

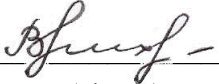
Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Навчально-науковий інститут «Фізико-технічний факультет»

Кафедра Медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

До захисту допущено кафедрою Медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

протокол № 13 від 15.06.2026

завідувач кафедри 
(підпис)

Валерія ТРУСОВА

(ім'я, прізвище)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

здобувача _____ першого (бакалаврського) _____ рівня вищої освіти
(першого (бакалаврського) / другого (магістерського))

Віртуальний скринінг перспективних тераностичних радіофармпрепаратів
для специфічної візуалізації та терапії онкологічних захворювань

(тема роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності)

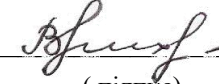
Освітня програма Біомедичні нанотехнології

(назва освітньої програми)

Здобувач 
(підпис)

Анна БУТЕНКО

(ім'я, прізвище)

Науковий керівник 
(підпис)

Валерія ТРУСОВА

(ім'я, прізвище)

Харків – 2026

АНОТАЦІЯ

Бутенко А.М. – Віртуальний скринінг перспективних тераностичних радіофармпрепаратів для специфічної візуалізації та терапії онкологічних захворювань. – Рукопис.

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Харків, 2026.

45 с., 10 рис., 4 табл., 37 джерел.

Тераностика з використанням радіофармацевтичних препаратів дозволяє візуалізувати та лікувати онкологічні захворювання у межах єдиного процесу. Одним з новітніх підходів у такому методі є система «молекулярних двійників» (Molecular Twins). При її застосуванні, до складу як діагностичного, так і терапевтичного препаратів входять обидва функціональні ізотопи, проте, відповідно до призначення сполуки, один з них включений у стабільній формі, а другий – у радіоактивній.

Метою цієї роботи є віртуальний скринінг 8 тераностичних радіофармпрепаратів класу Molecular Twins для оцінки їхньої спорідненості до таргетних мішеней, а саме фолатних рецепторів альфа та бета (FR- α та FR- β), і прогнозування біологічної ефективності.

У результаті проведення молекулярного докінгу рецепторів із досліджуваними сполуками виявлено, що зв'язування із FR- α відбулося у фізіологічно-релевантній конформації для 5 препаратів. Причинами утворення неспецифічних комплексів ставали відмінності у альбумін-зв'язуючих групах сполук, які могли створювати стеричні конфлікти при наближенні лігандів до сайту зв'язування. При цьому, під час дослідження спорідненості препаратів до FR- β показано, що зв'язування у коректній акцепторній кишені рецептора бета не відбулося для жодного з кон'югатів. Порівняльний аналіз рецепторів продемонстрував, що суттєва відмінність між результатами докінгу для обох рецепторів може полягати, зокрема, у розподілі електростатичних потенціалів на їх поверхнях.

Отримані результати можуть застосовуватися з метою подальшої розробки високоспецифічних радіофармпрепаратів класу молекулярних двійників для точної діагностики і терапії ряду онкологічних захворювань.

Ключові слова: радіофармпрепарати, фолатні рецептори, тераностика, молекулярні двійники, таргетна доставка, афінність, молекулярний докінг.

SUMMARY

Butenko A.M. – Virtual screening of promising theranostic radiopharmaceuticals for specific imaging and therapy of oncological diseases. – Manuscript.
Bachelor's thesis in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" –
V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2026.
45 pages, 10 figures, 4 tables, 37 sources.

Radiopharmaceutical-based theranostics enables simultaneous visualization and treatment of oncological diseases within a single procedure. One of the innovative approaches in this field is the concept of "Molecular Twins." Within this framework, both functional isotopes are integrated into the structure of both diagnostic and therapeutic agents, however, depending on the specific purpose of the compound, one isotope is included in its stable form, while the other is in its radioactive state.

The aim of this study is the virtual screening of eight theranostic radiopharmaceuticals belonging to the Molecular Twins class to evaluate their affinity toward target receptors, specifically folate receptors alpha and beta (FR- α and FR- β), and to predict their biological efficacy.

Molecular docking simulations of the target receptors with the investigated compounds revealed that only five radiopharmaceuticals coordinated within FR- α in a physiologically relevant conformation. The formation of non-specific complexes in the remaining cases was driven by structural differences in the albumin-binding moieties of the compounds, which induced steric clashes as the ligands approached the binding site. Concurrently, the affinity analysis toward FR- β demonstrated that none of the conjugates achieved proper coordination within the native binding pocket of the beta receptor. Comparative analysis of the receptors indicated that the substantial discrepancy between the docking outcomes for the two isoforms can be attributed, in particular, to the distinct electrostatic potential distribution on their molecular surfaces.

The obtained results can be utilized for the further development of highly specific radiopharmaceuticals of the Molecular Twins class, aimed at the precise diagnosis and therapy of a wide range of oncological diseases.

Keywords: radiopharmaceuticals, folate receptors, theranostics, Molecular Twins, targeted delivery, affinity, molecular docking.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
Розділ 1.1 Тераностичні радіофармпрепарати в сучасній онкології	9
Розділ 1.2 Фолатні рецептори як мішень для таргетної доставки протипухлинних агентів	15
Розділ 1.3 Концепція Molecular Twins у розробці тераностичних препаратів	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВІРТУАЛЬНОГО СКРИНІНГУ ТЕРАНОСТИЧНИХ РАДІОФАРМПРЕПАРАТІВ КЛАСУ MOLECULAR TWINS	25
Розділ 3.1 Структурна характеристика досліджуваних сполук та аналіз сайтів зв'язування фолату у фолатних рецепторах	25
Розділ 3.2 Молекулярний докінг та аналіз спорідненості досліджуваних сполук із білковими мішенями	29
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

FDA – Управління продовольства та медикаментів США

FR – фолатний рецептор

GPI – глікозилфосфатидилінозитол

КТ – комп’ютерна томографія

ОФЕКТ – однофотонна емісійна комп’ютерна томографія

ПЕТ – позитрон-емісійна томографія

РФП – радіофармпрепарат

ВСТУП

Упродовж останнього століття поширеність смертності від онкологічних захворювань зростає з десятого до другого місця, поступаючись лише захворюванням серцево-судинної системи. За даними Міжнародного агентства з дослідження раку, у 2022 році було зареєстровано приблизно 20,0 мільйонів нових випадків раку та 9,7 мільйонів смертей від цієї хвороби, тоді як до 2030 року прогнозується 24,1 мільйона випадків та 11,9 мільйонів смертей [1]. В Україні у 2022 році було зареєстровано близько 106 тисяч пацієнтів із цим діагнозом, а кількість зареєстрованих смертей сягнула більше 42 тисяч [2].

Усесвітній масштаб розповсюдженості цього захворювання та щорічне збільшення кількості зареєстрованих випадків спонукає до постійного посилення досліджень спрямованих на вдосконалення методів діагностики та лікування раку.

Одним з основних викликів розповсюджених способів терапії онкологічних захворювань є їх неспецифічний вплив на здорові органи людини, що призводить до широкого спектру побічних ефектів та суттєво погіршує якість життя пацієнта. До того ж, у випадках, коли пухлина знаходиться близько до або безпосередньо у органах ризику, її повноцінне лікування може ставати неможливим.

Через це високого наукового інтересу набуває таргетна терапія, за якої лікарський засіб діє лише вибірково на специфічні молекулярні мішені ракових тканин, завдяки чому здорові тканини ушкоджуються мінімально. Зокрема, такий метод лікування може застосовуватися з використанням радіофармакологічних препаратів – лікарських засобів, що містять радіоактивні ізотопи. На відміну від променевої терапії, де випромінювання надходить ззовні, радіофармпрепарати дозволяють доставляти його високоцитотоксичні дози напряму до ракових клітин, знищуючи їх із щонайменшою шкодою до оточуючих тканин.

Важливо, що використання радіофармпрепаратів не обмежується терапією. Такі засоби ефективні і в діагностичних цілях, адже, накопичені

у пухлині, їх можна візуалізувати за допомогою різних методів томографії та отримати детальне зображення локалізації захворювання. Через це, такі препарати можуть слугувати як дієві тераностичні агенти – сполуки, які застосовуються для поєднання діагностики з терапією.

