatoidnim artritisom in osteoartritisom, kjer so bili najverjetneje izločani iz imunskih celic (Požgan et al., 2010). Poleg tega lahko katepsini procesirajo kemokine in tako prispevajo k stimulaciji vnetja, medtem ko katepsini, ki jih izločajo makrofagi, cepijo številne

membraneske proteine in s tem vplivajo na tumorsko signalizacijo (glej zgoraj), katepsin L pa lahko cepi perforin (Konjar et al., 2010). Pri vnetju, induciranimu z LPS, ima stefin B pomembno vlogo, ki ni popolnoma odvisna od katepsinov (Maher et al., 2014), medtem ko je cistatin F povezan z regulacijo katepsina C v NK celicah.

Ostale reference so v prilogi.

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

SLO

Ocenjujem, da smo dosegli večino zastavljenih ciljev projekta. Ker pa so se sredstva od leta 2012 dalje zmanjšala za cca 23% na letni ravni, je iluzorno pričakovati, da je možno s četrtno nižjimi sredstvi narediti vse kar je obljubljeno. Predvsem je bilo narejenih manj celičnih eksperimentov, manj in vivo eksperimentov in manj proteomskih eksperimentov, ki so tudi najdražji, k čemur ni pripomoglo niti dodoatnih cca 20000 EUR (cca 3% prvotne letne vsote, ki jo je dobil program po letni pogodbi), ki smo jih dobili kot eden "uspešnejših" programov v letu 2014, in ki smo jih uporabil v te namene.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v letu 2014<sup>4</sup>

SLO

Ni bilo bistvenih sprememb.

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine<sup>5</sup>

| Znanstveni dosežek |  |
|--------------------|--|
| 1.                 | COBISS ID 25057831 Vir: COBISS.SI  |
| Naslov             | <p>SLO: Feri liposomi kot sistem za dostavo zdravil za ciljanje tumorjev in njihovega mikrookolja, ki ga je mogoče spremljati z MRI</p> <p>ANG: Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment</p>  |
| Opis               | <p>SLO: Tumorsko mikrookolje regulira napredovanje tumorjev in širjenje raka po telesu. Tarčenje celic, ki obkrožajo rakaste celice bi lahko tako pomembno izboljšalo učinkovitost obstoječih terapij zdravljenja raka. V tem članku smo pokazali, da lahko magnetne nanodelce enkapsulirane v liposome pod vplivom zunanjega magneta tarčimo v tumor in tumorsko mikrookolje. Zaradi izrednih T2 kontrastnih lastnosti (<math>r_2=5731286 \text{ s(1) mM(1)}</math>) teh feriliposomov s premerom cca 95 nm smo lahko obenem spremljali dostavo zdravil in vivo na neinvaziven način. Obenem smo uspeli z uporabo feriliposomov napoljenih z zdravilom vizualizirati tarčenje tumorskega mikrookolja in zajetje modelne učinkovine v celice. Z uporabo feriliposomov smo tudi uspešno dostavili inhibitor katepsinov v tumor prsne žleze in njegovo mikrookolje pri miškah in na ta način pomembno zmanjšali velikost tumorja v primerjavi s sistemsko dostavo istega inhibitorja brez tarčenja.</p> <p>The tumour microenvironment regulates tumour progression and the spread of cancer in the body. Targeting the stromal cells that surround cancer cells could, therefore, improve the effectiveness of existing cancer treatments. Here, we show that magnetic nanoparticle clusters encapsulated inside a liposome can, under the influence of an external</p> |

|    |              |          |   |
|----|--------------|----------|---|
|    |              | ANG      | magnet, target both the tumour and its microenvironment. We use the outstanding T2 contrast properties ( $r_2=5731286 \text{ s(1) mM(1)}$ ) of these ferriliposomes, which are cca 95 nm in diameter, to noninvasively monitor drug delivery in vivo. We also visualize the targeting of the tumour microenvironment by the drugloaded ferriliposomes and the uptake of a model probe by cells. Furthermore, we used the ferriliposomes to deliver a cathepsin protease inhibitor to a mammary tumour and its microenvironment in a mouse, which substantially reduced the size of the tumour compared with systemic delivery of the same drug.   |
|    | Objavljeno v |          | Nature Publishing Group; Nature nanotechnology; 2011; Vol. 6, no. 9; str. 594-602; Impact Factor: 27.270; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.27; A": 1; A': 1; WoS: NS, PM; Avtorji / Authors: Mikhaylov Georgy, Mikac Urška, Magaeva Anna A., Itin Volia Isaevich, Naiden Evgeniy P., Psakhye Ivan Sergeevich, Babes Liane, Reinheckel Thomas, Peters Christoph, Zeiser Robert, Bogyo Matthew, Turk Vito, Psakhye Sergej G., Turk Boris, Vasiljeva Olga  |
|    | Tipologija   |          | 1.01 Izvirni znanstveni članek  |
| 2. | COBISS ID    | 25737767 | Vir: COBISS.SI  |
|    | Naslov       | SLO      | Prenos signalov s proteazami  |
|    |              | ANG      | Protease signalling: the cutting edge   |
|    | Opis         | SLO      | Raziskave na področju proteaz so v zadnjem desetletju doživele velik razmah, kar je povezano predvsem z izjemno hitrim razvojem novih tehnologij, kot npr. kvantitativne proteomike in in vivo imaginga ter intenzivne uporabe in vivo modelov. To je vodilo do identifikacije fizioloških substratov in povzročilo premik v načinu razmišljanja od koncepta proteaz kot encimov odgovornih za razgradnjo proteinov do koncepta proteaz kot ključnih signalnih molekul. Kljub temu smo še vedno na začetku razumevanja signalnih poti, ki jih uravnavajo proteaze. Do sedaj smo namreč identificirali le majhen delež pravih fizioloških substratov za omejeno število proteaz. Prav tako ne razumemo dobro niti fiziološke regulacije proteaz, niti ne poznamo povezav z drugimi signalnimi sistemi. Zato so v zbirnem članku osvetljeni trenutni izzivi na področju raziskav proteaz. |
|    |              | ANG      | Protease research has undergone a major expansion in the last decade, largely due to the extremely rapid development of new technologies, such as quantitative proteomics and in vivo imaging, as well as an extensive use of in vivo models. These have led to identification of physiological substrates and resulted in a paradigm shift from the concept of proteases as proteindegrading enzymes to proteases as key signalling molecules. However, we are still at the beginning of an understanding of protease signalling pathways. We have only identified a minor subset of true physiological substrates for a limited number of proteases, and their physiological regulation is still not well understood. Similarly, links with other signalling systems are not well established. Herein, we highlight current challenges in protease research.                          |
|    | Objavljeno v |          | IRL Press; EMBO journal; 2012; Vol. 31, no. 7; str. 1630-1643; Impact Factor: 9.822; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.761; A": 1; A': 1; WoS: CQ, DR; Avtorji / Authors: Turk Boris, Turk Dušan, Turk Vito  |
|    | Tipologija   |          | 1.02 Pregledni znanstveni članek  |
| 3. | COBISS ID    | 1678895  | Vir: COBISS.SI  |
|    | Naslov       | SLO      | Nov alosterični mehanizem pri cisteinski peptidazi katepsinu K, odkrit z računalniškimi metodami  |