Для доставки радіоактивної дози до зони пухлини радіонукліди поєднують із таргетними групами. Вони цілеспрямовано діють на певні біомаркери, які надмірно експресуються на пухлинних клітинах. Зокрема, в останні роки було виявлено багато рецепторів, які гіперекспресуються на ракових клітинах, наприклад, фолатні рецептори. Альфа ізоформа таких рецепторів була знайдена у різних видах ракових тканин, включаючи рак яєчників, недрібноклітинний рак легенів та рак товстої кишки, тоді як фолатні рецептори бета часто формуються у клітинах, пов'язаних із раком печінки, нирок, або легень [20-24].

Сучасний підхід у тераностиці із застосуванням радіофармпрепаратів полягає у використанні двох препаратів, що мають однакову таргетну частину та різні радіоізотопні – діагностичну та терапевтичну. При цьому, відмінності у хімічному складі та фізичних параметрах цих двох форм можуть призводити до невідповідності між результатами візуалізації та подальшим плануванням лікування [30]. З метою вирішення цього недоліку було запропоновано удосконалений підхід, за якого і діагностичний, і терапевтичний препарати мають у складі обидва використовуваних радіонукліда, проте, залежно від функції, один з них є знаходиться у радіоактивній формі, а інший у стабільній – нерадіоактивній. Радіофармпрепарати, розроблені у такому методі, отримали назву Molecular Twins (англ. – молекулярні двійники) [32].

Мета цієї роботи полягає у віртуальному скринінгу перспективних тераностичних радіофармпрепаратів класу молекулярних двійників (Molecular Twins) для оцінки їхньої спорідненості до фолатних рецепторів та прогнозування біологічної ефективності.

Для виконання роботи було сформульовано та вирішено наступні завдання: 1) Провести структурну характеристизацію та пошук стабільних конформерів досліджуваних радіофармпрепаратів та виконати геометричну оптимізацію найбільш енергетично вигідних структур; 2) Визначити кристалографічну локалізацію та просторову орієнтацію фолату у сайті зв'язування фолатних рецепторів α та β за даними Protein Data Bank для валідації результатів докінгу; 3) Провести молекулярний докінг досліджуваних сполук із фолатними рецепторами α і β для оцінки їхньої рецепторної спорідненості; 4) Проаналізувати та порівняти аффіність і передбачувані сайти зв'язування для досліджуваних сполук у двох білкових мішенях; 5) Встановити залежність між структурними особливостями молекулярних двійників та їх афінністю до досліджуваних білкових мішеней на основі результатів молекулярного докінгу.

III використовувався для перевірки орфографії.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Розділ 1.1 Тераностичні радіофармпрепарати в сучасній онкології

Термін «тераностика» був сформований як поєднання слів «терапія» та «діагностика» для опису концепції використання однієї й тієї ж сполуки для візуалізації та лікування одного й того ж захворювання [6].

Тераностика з використанням радіофармпрепаратів (РФП) – це спосіб лікування захворювань (зокрема онкологічних), за якого радіоактивні ізотопи використовуються для обох згаданих задач. У такому випадку тераностичні агенти складаються з біфункціональної сполуки, один домен якої зв'язується з таргетним агентом, а інший – з радіонуклідом.

Радіонуклідна частина фактично відповідає за дві основні описані функції – діагностичну та терапевтичну.

Найпростішим методом візуалізації з використанням радіофармпрепаратів є планарна сцинтиграфія. Вона використовує радіонукліди, які випромінюють один гамма-квант на один радіоактивний розпад [8]. Принцип її дії полягає в реєстрації випромінених препаратом гамма-променів за допомогою гамма-камери та формування двовимірного зображення. Основою гамма-камери є детектор зі сцинтиляційного матеріалу, який створює слабкий спалах світла, коли гамма-промені, що випромінюються пацієнтом, потрапляють на нього. Це світло виявляється фотопомножувачами, які перетворюють світло на електронні сигнали, величина яких визначається інтенсивністю світла [7].

Інший метод – однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (ОФЕКТ) – також базується на принципах планарної сцинтиграфії, але дозволяє отримувати кілька проекцій навколо пацієнта, утворюючи тривимірні зображення. У цьому методі для діагностики використовується дві (інколи три) «головки» гамма-камери, які шляхом одночасного обертання формують необхідний набір проекцій, який потім реконструюється у тривимірний набір даних, подібно до рентгенівської КТ.

Врешті, у позитрон-емісійній томографії (ПЕТ) використовуються радіоізотопи, які випромінюють позитрони. Після випромінення вони анігілюють з електронами з утворенням двох фотонів енергією 511 кеВ, що випромінюються в протилежних напрямках [8]. ПЕТ-сканери складаються з кільця гамма-камер, здатних виявляти обидва фотони одночасно. Точка, з якої відбувалося випромінювання, завжди знаходиться на одній лінії між детектованими подіями, таким чином розподіл подій в тілі відображається накладанням отриманих ліній [7]. Реконструкція даних також дозволяє отримувати тривимірний набір даних.

Порівняно більша кількість міток була синтезована саме з радіонуклідами для ПЕТ. Наприклад, широко використовуваною для візуалізації онкологічних захворювань є (^{18}F)фтордезоксиглюкоза (ФДГ) – аналог глюкози, який поглинається клітинами з високим її споживанням, при цьому не метаболізується в них, через відсутність 2-гідроксильної групи, що призводить до внутрішнього накопичення препарату [9]. Таким чином, розподіл (^{18}F)ФДГ зображений за допомогою ПЕТ добре відображає метаболізм глюкози в організмі, показуючи регіони, де вона накопичується більше (зокрема пухлинні вогнища).

Найбільш розповсюдженим у використанні в ядерній медицині радіоізотопом загалом є Технецій-99m, який застосовується у приблизно 80% всіх медичних процедур такого типу [10]. Період напіврозпаду цього елемента становить шість годин, чого достатньо для проведення необхідних досліджень і замало для виклику шкідливого впливу на пацієнта. Він є досить універсальним з хімічної точки зору, що дає можливість створювати багато фармпрепаратів з різними таргетними лігандами. Також, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ має відносно легкий спосіб доставки до медичних центрів – свинцеві горщики з відпрацьованим Молібден-99 з періодом напіврозпаду 66 годин постачаються з ядерних реакторів, і Технецій-99m, який поступово розпадається з ^{99}Mo , вимивається з резервуара фізіологічним розчином,

коли це необхідно. Ці переваги дозволяють Технецію-99m мати велику розповсюдженість у медичній практиці.

Що стосується терапевтичної складової, основним принципом роботи всіх препаратів такого класу є передача енергії іонізуючим випромінюванням, яка призводить до розривів ланцюгів у клітинній ДНК. Це може відбуватися двома способами: опосередковано, шляхом утворення нестабільних вільних радикалів, які далі завдають шкоди оточуючим молекулам, або безпосередньо, коли саме випромінювання взаємодіє з ДНК. Пошкодження може бути у формі одноланцюгового або дволанцюгового розриву, і оскільки клітині важче правильно відновити саме дволанцюгові розриви, то випромінювання, яке викликає більше таких розривів, є більш цитотоксичним.

Здатність різних форм випромінювання до пошкодження не є однаковою. Основними параметрами, які впливають на рівень радіаційного пошкодження та діапазон його виникнення є лінійний перенос енергії (LET) та відносна біологічна ефективність (RBE). LET виражається як кількість енергії, виділена на одиницю відстані, яку пройшло випромінювання, а RBE визначається як відношення дози, необхідної від стандартного визначеного випромінювання (зазвичай рентгенівського) до дози використовуваного випромінювання для досягнення однакового біологічного ефекту.

Для терапевтичних цілей здебільшого використовується випромінювання спричинене альфа або бета-мінус розпадами.

α -частинки мають енергії від 5 до 9 MeV з відповідним діапазоном уражених тканин близько 5-10 діаметрів клітин (до 50 мкм), рухаються по прямих лініях та виділяють 80–100 кеВ/мкм вздовж більшої частини своєї траєкторії [12]. Через це їх класифікують як частинки з високим показником LET. У результаті α -частинки можуть суттєво впливати на пухлинні клітини, не зачіпаючи навколишні нормальні тканини.

При оцінці терапевтичної ефективності емітерів α -частинок необхідно наступні фактори: відстань атома, що розпадається, до ядра клітини-мішені;

внесок віддачі важких іонів дочірнього атома, у випадках коли випромінювач α -частинок ковалентно зв'язаний з ядерною ДНК; значення перехресної дози, коли випромінена з різних джерел енергія перетинається в одній точці [11].

Через високий період напіврозпаду, низьку здатність стабільно кон'югуватися з молекулами-мішенями, низьку доступність, та інші фактори, на сьогоднішній день існує небагато радіоізотопів, що випромінюють α -частинки, доступних до використання в РНТ. Серед досліджуваних – Радій-223, Актиній-225, Торій-227, Вісмут-212 та -213, Плюмбум-212 та Астат-211, але тільки перший з них був схвалений Управлінням продовольства та медикаментів США (FDA) [14].

Радіонукліди, що розпадаються шляхом випромінювання β -частинок, використовуються для радіотерапевтичних застосувань у сучасній клінічній практиці набагато частіше. Коли β -частинки проходять крізь речовину, вони втрачають кінетичну енергію таким чином, що зрештою рухаються викривленою траєкторією та зупиняються. Через їхню малу масу енергія віддачі дочірнього ядра є незначною, а відстань, яку вони здатні проходити в тканинах організмів досягає до 12 мм. LET β -частинок ($\sim 0,2$ кеВ/мкм) є дуже низькою відносно цього параметра для α -частинок, через низьку щільність іонізації вздовж їхніх траєкторій, через що для отримання такої ж поглиненої дози потрібно більше частинок у порівнянні з α -частинками. При цьому, варто враховувати велике значення перехресної дози при опроміненні такими радіонуклідами, яке виникає через описані вище параметри [11, 12].

Найбільш відомою та часто використовуваною β -частинкою є Йод-131 для терапії гіпертиреозу та раку щитоподібної залози. Оскільки йод вибірково поглинається тканиною цієї залози, він може одночасно виконувати функцію як тераностичного агента, так і таргетної сполуки. Також, протягом останніх 40 років, були схвалені до використання Самарій-153, Лютецій-177, Ітрій-90. Більшість інших досліджених радіонуклідів не

отримали широкого застосування з причин обмеженої доступності або складного радіохімічного процес виробництва [15].

Виникає необхідність у класифікації β -частинок за показником випромінюваної енергії. Радіоізотопи високої енергії, такі як ^{90}Y та ^{188}Re , енергія яких становить 2,28 MeV та 2,21 MeV відповідно, можуть викликати перехресне опромінення сусідніх клітин, а отже вони кращі для пухлин більшого об'єму, пухлин з поганою перфузією та менш придатні для впливу на мікрометастази. Для невеликих пухлин більш ефективними з терапевтичної точки зору є низькоенергетичні β -частинки, такі як ^{177}Lu [16].

Наразі також проводяться дослідження щодо використання радіонуклідів, які утворюють Оже-електрони. Їхньою найбільшою перевагою є випромінювання дуже короткої дальності (1-1000 нм), а також середнє між α - та β -частинками значення LET (4–26 кеВ/мкм). Таким чином, при локалізації препарату в ядрі клітини, можливе досягнення високої цитотоксичності [15]. Бром-77, Індій-111, Йод-123 та Йод-125 є найпоширенішими випромінювачами Оже-електронів у сучасних дослідженнях, проте на сьогодні немає жодних препаратів на їх основі схвалених FDA.

Що стосується другої основної складової будь-якого РФП – специфічного до певної мішені ліганда – їхня дія базується на таргетному методі доставки лікарських засобів. За цього методу лікарський засіб модифікується таким чином, щоб концентруватися у цільових клітинах або органах, задаючи щонайменшої шкоди для інших, здорових тканин. За механізмом він поділяється на два основних типи – пасивний та активний [3].

Принципом пасивного методу доставки є оптимізація складу та розміру препарату, що призводить до підвищення його специфічності до певного органу. Зокрема при лікуванні ракових захворювань, такий таргетинг може базуватися на EPR ефекті, за якого макромолекули або наночастинки

вибірково накопичуються у пухлинних тканинах через підвищену судинну проникність та порушений лімфовідтік [4].

Активний спосіб специфічної доставки підсилює ефекти пасивного за рахунок функціоналізації препарату таргетних елементів. Ними можуть бути клітинно-специфічні ліганди, які дозволяють таргетній частинці специфічно зв'язуватися з клітиною, що має комплементарний рецептор. Наприклад, більшість пухлин надмірно експресують рецептори факторів росту та пептидних гормонів. Молекули, які були ідентифіковані як потенційно успішні мішені, включають фолат та трансферин [5].

Коли ліганд досягає рецептора, його поглинання в клітину зазвичай забезпечується клатрин-опосередкованим ендоцитозом – процесом поглинання фрагментів, що знаходяться на мембрані (зокрема активованих рецепторів), у клітину у вигляді везикул, покритих зовні решіткою з полімеризованого клатрину, білку, що функціонує на поверхні мембран. Білки-адаптери опосередковують взаємодію рецепторів з молекулами клатрину, які формують вигин всередину клітини. У результаті, везикула вкрита клатриновою структурою, відщеплюється від плазматичної мембрани всередину клітини та врешті зливається із ранньою ендосоною [18].

Для утворення комплексу радіонукліда із таргетним агентом використовуються хелати та лінкери. Хелатуючі сполуки беруть участь у формуванні стабільного зв'язку між радіометалом та іншою частиною молекули РФП. Серед розповсюджених хелаторів – циклічна DOTA (1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-тетраоцтова кислота) та лінійна DTPA (діетилентріамінпентаоцтова кислота). Іноді між ними також можуть розташовуватися лінкери – сполуки, які напрямлені на модифікацію фармакокінетичних властивостей препарату. Поширеними є PEG (поліетиленгліколь), EGS (етиленгліколь-біс-сукцинімідилсукцинат) та DSS (дисукцинімідилсуберат) [29].

Розділ 1.2 Фолатні рецептори як мішені для таргетної доставки протипухлинних агентів

Фолат (вітамін B9) – це водорозчинний вітамін, який має важливе значення для розвитку організмів, а також у онкогенезі. Він діє як кофермент, що бере участь у реакціях переносу одного вуглецевого атома для синтезу та відновлення нуклеотидів, метилювання амінокислот, білків та ліпідів, а також утворення еритроцитів.

Існують різні рецептори з високою спорідненістю до фолатів: відновлений переносник фолату (RFC), протон-зв'язаний транспортер фолату (PCFT) та рецептор фолату (FR). У здорових тканинах основним механізмом надходження фолатів з крові є RFC та PCFT, тоді як FR розташовані на апікальній поверхні поляризованих клітин, що обмежує їхній доступ до захоплення циркулюючого фолату. У таких випадках вони відповідають за більш спеціалізовані функції, як-от реабсорбція фолату з первинної сечі у нирках або транспорт фолату до плода у плаценті [19]. При цьому у пухлинних клітинах полярність часто порушена, що призводить до підвищеної доступності рецепторів для фолатів. Це є однією з головних причин вибору фолатних рецепторів як мішеней для таргетної доставки для лікування раку.

Відомо про п'ять різних ізоформ фолатних рецепторів – α , β , γ , γ' та δ . Всі вони є глікопротеїнами, проте FR- α та FR- β – це мембранозв'язані глікозилфосфатидилінозитолові (GPI) якірні глікопротеїни, тоді як FR- γ знаходиться лише в гемопоетичних клітинах і не має GPI-компонента, що робить його добре розчинним, а FR- δ досі є недостатньо охарактеризованим, що свідчить про високу обмеженість його просторової та часової експресії [20]. Через це, а також через те, що для FR- α та FR- β зафіксовано значно вищу експресію у певних типах ракових тканин, порівняно з нормальними, вони є найбільш дослідженими.

У нормальних тканинах дорослої людини FR- α експресується в проксимальних каналцях нирок, слинних залозах, судинному сплетенні, плаценті, маточних трубах та легенях. Він має високу спорідненість до фолієвої кислоти, а також до інших відновлених фолатів, таких як 5-метилтетрагідрофолат та тетрагідрофолат.

При цьому, цей рецептор відіграє значну роль у різних процесах, необхідних зокрема для онкогенезу, таких як синтез ДНК, проліферація клітин, репарація ДНК та внутрішньоклітинна сигналізація. Наприклад, зв'язування фолатів з FR- α призводить до серії внутрішньоклітинних сигнальних каскадів через фосфорилування, яке активує шлях ERK, STAT3, що, у свою чергу, призводить до активації регуляторних механізмів, задіяних у рості клітин. Таким чином, у пухлинних тканинах FR- α діє як сигнальна молекула, що збільшує рухливість та метастазування клітин [21].