|              |           |          |   |
|--------------|-----------|----------|---|
|              |           | ANG      | A novel allosteric mechanism in the cysteine peptidase cathepsin K discovered by computational methods  |
| Opis         | SLO       |          | V članku na modelu katepsina K, poglavitne peptidaze v razgradnji kolagenskih vlaken kosti in ene najobetavnejših tarč za zdravljenje osteoporoze, opisujemo napoved alosteričnih mest v papainu podobnih cisteinskih peptidazah s kombinacijo računalniških metod. Z računalniško podprtim iskanjem po knjižnicah kemijskih spojin identificiramo spojino NSC13345 kot prvi alosteričen inhibitor katepsina K in jo podrobno okarakteriziramo s strukturnega in funkcijskega vidika. S kristalno strukturno kompleksa katepsina K in NSC13345 pokažemo, da se spojina dejansko veže na računalniško napovedano mesto, ki ga s tem identificiramo kot novo alosterično mesto na katepsinu K. Spojino okarakteriziramo kot delni inhibitor hidrolize sintetičnih substratov in azokazeina ter popoln inhibitor hidrolize kolagena tipa I, najpomembnejšega naravnega substrata katepsina K. Ti rezultati kažejo, da je spojina NSC13345 odličen kandidat za razvoj učinkovin za zdravljenje osteoporoze. |
|              | ANG       |          | In this paper we describe the procedure of allosteric site prediction in papain-like cysteine peptidases by computational methods, using cathepsin K as the model enzyme. Compound libraries were screened in silico to identify compound NSC13345 as the first lowmolecularweight allosteric inhibitor of cathepsin K. The compound was thoroughly characterized from the functional and structural perspectives. The crystal structure of the cathepsin K/NSC13345 complex showed that the compound indeed binds at the computationally anticipated site, which was thereby identified as a novel allosteric site in cathepsin K. The compound was characterized as a partial inhibitor of the hydrolysis of synthetic substrates and azocasein and a full inhibitor of type I collagen hydrolysis. These results qualify compound NSC1334 as an excellent candidate for the design of drugs for the treatment of osteoporosis.   |
| Objavljeno v |           |          | Nature Publishing Group; Nature communications; 2014; Vol. 5; art. no. 3287 (str. 1-10); Impact Factor: 10.742; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A'': 1; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Novinec Marko, Korenč Matevž, Cafilisch Amedeo, Ranganathan Rama, Lenarčič Brigita, Baici Antonio  |
| Tipologija   |           |          | 1.01 Izvirni znanstveni članek  |
| 4.           | COBISS ID | 27739175 | Vir: COBISS.SI  |
| Naslov       | SLO       |          | In vivo vizualizacija mišjih tumorjev z lipidiranim substratom katepsina S  |
|              | ANG       |          | In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate  |
| Opis         | SLO       |          | Za lipidirane FRET sonde za proteaze je bilo pokazano, da se lahko internalizirajo v tarčne celice in omogočijo detekcijo proteaz. V tem delu smo razvili nepeptidno FRET sondo za katepsin S, proteazo, ki jo izločajo makrofagi v tumorskem mikrookolju. Pokazali smo, da katepsin S uspešno in selektivno cepi sondo tako v celičnem modelu kot in vivo v mišjem modelu raka, pri čemer se je signal sonde akumuliral pretežno v tumorskem tkivu in ne v organih kot npr. jetra in pljuča. Ta sonda tako predstavlja obetaven prototip za detekcijo tumorjev pri ljudeh v prihodnosti.   |
|              | ANG       |          | Lipidated protease FRET probes were previously shown to get internalized by target cells releasing the protease of interest. Here we introduce a lipidated, nonpeptidic FRET probe for cathepsin S, a protease secreted by macrophages in the tumor environment. We show that in cultured cells as well as in a grafted tumor mouse model, the probe is successfully cleaved and in the mouse is accumulated in the tumor tissue with little signal in organs such as liver and lung. The probe   |

|    |              |   |
|----|--------------|---|
|    |              | is therefore a promising prototype tool for detecting tumors in humans in the future.   |
|    | Objavljeno v | Wiley-VCH; Angewandte Chemie; 2014; Vol. 53, issue 29; str. 7669-7673; Impact Factor: 11.336; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.395; A": 1; A': 1; WoS: DY; Avtorji / Authors: Hu Hai-Yu, Vats Divya, Vizovišek Matej, Kramer Lovro, Germanier Catherine, Urlich Wendt K., Rudin Markus, Turk Boris, Plettenburg Oliver, Schultz Carsten   |
|    | Tipologija   | 1.01 Izvirni znanstveni članek  |
| 5. | COBISS ID    | 27932455 Vir: COBISS.SI   |
|    | Naslov       | <i>SLO</i> Selektivno ciljanje tumorskih in stromalnih celic z nanoprenašalnim sistemom s pomočjo lipidiranega inhibitorja katepsina B  |
|    |              | <i>ANG</i> Selective targeting of tumor and stromal cells by a nanocarrier system displaying lipidated cathepsin B inhibitor  |
|    | Opis         | <i>SLO</i> Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza, ki se med razvojem tumorja specifično preusmeri na površino tumorskih celic in v zunajceličnino. V tem delu opisujemo razvoj biokompatibilnih liposomskih nanoprenašalcev, LNC-NS-629, na katere je pripet specifičen inhibitor katepsina B. Ex vivo in in vivo študije so potrdile, da LNC-NS-629 selektivno cilja tumorske celice in celice strome, ki nanodelce selektivno internalizirajo. S tem pristopom smo potrdili, da ciljanje katepsina B predstavlja zelo obetaven pristop k diagnosticiranju in zdravljenju raka. |
|    |              | <i>ANG</i> Cathepsin B is a lysosomal cysteine proteinase that is specifically translocated to the extracellular milieu during cancer progression. The development of a lipidated CtsB inhibitor incorporated into the envelope of a liposomal nanocarrier (LNC-NS-629) is described in this work. Ex vivo and in vivo studies confirmed selective targeting and internalization of LNC-NS-629 by tumor and stromal cells, thus validating CtsB targeting as a highly promising approach to cancer diagnosis and treatment.   |
|    | Objavljeno v | Wiley-VCH; Angewandte Chemie; 2014; Vol. 53, no. 38; str. 10077-10081; Impact Factor: 11.336; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.395; A": 1; A': 1; WoS: DY; Avtorji / Authors: Mikhaylov Georgy, Klimpel D., Schaschke Norbert, Mikac Urška, Vizovišek Matej, Fonović Marko, Turk Vito, Turk Boris, Vasiljeva Olga   |
|    | Tipologija   | 1.01 Izvirni znanstveni članek  |

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine<sup>6</sup>

|    |                            |   |
|----|----------------------------|---|
|    | Družbeno-ekonomski dosežek |   |
| 1. | COBISS ID                  | Vir: vpis v poročilo  |
|    | Naslov                     | <i>SLO</i> Članstvo v uredniških odborih  |
|    |                            | <i>ANG</i> Editorial board members  |
|    | Opis                       | <i>SLO</i> <p>1 .B. Turk: Biological Chemistry, izvršni urednik</p> <p>2. Boris Turk: Frontiers in Molecular and Cellular Oncology, član uredniškega odbora</p> <p>3. B. Turk: Cell Death &amp; Disease, član uredniškega odbora</p> <p>4. V. Turk: BBA Proteins and Proteomics, član uredniškega odbora</p> <p>5. V. Turk, Current Protein and Peptide Science, član uredniškega odbora</p> <p>6. E. Žerovnik: Amyloid, član uredniškega odbora</p> <p>7. E. Žerovnik: Frontiers in molecular neuroscience, gostujoči urednik</p> <p>Članstvo v uredniških odborih mednarodnih revij je možno samo na povabilo in je dokaz kvalitete raziskovalcev. Izvršni urednik pa je tudi</p> |



|    |              |  |   |
|----|--------------|--|---|
|    |              | neposredno odgovoren za uspešnost revije saj odloča o primernosti objave člankov.  |   |
|    | ANG          | <p>1. B. Turk: Biological Chemistry, Executive Editor<br/> 2. Boris Turk: Frontiers in Molecular and Cellular Oncology, Editorial Board member<br/> 3. B. Turk: Cell Death &amp; Disease, Editorial Board member<br/> 4. V. Turk: BBA Proteins and Proteomics, Editorial Board member<br/> 5. V. Turk, Current Protein and Peptide Science, Editorial Board member<br/> 6. E. Žerovnik: Amyloid, Editorial Board member<br/> 7. E. Žerovnik: Frontiers in molecular neuroscience, Guest Editor</p> <p>Membership in editorial boards of international journals is only based on invitation and thus a direct evidence of the quality of a researcher. Executive Editor is also directly responsible for the success of the journal as he has a decisive role about the suitability of manuscripts for publication.</p> |   |
|    | Šifra        | C.04   | Uredništvo mednarodne revije  |
|    | Objavljeno v | spletne strani revij   |   |
|    | Tipologija   | 4.00   | Sekundarno avtorstvo  |
| 2. | COBISS ID    |  | Vir: vpis v poročilo  |
|    | Naslov       | SLO  | Zoisova nagrada in članstvo v SAZU  |
|    |              | ANG  | Zois award and membership in Slovene Academy of Sciences and Arts (SAZU)  |
|    | Opis         | SLO  | Prof. Boris Turk je prejel 2011 Zoisovo nagrado zavrhunške dosežke na področju prenosa signalov s proteazami, kar je najvišja nagrada na področju znanosti v Sloveniji.<br>Prof. Vito Turk je bil izvoljen za rednega člana SAZU, kar je izjemno priznanje za njegovo raziskovalno delo kot za delo raziskovalne skupine. |
|    |              | ANG  | Prof. Boris Turk received in 2011 Zois award for outstanding achievements in science, which is the highest scientific award in Slovenia.<br>Prof. Vito Turk was elected for regular member of SAZU, which is a major recognition for his research work as well as for the research work of our research group             |
|    | Šifra        | E.01   | Domače nagrade  |
|    | Objavljeno v | spletna stran SAZU oz. MIVŠ  |   |
|    | Tipologija   | 3.25   | Druga izvedena dela   |
| 3. | COBISS ID    |  | Vir: vpis v poročilo  |
|    | Naslov       | SLO  | Članstvo v Academia Europea (London)  |
|    |              | ANG  | Membership in Academia Europea (London)   |
|    | Opis         | SLO  | Prof. Boris Turk je bil leta 2013 izvoljen za člana ene najuglednejših tujih akademij, kar je nedvomno veliko priznanje tako za raziskovalca kot za Slovenijo.  |
|    |              | ANG  | Prof. Boris Turk was in 2013 elected for a member of one of the most renowned international academies, which is clearly a major recognition for both the researcher and Slovenia  |
|    | Šifra        | E.02   | Mednarodne nagrade  |
|    | Objavljeno v | spletna stran Academia Europea   |   |
|    |              | 3.25   |   |