Дослідження показали, що FR- α надмірно експресується в багатьох епітеліальних видах раку, включаючи рак яєчників, матки, нирок, молочної залози, легень, товстої кишки, передміхурової залози та мозку. Наприклад, для раку яєчників та ендометрію FR- α зустрічається у 90% випадків, а для нирок та легень у понад 70% [20, 21].

Ізоформа FR- β є на приблизно 70% гомологічною до FR- α і має подібну афінність до фолатів. Цей рецептор експресується у не-епітеліальних тканинах, а саме на активованих мієлоїдних клітинах (переважно моноцитах і макрофагах), які беруть участь у запальних процесах та аутоімунних захворюваннях.

FR- β також був виявлений у пухлинно-асоційованих макрофагах (TAM) багатьох видів раку, включаючи рак печінки, нирок, шкіри, легень, крові і м'яких тканин [22]. Зокрема, FR- β був знайдений у 70% зразків біопсії пацієнтів з гострим мієлоїдним лейкозом, а рівень експресії на TAM перевищує 50-60% [23].

Транспорт зв'язаного з FR- α та FR- β лігандів відбувається за механізмом потоцитозу, специфічного для GPI-якірних білків та відмінного від класичного клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Утворювані в цьому процесі везикули називаються кавеолами та складаються з білку кавеолін-1, який знаходиться в ліпідних рафтах плазматичної мембрани. Після відщеплення від мембрани та злиття везикули з ранньою ендосоною, протонні насоси знижують рН середовища, що змінює конформацію FR та дозволяє ліганду від'єднатися від рецептора, після чого він транспортується в цитоплазму за допомогою протон-зв'язаного механізму [22].

Важливим у контексті таргетної доставки також є те, що рецептори фолієвої кислоти швидко повертаються на поверхню клітини для участі в подальших циклах інтерналізації лігандів.

Фолієва кислота складається з трьох основних частин – птеридинового кільця, р-амінобензойної кислоти та залишку глютамінової кислоти. Перші дві формують так звану птероатну частину молекули, яка забезпечує взаємодію з фолатним рецептором.

Дослідження кристалографічної структури для FR- α та FR- β з фолієвою кислотою продемонструвало, що в обох випадках при зв'язуванні птероатний фрагмент занурений глибоко всередині кишені зв'язування FR, тоді як глютаматний фрагмент виступає назовні входу до сайту [24, 25].

Існує два основних методи синтезу РФП на основі фолатів. За використання так званого «підвісного підходу» (pendant approach) ліганд кон'югується з фолієвою кислотою через одну з двох карбоксильних функціональних груп в α - або γ - положенні глютаматного фрагмента. Інший метод має назву «інтегрований підхід» (integral approach). Ліганд у ньому де іон фториду розташовується на фолатному каркас без використання хелатора або простетичної групи. Більшість хіміотерапевтичних та радіофармацевтичних препаратів на основі фолієвої кислоти на сьогодні отримуються за допомогою підвісного підходу шляхом дериватизації в γ - положенні [19].

Різні фолатні кон'югати були розроблені для використання у діагностиці. Для ОФЕКТ/КТ візуалізації досліджується використання описаного вище ^{99m}Tc , яким мітять гістидин-фолат або етарфолатид, а також ^{111}In -DTPA-фолату, де DTPA виступає хелатором, та ^{111}In -DOTA-фолату, де відповідно хелатором виступає DOTA.

Серед агентів використовуваних для ПЕТ діагностики, вивчалися ^{68}Ga -дефероксамін-фолат, ^{18}F флуоро-PEG-фолат, ^{18}F FOL, та інші. Усі досліджувані препарати показували значні результати накопичення в зонах інтересу та забезпечували високу специфічність для візуалізації пухлин [26, 27]. У клінічних дослідженнях для виявлення FR- α -позитивних пухлин за допомогою ПЕТ/КТ було досліджено лише ^{18}F -AzaFol, який успішно пройшов перші фази досліджень [27].

Багато радіонуклідів, що кон'югують з фолатами, було досліджено також і з точки зору застосування у тераностичних цілях. Наприклад, ^{177}Lu вважається перспективною міткою, з огляду на стабільність при утворенні комплексів із різними хелаторами. Серед інших, використовувалися пари ^{177}Lu з ^{18}F , ^{68}Ga , ^{99m}Tc або ^{188}Re , та ^{90}Y з ^{68}Ga або ^{64}Cu [27]. Залежно від виду пухлини, усі радіофолати продемонстрували позитивний вплив на регресію пухлини.

Розділ 1.3 Концепція Molecular Twins у розробці тераностичних препаратів

Як було з'ясовано раніше, у тераностиці для одного протоколу лікування використовується одна пара радіофармацевтичних препаратів, серед яких один відповідає за візуалізацію пухлин, а другий за їх терапію.

На сьогодні використовується метод молекулярно споріднених пар (Molecular Relatives), коли діагностичний та терапевтичний радіометали кон'югують з однією і тією ж таргетною сполукою. Одним з основних недоліків такого підходу є те, що у такому разі РФП не є хімічно

ідентичними. Відповідно, зміна сполуки впливає на поведінку *in vivo* – фармакокінетичні властивості, біорозподіл та спорідненість до мішені. Таким чином, прогнозування відповіді пухлини на терапію, базуючись на зображеннях, отриманих з діагностичним препаратом, може бути неточним та призводити до неправильного розрахунку необхідної терапевтичної дози препарату.

Серед основних причин зміни поведінки РФП при зміні радіонукліда можна навести наступні:

1. Стеричні властивості: різні радіонукліди мають різні іонні радіуси та координаційні числа. Це створює умови, за яких вони зв'язуються з хелатором неідентично, що може змінювати форму кінцевого кон'югата. Таким чином, якщо хелатор знаходиться біля таргетної ділянки ліганда, це може впливати на спорідненість сполуки із рецептором та різні показники накопичення в пухлині.
2. Атомна маса: різниця у масі молекули, спричинена зміною радіонукліда, може впливати на фармакокінетичні властивості РФП, сповільнюючи або прискорюючи його поглинання, або змінюючи параметри виведення сполуки з організму.
3. Електронегативність: при зміні радіонуклідів, можливе зміщення електронної густини, що також призводить до зменшення або збільшення афінності РФП до рецептора.
4. Розподіл зарядів: ця величина впливає на параметри ліпофільності всієї сполуки. Отже при заміні радіонукліда можлива зміна цього параметру, що зокрема призводить до відмінності у параметрах проходження через біологічні мембрани.

Дослідження з цієї теми доводять, що першочерговим фактором впливу є афінність до рецепторів. Так, при зміні Лютецію-177 на Індій-111 у складі радіофармпрепарату (хелатор та таргетна сполука залишалися ідентичними) спорідненість зв'язування з рецептором зменшувалась у

понад 5 разів, а при використанні Галію-68 втрата спорідненості спостерігалася на рівні 39 разів [30, 31].

Безпосередній вплив на біорозподіл також спостерігається у дослідженнях. Зокрема, при заміні Лютецію-177 на Індій-111, яка описувалась вище, рівень накопичення препарату у пухлині знижувався на 6.1% (30.0% для Лютецію порівняно з 23.9% для Індію) [31].

З метою уникнення цієї проблеми було досліджено пари тераностичних агентів з хімічно відповідними радіонуклідами, такими як йод $^{123}\text{I}/^{124}\text{I}/^{125}\text{I}$ (візуалізація) та ^{131}I (терапія); ^{64}Cu та ^{67}Cu ; $^{43}\text{Sc}/^{44}\text{Sc}$ та ^{47}Sc ; ^{86}Y та ^{90}Y . Афінність до рецепторів, біорозподіл, та інші показники у таких випадках мали кращі клінічні результати. Однак їхнє широке застосування є обмеженим, оскільки йодовані РФП мають недостатню стабільність при застосуванні *in vivo*, тоді як пари радіометалів мають низьку доступність для клінік [28].

Через це було запропоновано концепцію хімічно ідентичних пар – молекулярних двійників (Molecular Twins). У її основі полягає створення пар радіофармпрепаратів, в яких обидва агенти міститимуть діагностичний та терапевтичний нукліди, і, залежно від застосування, один з них буде радіоактивним, тоді як інший присутній в нерадіоактивній формі. Таким чином структура, маса, хімічна конфігурація, та інші властивості діагностичних агентів та терапевтичних агентів будуть однаковими, і водночас вони виконуватимуть різні функції [32].