|    |              |   |   |
|----|--------------|---|---|
|    | Tipologija   | Druga izvedena dela   |   |
| 4. | COBISS ID    |   | Vir: vpis v poročilo  |
|    | Naslov       | SLO   | Vodilna vloga v mednarodnih organizacijah   |
|    |              | ANG   | Leading role in international organisations   |
|    | Opis         | SLO   | Prof. Boris Turk je generalni sekretar European Cell Death Organisation (ECDO), bil pa je tudi sekretar (2009-2011) ter predsednik (2011-2013) International Proteolysis Society (IPS). To je priznanje za odlične dosežke na področju dela in sicer na področju proteolize (IPS) in celične smrti (ECDO) in tudi za Slovenijo. <a href="http://www.ecdo.eu/">http://www.ecdo.eu/</a>   |
|    |              | ANG   | Prof Boris Turk is Secretary General of European Cell Death Organization . He was also International Proteolysis Society Secretary (2009-2011) and President (2011-2103). This is an honour in recognition of the achievements in the fields of proteolysis (IPS) and cell death (ECDO). Crucial for promotion of Slovenia worldwide. <a href="http://www.ecdo.eu/">http://www.ecdo.eu/</a>   |
|    | Šifra        | D.03  | Članstvo v tujih/mednarodnih odborih/komitejih  |
|    | Objavljeno v | <a href="http://www.ecdo.eu/">http://www.ecdo.eu/</a> ; <a href="http://www.protease.org/">http://www.protease.org/</a> |   |
|    | Tipologija   | 3.25  | Druga izvedena dela   |
| 5. | COBISS ID    |   | Vir: vpis v poročilo  |
|    | Naslov       | SLO   | Organizacija mednarodnih srečanj in vabljeni predavanja   |
|    |              | ANG   | Organization of international meetings and invited lectures   |
|    | Opis         | SLO   | B. Turk je bil vključen v organizacijo več kot 35 mednarodnih srečanj ali kot glavni organizator ali kot član znanstvenih ali organizacijskih odborov. Mednje sodi tudi organizacija serije kongresov Proteases, Inhibitors and Biological Control, kjer je bil B. Turk glavni organizator (8 srečanj od leta 2000 dalje), zadnje srečanje, že XIV. po vrsti je potekalo septembra 2014 v Portorožu. Poleg tega so bili B. Turk in ostali člani projektne skupine vabljeni predavatelji na številnih znanstvenih srečanjih in tujih univerzah, vključno 3 krat na Gordonskih konferencah. Tako je na lanski GRC konferenci o proteolitičnih encimih v maju 2014 B. Turk tudi vodil diskusijo pri eni sekciji. |
|    |              | ANG   | B. Turk was involved in organization of over 35 international meetings, either as main organizer or member of scientific or organizing committee, including a series of biannual meetings on Proteases, Inhibitors and Biological Control, where he was the main organizer (7 since 2000). Last Meeting in this series, already XIVth, was held in Portorož in September 2014. In addition, he and other team members were invited speakers at numerous meetings and foreign universities, including 3 times at Gordon Research Conferences; at 2014 GRC on proteolytic enzymes in May B. Turk was also discussion leader in one of the sections.   |
|    | Šifra        | B.01  | Organizator znanstvenega srečanja   |
|    | Objavljeno v | zborniki predavanj, COBISS  |   |
|    | Tipologija   | 4.00  | Sekundarno avtorstvo  |

### 8. Drugi pomembni rezultati programske skupine<sup>2</sup>

Schaschke, N., Turk, B., Mikhaylov, G., Vasiljeva O. Cathepsinbinding compounds bound to a nanodevice and their diagnostic and therapeutic use EPO Patent 2537532A1; application number

EP20110005110 20110622; publication date December 26, 2012  
Turk, B., Mikhaylov, G., Vasiljeva O., Schaschke, N.. Cathepsinbinding  
compounds bound to a carrier and their diagnostic use. PCT  
Patent WO/2012/175223  
VASILJEVA Olga, ITIN Volya Isaevich, PSAKHIE Sergey Grigorievich,  
MIKHAYLOV Georgy Andreevich, MIKAC Mojca Urska, TURK Boris,  
MAGAEVA Anna Alekseevna, NAIDEN Evgeniy Petrovich, TEREKHOVA  
Olga Georgievna, Oxide ferrimagnetics with spinel structure  
nanoparticles and iron oxide nanoparticles, biocompatible aqueous  
colloidal systems comprising nanoparticles, ferriliposomes, and uses  
thereof. PCT Patent WO/2013/019151  
PSAKHIE, S. G., ITIN, Volia Isaevich, MAGAJEVA, D. A., TEREHOVA,  
O. G., NAJDEN, E. P., VASILJEVA, Olga, MIHAJLOV ANDREJEVIČ,  
Georgij, MIKAC, Urška, TURK, Boris. Kontrastnoe sredstvo dlja T1  
i/ili T2 magnitnorezonansnogo  
skanirvanija i sposo ego  
polučenija : RU2471502 (C1), 20130110  
: Rospatent  
2011132913/15. Moskva: Federal naja služba po intelektual nnoj  
so stvennosti, 2013. [COBISS.SIID  
26994983]  
Datta, Gopal K., Schultz, Carsten, Turk, Boris, Plettenburg, Oliver,  
Kurz, Michael, Billen, Guenter, Podeschwa, Michael, Kogler, Herbert,  
Vizovišek, Matej. Caspase1  
imaging probes. EPO Patent Application  
No.: EP13184458.1 . filed Sept. 13, 2013.  
BOGYO, Matthew, VERHELST, Steven H. L., FONOVIĆ, Marko. Mild  
chemically cleavable linker system: patent US8314215(B2). [S. I.]:  
United States Patent and Trademark Office, 20 nov. 2012.  
[COBISS.SIID  
21588519]

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

Znotraj in zunajcelična razgradnja beljakovin, pri kateri imajo ključno vlogo proteolizni encimi, je eden najpomembnejših življenjskih procesov. V normalnih pogojih je proteoliza strogo regulirana predvsem z aktivacijo neaktivnih prekurzorjev proteaz ter endogenimi inhibitorji. Kadar pa regulacija odpove, so proteaze lahko izjemno škodljive za organizem, kar lahko vodi do številnih bolezni. V preteklosti je naša raziskovalna skupina pomembno doprinesla k razvoju področja z odkritji več katepsinov in njihovih endogenih inhibitorjev cistatina C, stefinov A in B, kininogenov, tiropinov, lizosomske poti apoptoze, razumevanju vloge avtofagije pri parazitu T. cruzi, kot tudi s pionirskimi študijami na področju razvoja novih ciljanih dostavnih sistemov za zdravila na osnovi kovinskih nanodelcev in ligandov proteaz, alosteričnih proteaznih inhibitorjev in novih sond za spremljanje aktivnosti proteaz, kar uvršča te raziskave med najbolj kompetitivnih področij raziskav, kar je nedvomno velik uspeh. Velik interes farmacevtske industrije za proteaze vključno s katepsini (prvo zdravilo, ki cilja katepsine za zdravljenje osteoporoze, odanacatib, je v zaključnih postopkih testiranja in se v bližnji prihodnosti pričakuje vloga za registracijo na FDA) potrjuje idejo, da je ta problematika zelo pomembna. Dodatno teži temu argumentu daje tudi dejstvo, da je problematika tudi med temami raziskovalnega programa Horizont2020. Tako lahko sklepamo, da raziskave v programu spadajo med najbolj atraktivna področja biomedicine, agronomije in farmaceutike, če naštejemo le nekatera. Da spadajo dosežki med vrhunske v svetovnem merilu dokazujejo številne objave v najpomembnejših mednarodnih revijah, med katerimi je tudi več člankov z IF > 9,0 v tem programskem obdobju (2009-2014) in posledična visoka citiranost del vodje programa (skupno več kot 7700 citatov, h-index 45) in ostalih sodelavcev. To je razvidno tudi iz številnih nagrad,

ki so jih prejeli sodelavci skupine, ter iz mednarodnih sodelovanj z vrsto odličnih raziskovalcev v svetu.

ANG

Proteolytic enzymes play a key role in intra- and extracellular protein processing and degradation, which are among the most important physiological processes. Under normal conditions proteolysis is a highly regulated process, where protease activities are largely controlled by activation of inactive zymogens and through inhibition by endogenous inhibitors. However, when regulation fails, proteases can be extremely harmful for the organism, leading to numerous diseases (Turk 2006; Drag and Salvesen, 2010; Turk et al., 2012). In the past, our research group has contributed significantly to the development of the field with the discoveries of several cathepsins and their endogenous inhibitors cystatin C, stefins A and B, kininogens and thyroptins, lysosomal pathway to apoptosis, understanding the role of autophagy in *T. cruzi*, as well as pioneering efforts in the fields of development of novel nanoparticle-based targeted drug delivery systems, allosteric protease inhibitors and novel activity-based probes for proteases which classify our research at the cutting edge in the field. This is reflected also in high citation of our works in this competitive field. A major interest of the pharmaceutical companies for proteases including the cathepsins (the first cathepsin targeting drug odanacatib for osteoporosis treatment is expected to be filed to FDA soon) is supporting the idea that this problematics is extremely important. Moreover, the research topics are also among the topics of Horizon2020 research programmes. It can be concluded that the research topics belong among the most attractive areas of research in the fields of biomedicine, agriculture and pharmacy, to list just some of them. A further confirmation for the high level of scientific achievements of the group is evident from numerous publications in the most important international journals, including several publications in the journals with IF > 9.0 in the programme (2009-2014) and consequently the high citation of the works of the programme leader (over 7700 citations total, H-index 45), as well as of the other researchers. Moreover, this is evident also from the numerous awards received by research group members as well as from the list of international collaborations with a number of top class researchers worldwide.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Čeprav predlagane raziskave spadajo med bazične raziskave, vsebujejo tudi razvojno-aplikativno komponentno, zaradi česar jih lahko upravičeno štejemo med strateške bazične raziskave. Člani skupine so intenzivno sodelovali s slovensko (Lek, Krka, Medis, Acies Bio, ...) in tujo (Sanofi) industrijo, kar se je odrazilo v večjem številu naročniških raziskav in sodelavi v FP7 projektih kot tudi v dobrih sodelavah znotraj Centra odličnosti CIPKEBIP in Kompetenčnega centra Brin, ki sta oba financirana preko Evropskih Strukturnih Skladov. V to kategorijo spadajo tudi podeljeni mednarodni patenti in mednarodne patentne prijave v zadnjem obdobju. Razisave ponujajo veliko priložnost tudi za študente, ki se lahko izobražujejo na področju najnaprednejših metod in področij, kamor spadajo proteomika (v okviru skupine imamo edini proteomski laboratorij v Sloveniji), kemogenomika, ciljana dostava zdravil in in vivo vizualizacija (v okviru skupine imamo edini sistem za in vivo vizualizacijo v Sloveniji). Vsa omenjena področja imajo namreč zelo visoko prioriteto ker so izjemnega pomena pri modernem razvoju zdravil in zgodnji diagnostiki. Njihova kombinacijae pa nam bo omogočila prenesti spoznanja v klinično prakso in tako dvigniti personalizirano medicino na nov nivo. Tako ni presentetljivo, da je bilo v okviru program od njegovega začetka opravljeno več kot 250 diplomskih del, več kot 40 magisterijev in več kot 40 doktoratov, vključno z 12 doktorati iz zadnjega štetletnega obdobja od leta 2009. Po zaključku študija so številni raziskovalci zapustili skupino in odšli na druge institute ali univerze. Tako ti raziskovalci tvorijo jedro Katedre za biokemijo na FKKT na Univerzi v Ljubljani. Poleg tega so številni raziskovalci odšli tudi v farmacevtsko industrijo (več kot 10 v zadnjih 7-8 letih). Takšne raziskave, ki vključujejo biokemijo, kemogenomiko, proteomiko in molekularno ter celično biologijo so ključnega pomena za razvoj moderne biotehnologije in biomedicine. Odlična ter aktualna znanost ter njen prenos v moderno tehnologijo pa so ključnega pomena za trajen družbeno-ekonomski razvoj in konkurenčnost Slovenije ter njeno umestitev med razvite članice Evropske skupnosti. Poleg tega so člani programske skupine dosegli veliko mednarodno prepoznavnost, kar je zelo pomembno za mednarodno promocijo Slovenije in kot takšno tudi za ohranjanje nacionalne identitete Slovenije. Skupina je tao organizirala številna mednarodna