Наприклад, у якості тераностичної пари можуть використовуватися Фтор, як діагностичний агент, та Лютецій як терапевтичний. Тоді, РФП, що буде застосовуватися для візуалізації пухлини, буде містити радіоактивний ^{18}F та стабільний ^{175}Lu . Фтор-18 забезпечуватиме високу роздільну здатність ПЕТ-сканів завдяки короткому діапазону випромінюваних позитронів, а також він є легко-доступним відносно його аналогів, зважаючи на умови його виробництва та транспортування.

В якості терапевтичного агенту у такому разі необхідно використовувати сполуку з радіоактивним ^{177}Lu та стабільним ^{19}F . Лютецій-177 має короткий радіус β -випромінювання, період напіврозпаду 6,7 днів та високу стабільність при зв'язуванні з хелаторами, що також робить його вигідним у широкому клінічному використанні.

Важливо зазначити, що характер хімічних зв'язків у молекулі, її геометрія та міжмолекулярні взаємодії залежать саме від електронної конфігурації елементів. А заміна стабільного ізотопу на радіоактивний супроводжується лише зміною кількості нейтронів у атомі, у той час як число протонів та електронів залишаються сталим. Відповідно, така процедура не має впливати на, у тому числі, спорідненість молекули до біологічних мішеней. Можливі незначні зміни коливальних характеристик хімічних зв'язків через зміну маси атомів, проте для великих молекулярних систем цей вплив є мінімальним та не відображається на зв'язуванні чи інших властивостях препарату.

У результаті, використання тераностичних пар Molecular Twins забезпечує повну хімічну, структурну та кінетичну ідентичність між діагностичним і терапевтичним агентами. Збереження незмінної молекулярної маси, просторової конфігурації, розподілу електронної густини та заряду результує у відповідності параметрів афінності до таргетних рецепторів та біорозподілу *in vivo* та усуває похибки, притаманні методу Molecular Relatives. Відповідно, висока прогнозованість поведінки обох складових РФП дозволяє складати протоколи лікування та прогнозувати його ефективність із значно вищою точністю.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Спершу нам необхідно було провести пошук стабільних конформерів 8 досліджуваних сполук радіофармпрепаратів. Конформери (конформаційні ізомери) – це просторові ізомери молекули, які виникають в результаті

обертання навколо σ -зв'язків. Для їх пошуку було використано програму Marvin Sketch (v. 18.10), де для кожної сполуки було проведено конформаційний аналіз та отримано по 10 конформерів [33]. У кожному випадку було обрано один конформер з найменшим значенням внутрішньої енергії. Після цього, для 8 фінальних отриманих конформерів було додатково проведено геометричну оптимізацію за допомогою програми Avogadro (v. 1.1.0) [34].

Для виконання наступного завдання, а саме визначення кристалографічної локалізації та просторової орієнтації фолату у сайті зв'язування FR- α та FR- β , було використано тривимірні структури фолатних рецепторів у комплексі з фолієвою кислотою з бібліотеки Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) за допомогою кодів 4LRH (Crystal structure of human folate receptor alpha in complex with folic acid) та 4KMZ (Human folate receptor beta (FOLR2) in complex with the folate) для рецептору альфа та бета відповідно.

Аналіз сайтів зв'язування виконувався за допомогою програми Discovery Studio (v. 25.1.0.24284) [35]. Було досліджено координати сайтів зв'язування та амінокислотні залишки, що входять до складу рецепторів та беруть участь у стабілізації комплексів фолієвої кислоти з ними. Додатково, за допомогою цієї ж програми було виділено структуру фолатних рецепторів без фолату та інших домішок (таких як молекул води та ін.) для подальшої процедури докінгу.

З використанням пакету програм AutoDock було проведено докінг FR- α та FR- β з фолієвою кислотою та з 8 фінальними сполуками РФП.

Програмне забезпечення AutoDock призначене для прогнозування просторової орієнтації низькомолекулярних лігандів у сайті зв'язування білкових мішеней та оцінки їхньої спорідненості. Програма використовує алгоритм ламарківського генетичного пошуку (Lamarckian Genetic Algorithm, LGA), який поєднує глобальний стохастичний пошук із локальною оптимізацією конформацій ліганду. Також застосовується

алгоритм глобальної оптимізації Iterated Local Search. Вхідні та вихідні структури докінгу зберігаються у форматі PDBQT [36].

У нашому випадку, під час докінгу рецептор розглядався як жорстка структура, тоді як ліганд мав обмежену конформаційну рухливість, що відповідає стандартним припущенням алгоритму AutoDock Vina.

Проведення молекулярного докінгу складалося з декількох етапів. По-перше, нам необхідно було підготувати структури для цього процесу. За допомогою програми AutoDock Tools (v. 1.5.7) до молекул рецепторів було додано полярні атоми водню (Polar Only Hydrogens) з метою забезпечення коректного моделювання. Додавання полярних атомів Гідрогену (тих, які пов'язані з O-H, N-H, S-H) допомагає програмі правильно враховувати водневі зв'язки між рецептором та лігандом, які відіграють важливу роль при стабілізації комплексу. При цьому неполярні атоми водню не є необхідними, оскільки програмне забезпечення AutoDock використовує модель об'єднаних атомів (united atom model).

Після цього, в окремий текстовий документ було внесено дані про розташування та розміри просторової області докінгу (grid box). Для цього ми використовували координати центрів зв'язування рецепторів з фолатом визначені за допомогою програми Discovery Studio у попередньому етапі.

Ці підготовчі кроки дозволили нам перейти до процедури докінгу. Спочатку його було проведено між FR- α та фолатом і FR- β та фолатом. Після цього було те саме повторили між рецепторами та 8 фінальними структурами РФП.

Отримані у результаті докінгу 2 структури «рецептор-фолат» та 16 структур «рецептор-радіофармпрепарат» було завантажено до Discovery Studio, де ми дослідили утворені сайти зв'язування. Ця програма також використовувалася на етапі аналізу розмірів акцепторної кишені фолатних рецепторів.

Визначення електростатичних зарядів на поверхнях білків-рецепторів проводилося за допомогою програмного забезпечення PyMOL Molecular Graphics System (v. 3.0) [37].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВІРТУАЛЬНОГО СКРИНІНГУ ТЕРАНОСТИЧНИХ РАДІОФАРМПРЕПАРАТІВ КЛАСУ MOLECULAR TWINS

Розділ 3.1 Структурна характеристика досліджуваних сполук та аналіз сайтів зв'язування фолату у фолатних рецепторах

Для дослідження було обрано 8 сполук радіофармпрепаратів. Кожна з них складається з трьох основних структурних груп – таргетна, терапевтична, та діагностична.