srečanja, ki so se jih udeležili tudi številni ugledni tuji raziskovalci iz akademske sfere in iz industrije, vključno z več nNobelovimi nagrajenci. Vzpostavljene so bile številne mednarodne povezave, kar prav tako prispeva k mednarodnemu ugledu Slovenije. Člani programske skupine pa so poleg tega sodelovali v vodstvenih organih mednarodnih organizacij. Dr. Boris Turk je trenutno generalni sekretar Evropske Organizacije za Celično Smrt (ECDO), bil pa je tudi član sveta International Proteolysis Society (IPS, 2001-2005; 2009-2013) in njen sekretar (2009-2011) ter predsednik (2011-2013). Poleg tega je tudi član EMBO in Academia Europea (London) ter prejemnik Zoisove nagrade za vrhunske dosežke v znanosti na področju prenosa signalov s proteazami. Dr. Vito Turk pa je bil na vodilnih položajih v Federation of European Biochemical Societies (FEBS) (generalni sekretar) in v IUBMB. Poleg tega je redni član Slovenske Akademije Znanosti in Umetnosti (SAZU), EMBO, Academia Europea (London), itd. Poleg tega so tudi drugi člani skupine dobili različne nagrade ali priznanja. Več članov programske skupine pa je tudi urednikov ali članov uredniških odborov različnih mednarodnih revij, kar dodatno prispeva k mednarodni prepoznavnosti Slovenije.

ANG

Although the proposed research is basic research, it also has its applied component and can be classified as strategic basic research. Members of the group have extensively collaborated with Slovene (Lek, Krka, Medis, Acies Bio, ...) and foreign industry (Sanofi), which resulted in a substantial amount of contract-based research and FP7 projects, as well as extensive collaborations within the Center of Excellence CIPKEBIP and the Competence Center Brin, which have been both financed by European Structural Funds. Moreover, as a result several international patents have been filed and/or granted. The work also offers great opportunity for students to be trained in the most advanced methods and areas, such as proteomics (the only proteomics facility in Slovenia), chemogenomics, targeted drug delivery and in vivo imaging (the only in vivo imaging system in Slovenia). All these fields have namely high international priority as they are of extreme importance in modern drug discovery and early diagnostics, and combining them should help translate the findings into clinics and bring the personal medicine to a new level. It is therefore not surprising that research within this programme since its beginning lead to over 250 finished BSc theses, over 40 MSc theses and over 40 PhD theses, including 12 in the last programme call since 2009. After finishing their studies, numerous researchers left the group and went to other institutes and universities. A number of the researchers from the programme also went to pharmaceutical industry (over 10 in last 7-8 years). At the University of Ljubljana (UL) researchers from this programme form the core of the biochemistry program and chair of biochemistry at FKKT UL. In addition to graduate teaching, programme members also have major role in undergraduate education programmes as they are responsible for a number of courses, whereas Pro. Brigita Lenarčič is currently also vice-dean for

Investigations like this combining biochemistry, chemogenomics, proteomics and molecular and cell biology are critically important for the development of modern biotechnology and biomedical research. Excellent and up-to-date science and its transfer to modern technology are of major importance for the sustainable socio-economic development and competitiveness of Slovenia and its classification among the developed members of EC. In addition, members of the project team have received wide-spread international recognition, which is very important for the world-wide promotion of Slovenia and as such also for preservation of national identity of Slovenia. The group organized a number of international meetings with participation of numerous excellent foreign researchers from academia and industry, including several Nobel laureates. A number of international collaborations have been established, which all contributes to the international reputation of Slovenia. Group members also served important functions in governing bodies of various International organizations. Dr. Boris Turk is currently Secretary General of European Cell Death Organization (ECDO), he was councilor of the International Proteolysis Society (IPS, 2001-2005; 2009-2013) and its Secretary (2009-2011) and President (2011-2013), he is an EMBO member and member of Academia Europea (London) and was awarded Zois award for outstanding achievements in the field of Protease signaling in 2011. Dr. Vito Turk was performing leading functions in the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) and in IUBMB, he is a member of Slovene Academy of Sciences and Arts, EMBO, European Academy (London), etc. In addition, other group members also received various awards and amendments. Furthermore, several group members serve as Editors or Editorial board members of various international journals, which additionally contribute to international recognition of Slovenia.

## 10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>11</sup>

### 10.1. Diplome<sup>12</sup>

| vrsta usposabljanja             | število diplom |
|---------------------------------|----------------|
| bolonjski program - I. stopnja  | 14             |
| bolonjski program - II. stopnja | 4              |
| univerzitetni (stari) program   | 29             |

### 10.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti<sup>13</sup>

| Šifra raziskovalca | Ime in priimek      | Mag.                             | Dr.                              | MR                                  |  |
|--------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| 25642              | Urška Požgan        | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 28485              | Aleš Špes           | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 24764              | Ana Petelin         | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 29544              | Ajda Taler - Verčič | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 30872              | Maruša Hafner Česen | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 33315              | Miha Butinar        | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 32171              | Matej Vizovišek     | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 32162              | Mira Polajnar       | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 29883              | Nina Vidergar       | <input checked="" type="radio"/> | <input type="radio"/>            | <input type="checkbox"/>            |  |
| 25623              | Katja Škerget       | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 25653              | Špela Konjar        | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 28484              | Dejan Suban         | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 30882              | Katarina Maher      | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |  |
| 33031              | Marina Klemenčič    | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 37797              | Georgy Mikhaylov    | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 9091               | Vida Puizdar        | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |
| 33162              | Tilen Vidmar        | <input type="radio"/>            | <input checked="" type="radio"/> | <input type="checkbox"/>            |  |

Legenda:

**Mag.** - Znanstveni magisterij

**Dr.** - Doktorat znanosti

**MR** - mladi raziskovalec

### 11. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju<sup>14</sup>

| Šifra raziskovalca | Ime in priimek      | Mag.                  | Dr.                              | Zaposlitev              |  |
|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|--|
| 25642              | Urška Požgan        | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo        |  |
| 28485              | Aleš Špes           | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo        |  |
| 29544              | Ajda Taler - Verčič | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | A - raziskovalni zavodi |  |
| 30872              | Maruša Hafner Česen | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | A - raziskovalni zavodi |  |
| 33315              | Miha Butinar        | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | A - raziskovalni zavodi |  |

|       |                 |                       |                                  |                         |  |
|-------|-----------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|--|
| 32171 | Matej Vizovišek | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | A - raziskovalni zavodi |  |
| 32162 | Mira Polajnar   | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | E - Tujina              |  |
| 25623 | Katja Škerget   | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo        |  |
| 25653 | Špela Konjar    | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | E - Tujina              |  |
| 28484 | Dejan Suban     | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | F - Drugo               |  |
| 30882 | Katarina Maher  | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> | C - Gospodarstvo        |  |

Legenda zaposlitev:

- A** - visokošolski in javni raziskovalni zavodi
- B** - gospodarstvo
- C** - javna uprava
- D** - družbene dejavnosti
- E** - tujina
- F** - drugo

### 12. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2014

| Šifra raziskovalca | Ime in priimek   | Sodelovanje v programski skupini | Število mesecev |  |
|--------------------|------------------|----------------------------------|-----------------|--|
| 37797              | Georgy Mikhaylov | C - študent - doktorand          | 72              |  |
| 0                  | Andrey Kadin     | C - študent - doktorand          | 36              |  |

Legenda sodelovanja v programski skupini:

- A** - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja
- B** - uveljavljeni raziskovalec iz tujine
- C** - študent - doktorand iz tujine
- D** - podoktorand iz tujine

### 13. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>15</sup>

SLO

|   |
|---|
| <p>1.11. 2009 – 30.4. 2013 FP7 projekt LIVIMODE (B. Turk coordinator, IJS delež cca 750 000 EUR, celoten projekt 4.95 mio EUR)</p> <p>1.4. 2012 – 31.3. 2016 FP7 projekt Alexander (B. Turk, O. Vasiljeva, partnerja)</p> <p>1.4. 2008 – 31.3. 2012 FP7 projekt MICROENVIMET (A. Noel, coordinator, B. Turk and O. Vasiljeva, coPI; IJS delež ~243 000 EUR; celoten projekt ~ 3 mio EUR)</p> <p>1.1.2006 – 30.6. 2009 FP6 STREP Chemical Genomics by Activity Measurements of Proteases (CAMP), LSHGCT2006018830, (B. Turk, coPI; IJS delež 396 000 EUR, celoten projekt ~2.7 mio EUR))</p> <p>1.10.2006 – 30.9. 2009 HFSP (Human Frontiers Science Program) "Intracellular protease signaling induced by homopolymeric amino acid (HPAA) tracts" (B. Turk coPI, delež IJS 337 500 USD; celoten projekt 1.35 mio USD) RGP0024/2006C</p> <p>Bilateralni projekt s CEA: N. Kopitar Jerala, M. Toledano; Zaščitna vloga cistatinov pri oksidativnem stresu induciranim z lipopolisaharidom in sepsi; Q30014/1000-13-0106; 2013/2014</p> <p>Bilateralni projekt v okviru FWO: B. Turk, P. Vandenabeele, K. Gevaert 1.1.2014-31.12.2017</p> <p>Proteaze pri vnetju in celični smrti (N10022)</p> <p>Poleg vseh omenjenih formalnih povezav ter siceršnjih sodelav s partnerji iz teh projektov smo sodelovali še s številnimi drugimi partnerji, med katerimi velja omeniti prof. dr. Petra Vandenabeeleja in prof. dr. Krisa Gevaerta z Univerze v Ghentu, Belgija, dr. Davida Huanga z Walter and Elisa Hall Institute, Melbourne, Avstralija, prof. dr. Joeja Trapanija s Peter MacCalum Institute, Melbourne, Avstralija, prof. dr. Roberta Pikea z Monash University,</p> |
|---|



Melbourne, Avstralija, prof. dr. Christopherja M. Overalla z University of British Columbia, Vancouver, Kanada, prof. dr. Henninga Walczaka z Imperial College, London, Velika Britanija, prof. dr. Christoph Petersa z Albert Ludwigove Univerze v Freiburgu, prof. dr. Sergeja Itina z Univerze v Tomsku, Rusija, prof. dr. Guya Salvesna iz Burnham Sanford Institute v LaJolli, ZDA, dr. Marcina Draga z Univerze v Wrocławu ter številne druge, kar je razvidno tudi iz naših publikacij.

#### 14. Vključenost v projekte za uporabnike, ki so v obdobju trajanja raziskovalnega programa (1.1.2009–31.12.2014) potekali izven financiranja ARRS<sup>16</sup>

SLO

U s p ešno smo sodelovali v Centrih odličnosti CIPKeBiP (Dušan Turk) in Nanoznanosti in Nanotehnologije (Dragan Mihajlović). Poleg tega smo bili partnerji tudi v kompetenčnem centru Brin, kar nedvomno kaže na dobro povezanost naše skupine tudi z industrijskimi partnerji. Dodatno pa je Maruša Hafner Č esen nosilka podoktorskega projekta MIZŠ za sodelovanje z gospodarstvom v sodelavi z našo SME Acies, d.o.o. Poleg tega sodelava tudi z mednarodnimi industrijskimi partnerji kot je razvidno tudi iz naših FP7 projektov, med katerimi je bil najpomembnejši Sanofi, s katerim smo vložili tudi eno patentno prijavo.

#### 15. Ocena tehnološke zrelosti rezultatov raziskovalnega programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)<sup>17</sup>

SLO

Glede na trenutne rezultate programa, za večino ne moremo trditi, da so že zreli za njihovo implementacijo v praksi. So pa tovrstne možnosti vsekakor v prihodnjih letih, zato velja omeniti tri najbolj obetavne rezultate:

1. Razvoj novih sistemov za dostavo zdravil, ki temeljijo na nanodelcih ali aktivnem tarčenju preko ligandov. Trenutni rezultati so zelo obetavni, saj smo že pokazali, da z novimi nanodelci in s sistemom z aktivnim tarčenjem lahko uspešno dostavimo učinkovino na mesto delovanja v primeru mišjega modela tumorogeneze. Podeljen je ruski patent, nadaljnji koraki pa so odvisni od uspeha predkliničnih študij. Podobno velja za sistem za aktivno tarčenje na osnovi ligandov proteaz, kjer je bila vložena prijava na EPO in WIPO. Ta dva sistema sta tudi edina že primerna za implementacijo v praksi.
2. Razvoj novih sond za in vivo spremljanje aktivnosti proteaz kot možnost za diagnostiko in spremljanje poteka terapije ter validacijo novih učinkovin, ki smo jih razvijali v okviru 7. FP projekta LIVIMODE in katerih razvoj nadaljujemo. To področje je vsekakor perspektivno, saj posega na področje raka in artritčnih obolenj, kjer so sedanje možnosti precej omejene, saj na ta način lahko bistveno izboljšamo občutljivost dosedanjih metod. Poleg tega bi bile tovrstne sonde (activity-based probes) izredno primerne za in vivo validacijo učinkovin, kjer občutljivih metod pravzaprav ni. Kljub z ačetnim uspehom pri delu da o implementaciji še ne moremo govoriti, saj so predklinična testiranja šele na začetku.
3. Rezultati identifikacije novih membranskih substratov katepsinov imajo vsekakor velik potencial v diagnostiki tako humani kot veterinarski, vendar jih je potrebno prej še testirati na kliničnih vzorcih.