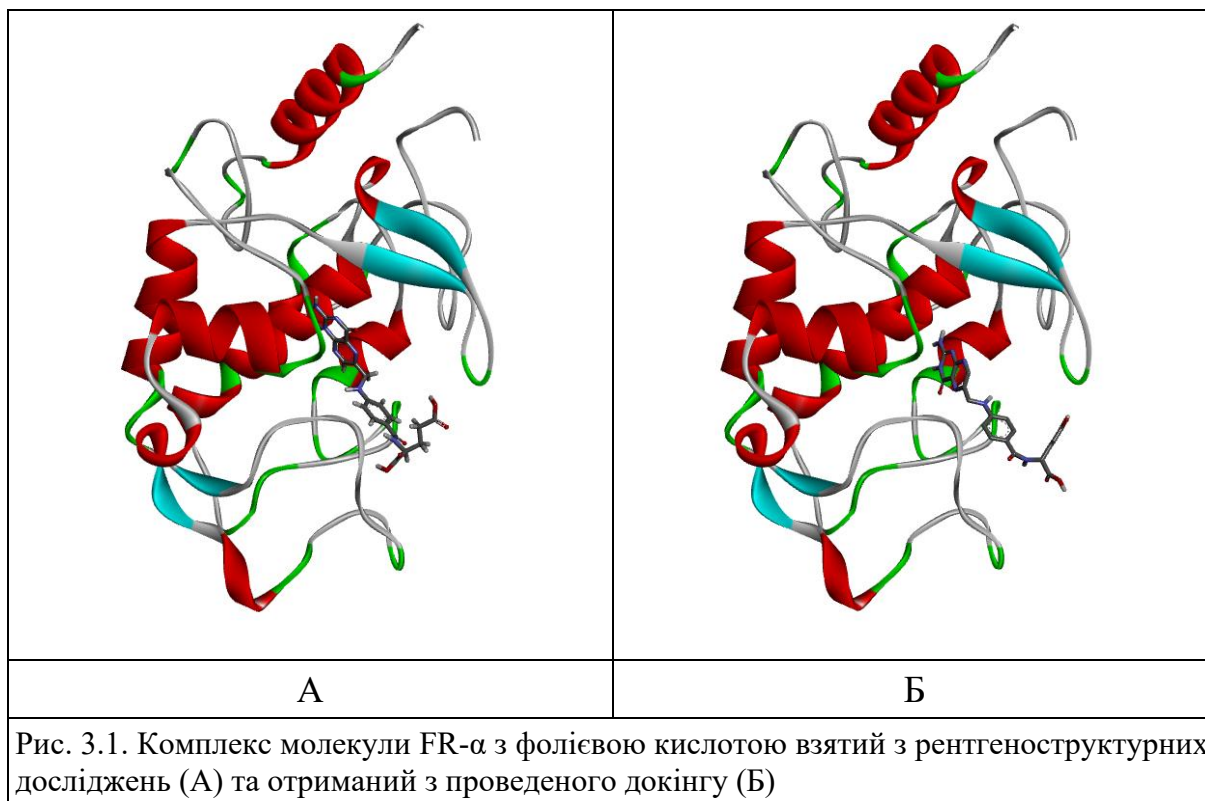
Таргетною групою є залишок фолієвої кислоти, модифікований для приєднання до РФП за γ -карбоксильною групою глутамінового залишку. При цьому у ньому повністю збережена структура птеридинового кільця та *p*-амінобензойної кислоти, які забезпечують зв'язування молекули з рецептором. Усі 8 досліджуваних сполук містять однакову за будовою таргетну групу для максимально точного дослідження результатів зв'язування.

У ролі діагностичної мітки у всіх сполуках обрано Фтор-18. Представлений на умовно правій стороні молекул, він знаходиться на кінці функціональних груп, які є єдиними відмінними елементами між досліджуваними РФП. Це зокрема групи відповідальні за альбумін-зв'язуючу функцію, де у половині зразків використано йод-фенільні фрагменти, а у іншій половин – ацетильна група, а також вуглеводні залишки, відповідальні за підвищення гідрофільності молекули (присутні лише у 4 варіантах сполук).

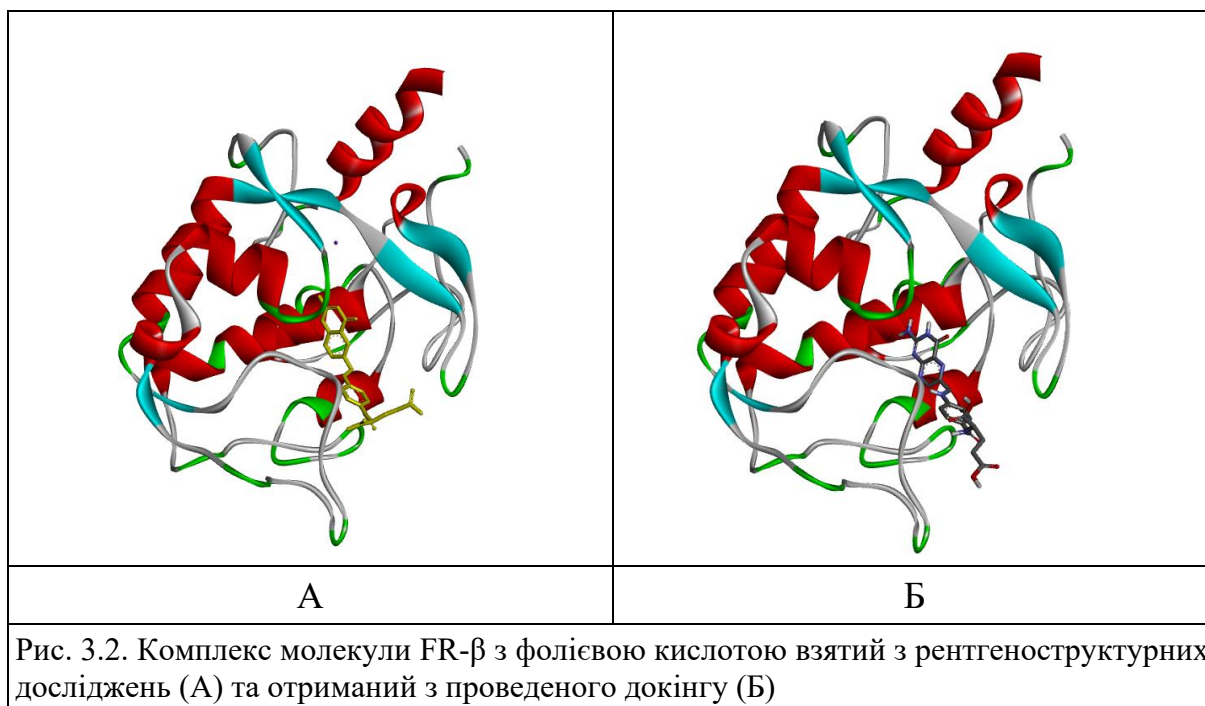
Терапевтичним елементом у досліджуваних РФП виступає Лютецій-177. Його зафіксовано у хелатуючих центрах, які є похідними DOTA з додатковими піридиновими фрагментами. Ці центри, разом із проміжними лінкерами, що з'єднують їх з рештою молекули, також є однаковими для всіх 8 сполук у дослідженні.

Варто зазначити, що під час досліджень на спорідненість із фолатними рецепторами, використовувались саме діагностичні варіанти радіофармпрепаратів, тобто такі, в яких присутній радіоактивний ізотоп ^{18}F , а терапевтичний агент замінено на стабільний ^{175}Lu .

Після пошуку стабільних конформерів та їх геометричної оптимізації, ми перейшли до докінгу фолатної кислоти із FR- α та FR- β . Метою цього кроку була валідація обраного методу та параметрів докінгу за допомогою локалізації сайтів зв'язування та їх порівняння з даними кристалографічних досліджень.



Для обох випадків можна побачити, що птероатна частина, яка відповідає за зв'язування цих рецепторів з фолієвою кислотою, спозиціонована у кишенях рецепторів практично ідентично, що є найбільш важливим у контексті цього дослідження. Основні відмінності спостерігаються в конфігурації глутамінового залишку, де у комплексах, отриманих у нашому докінгу, він більш випрямлений назовні. Це можна пояснити гнучкістю цієї частини молекул рецепторів.



Далі на основі проведеного докінгу було визначено координати сайтів зв'язування. Отримані для групи фолат з FR- α та фолат з FR- β , їх було порівняно з даними рентгеноструктурних досліджень [24, 25].

Таблиця 1. Порівняння координат сайтів зв'язування фолату з FR- α між даними наведених у рентгеноструктурних дослідженнях та отриманими після проведення молекулярного докінгу

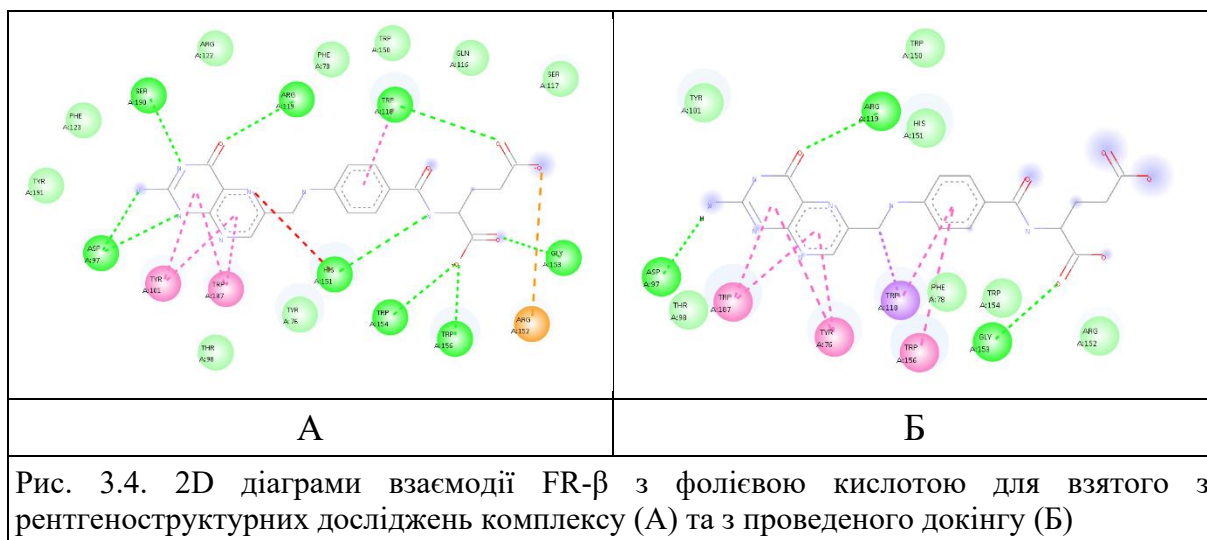
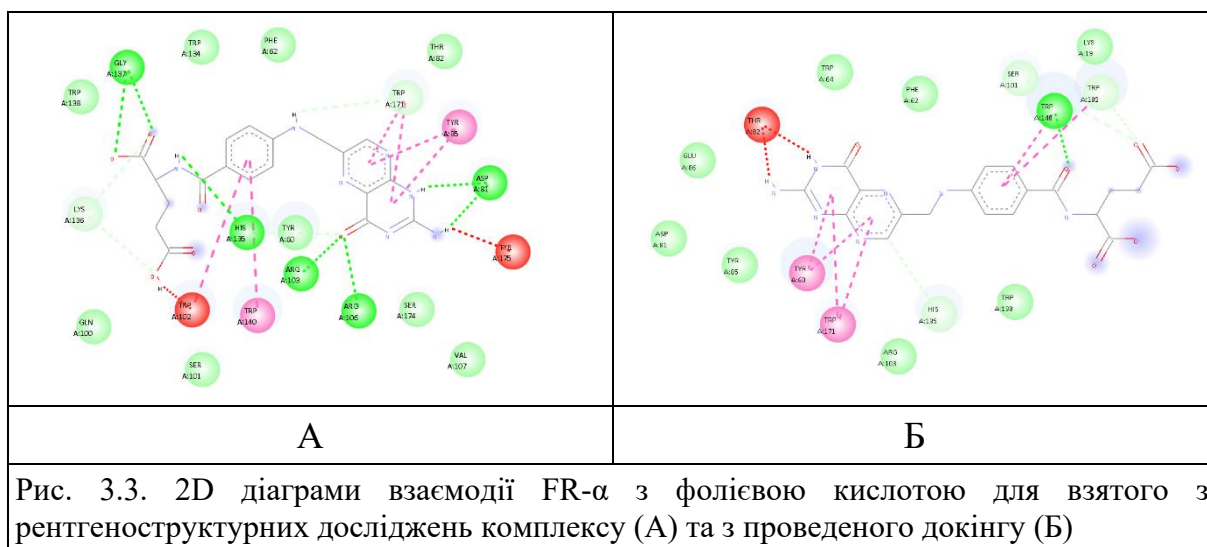
	Дані з дослідження	Дані з докінгу
X, Å	10,214359	11,474869
Y, Å	21,837290	20,862734
Z, Å	-6,082167	-7,342680

Таблиця 2. Порівняння координат сайтів зв'язування фолату з FR- β між даними наведених у рентгеноструктурних дослідженнях та отриманими після проведення молекулярного докінгу

	Дані з дослідження	Дані з докінгу
X, Å	25,768284	26,396614
Y, Å	46,910416	46,887581
Z, Å	40,462784	41,091118

Як для комплексу з FR- α , так і з FR- β різниця між координатами складає не більше 2 Å. Ця різниця є незначною та пояснюється фіксацією рухливості амінокислотних залишків активного центру білків під час розрахунку за використання жорсткого докінгу.

Останнім етапом порівняння був аналіз 2D-діаграм взаємодії активних центрів рецепторів з фолієвою кислотою (рис. 3.3 та 3.4).



У випадку дослідження комплексу з FR- α , було встановлено, що ключові залишки, що формують кишеньку рецептора, здебільшого збігаються. Вони включають ASP A:81, THR A:82, PHE A:62, TYR A:60 (TYR A:85), TRP A:171, ARG A:103, HIS A:135, TRP A:140, TRP A:138, SER A:101, TRP A:102, LYS A:19 (LYS A:136). Відмінними є залишки пов'язані із

глутамінового залишку, а саме в нативній структурі він стабілізується водневими зв'язками з GLY A:137 та TRP A:138, коли у розрахунковій моделі – з TRP A:102 та доповнюється Ван-дер-Ваальсовими зв'язками з LYS A:19, SER A:101 та GLU A:86.

Аналогічні результати встановлені і для груп з FR- β . Фолієва кислота зв'язується у кишені рецептора з ідентичним набором залишків для обох систем: ASP A:81, THR A:82, PHE A:62, TYR A:60, TRP A:171, ARG A:103, HIS A:135, TRP A:140, TRP A:138, SER A:101, TRP A:102, LYS A:19. При цьому спостерігається відмінність між залишками зв'язуючими глутамінову частину ліганду – у нативній структурі це GLY A:137 та TRP A:138, а у розрахунковій моделі TRP A:102, LYS A:19, SER A:101 та GLU A:86.

Підсумовуючи результати, отримані під час візуального порівняння, зіставлення координат та аналізу основних амінокислотних залишків, що беруть участь у зв'язуванні ліганда з рецептором, можна прийти висновку, що молекулярний докінг було проведено успішно, і його параметри можна використовувати для подальшого моделювання взаємодії радіофармпрепаратів із рецепторами. Усі порівняння підтвердили, що незважаючи на невеликі відхилення у позиціонуванні глутамінового залишку фолієвої кислоти, ключові для специфічного розпізнавання елементи фолату – птеридинове кільце та р-амінобензойна кислота – зберігають просторову відповідність між комплексом з кристалографічних досліджень та розрахованою моделлю.

Розділ 3.2 Молекулярний докінг та аналіз спорідненості досліджуваних сполук із білковими мішенями

Наступним етапом дослідження було проведення комп'ютерного моделювання зв'язування описаних радіофармпрепаратів із фолатними рецепторами. Покладаючись на результати валідації алгоритму програми,

отримані у попередньому підрозділі, ми спочатку виконали молекулярний докінг 8 досліджуваних сполук із FR- α і потім із FR- β .

Результати зв'язування РФП із фолатним рецептором альфа зображені на Рис. 3.5 та Рис. 3.6. Енергії спорідненості зв'язування для цих систем наведені у Таблиці 3.