#### 16. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšen finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali

|   |  |
|---|--|
| možnost ustanovitve spin-off podjetja                 | <input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE   |
| potrebni finančni vložek                              | 2.500.000 EUR  |
| ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>18</sup> | Potrebno bi bilo postaviti sistem za GLP produkcijo nanodelcev oziroma funkcionaliziranih liposomov ter njihovo karakterizacijo, kar bi bilo smiselno v okviru spinoff podjetja. |

#### 17. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>19</sup>

##### 17.1. Izjemni znanstveni dosežek



Razvoj novega ciljanega dostavnega sistema za zdravila na osnovi liposomov. Članek Mikhaylov in sod (2014) je bil objavljen v prestižni mednarodni reviji *Angewandte Chem Intl Ed* in to tudi kot notranja naslovnica.

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza, ki se med razvojem tumorja specifično preusmeri na površino tumorskih celic in v zunajceličnino. V tem delu opisujemo razvoj biokompatibilnih liposomskih nanoprenašalcev, LNC-NS-629, na katere je pripet specifičen inhibitor katepsina B. Ex vivo in in vivo študije so potrdile, da LNC-NS-629 selektivno cilja tumorske celice in celice strome, ki nanodelce selektivno internalizirajo. S tem inovativnim pristopom smo potrdili, da ciljanje katepsina B predstavlja zelo obetaven pristop k diagnosticiranju in zdravljenju raka. To obenem predstavlja tudi prvi tak sistem, pri katerem se je uporabilo ciljanje proteaze z majhnimi inhibitorji kot način ciljane dostave in ne kot terapevtski pristop zaradi direktne inhibicije ciljane proteaze.

## 17.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

## 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 in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v papirnati obliki;
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa.

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
matične RO (JRO in/ali RO s  
koncesijo):*

in

*vodja raziskovalnega programa:*

Institut "Jožef Stefan"

Boris Turk

### ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

### Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/138

<sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. V primeru odobrenega povečanja obsega financiranja raziskovalnega programa v letu 2014 mora poročilo o realizaciji programa dela zajemati predložen program dela ob prijavi in predložen dopolnjen program dela v letu 2014. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, navedite: "Ni bilo sprememb.". Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov

objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa 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 (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://www.sicris.si/> za posamezen program, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1.1.2009–31.12.2014), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Vpišite število opravljenih diplom v času izvajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času izvajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite "MR". [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1.1.2009 do 31.12.2014), izberite oz. označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Navedite naslove projektov in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>16</sup> Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>17</sup> Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma tržne niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>18</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

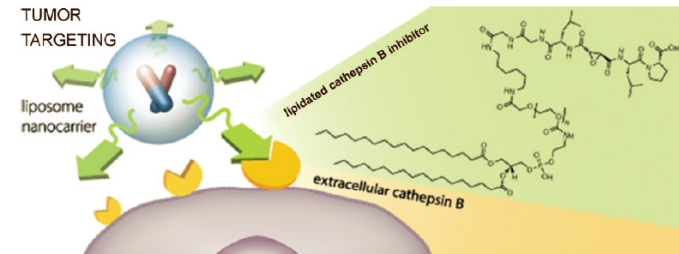
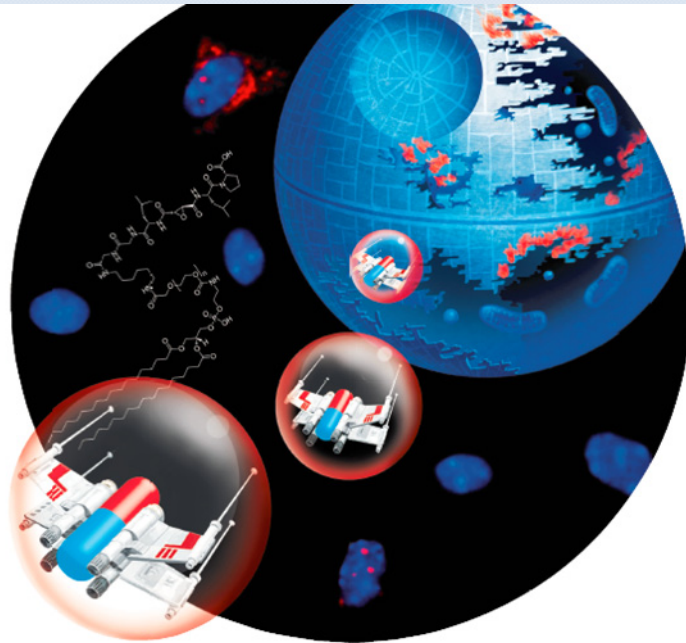
<sup>19</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priložnost/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROG-ZP/2015 v1.00b

19-B6-26-CB-82-D4-B2-38-DC-2E-DA-27-15-24-D6-E9-16-FA-F4-C3

## **Priloga 1**

## Selective Targeting of Tumor and Stromal Cells By a Nanocarrier System Displaying Lipidated Cathepsin B Inhibitor



**On target:** A lipidated cathepsin B (CtsB) inhibitor was incorporated into the envelope of a liposomal nanocarrier. The resulting CtsB-targeted drug delivery system, which can be loaded with diagnostic or therapeutic agents, was selectively internalized by tumor and stromal cells, thus validating CtsB targeting as a promising approach to cancer diagnosis and treatment.

G. Mikhaylov, D. Klimpel, N. Schaschke, U. Mikac, M. Vizovisek, M. Fonovic, V. Turk, B. Turk,\*  
O. Vasiljeva\* \_\_\_\_\_ 10077–10081

**Keywords:** cancer · cathepsin B · drug delivery · theranostics · tumor microenvironment

2014 – 53/38