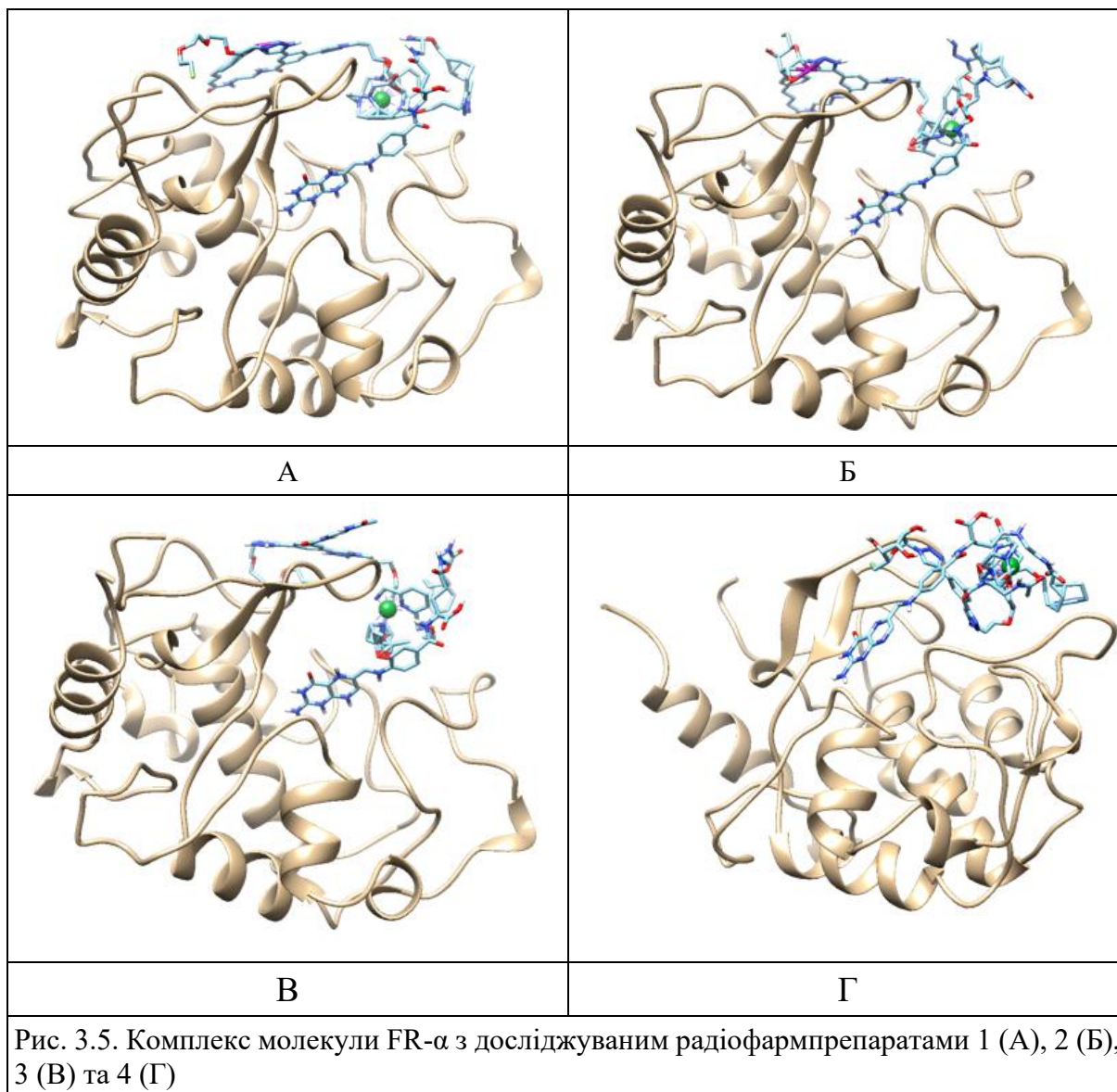
Таблиця 3. Значення енергії спорідненості зв'язування отримані у результаті докінгу 8 досліджуваних РФП із FR- α

Сполука	Спорідненість зв'язування, ккал/моль
1	-10.6
2	-11.0
3	-10.3
4	-9.1
5	-9.8
6	-9.9
7	-9.9
8	-9.8

З таблиці очевидно, що для всіх сполук енергії зв'язування залишаються на високому рівні, проте у контексті нашого дослідження найважливішою характеристикою вдалого зв'язування слугує саме локалізація його сайту.

Як можна побачити на рисунках, для перших чотирьох сполук зв'язування відбулося саме у фізіологічно коректній акцепторній кишені білка. Птероатні групи фолієвих залишків кожного з досліджуваних варіантів РФП занурені у центральні щілини рецептора, а інші структурні групи залишаються назовні. Таким чином, можна стверджувати, що таке

зв'язування призведе до транспорту цих препаратів всередину клітин носія рецептора.

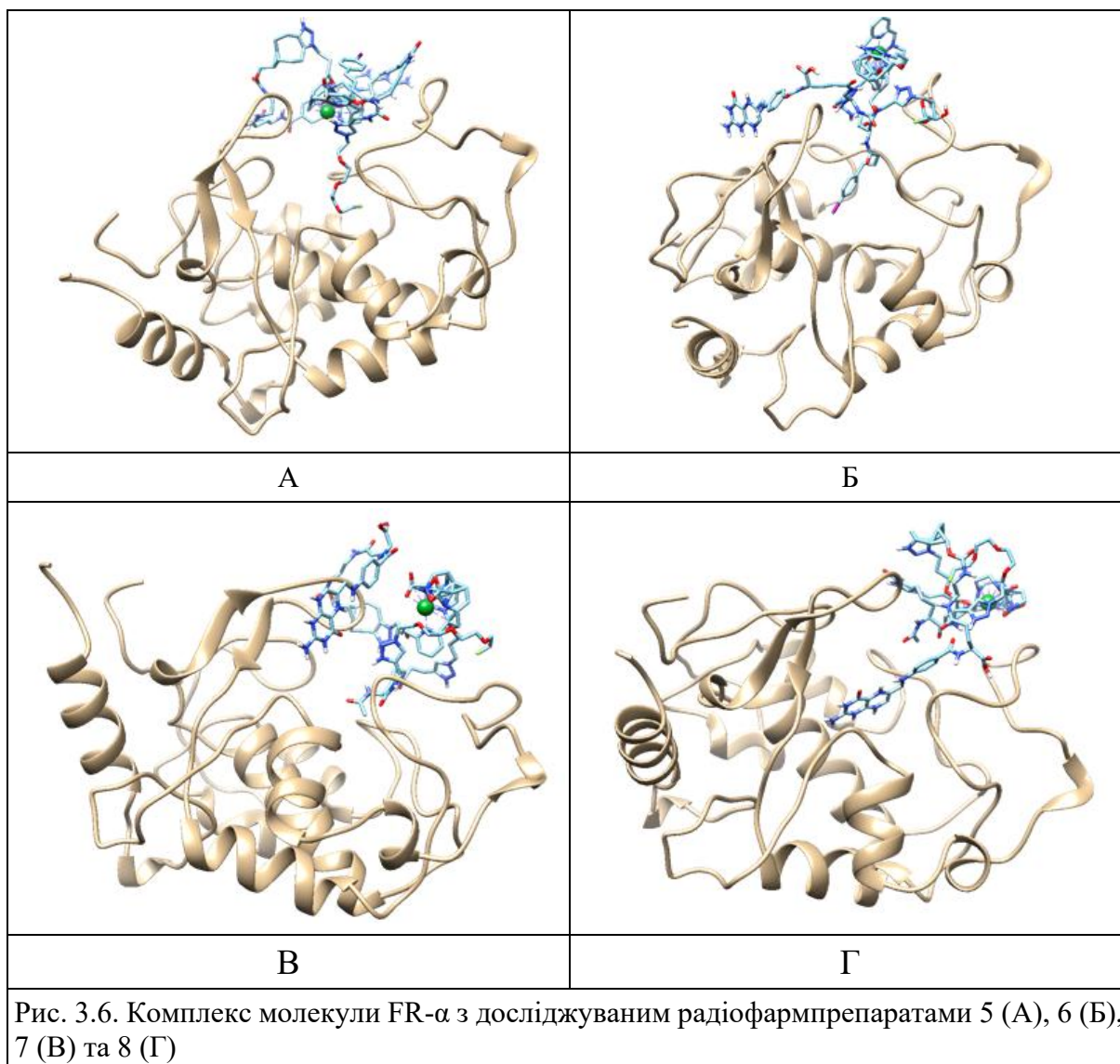


Оскільки єдиною відмінністю між усіма досліджуваними РФП були функціональні групи, вони і слугують причиною різниці у способах зв'язування лігандів із рецепторами.

Найнижчу енергію зв'язування серед усіх демонструє друга сполука. Причиною цьому можуть бути наявні у її структурі гідрофобний р-йодофенільний ланцюг та фрагмент глюкози, які разом додають стабілізаційних зв'язків комплексу.

При цьому інші сполуки, у яких альбумін-зв'язуючим фрагментом слугує ацетильна група, замість йодофенільної, та/або відсутній залишок глюкози

демонструють зменшення афінності порівняно із другою сполукою. Хоча, незважаючи на різницю у значеннях, всі чотири сполуки залишаються високоафінними до фолатного рецептора альфа незалежно від функціональних модифікацій.



Під час аналізу результатів докінгу наступних чотирьох досліджуваних РФП виявилось, що сполуки 5, 6 та 7 зв'язалися із рецептором альфа у неспецифічній конформації, хоча кон'югат номер 8 утворив коректний комплекс. У кожному з неспецифічних варіантів докінгу виявилось, що птероатна частина молекули не занурюється у акцепторну кишеню рецептора, а у випадку 6 сполуки можна спостерігати, що ця група повністю розвернута назовні в оточуючий розчинник. Високий показник енергії

афінності зв'язування у цих випадках, імовірно, забезпечувався приєднанням РФП до альбумін-зв'язуючих груп або інших амінокислотних залишків на поверхні рецептора навколо них.

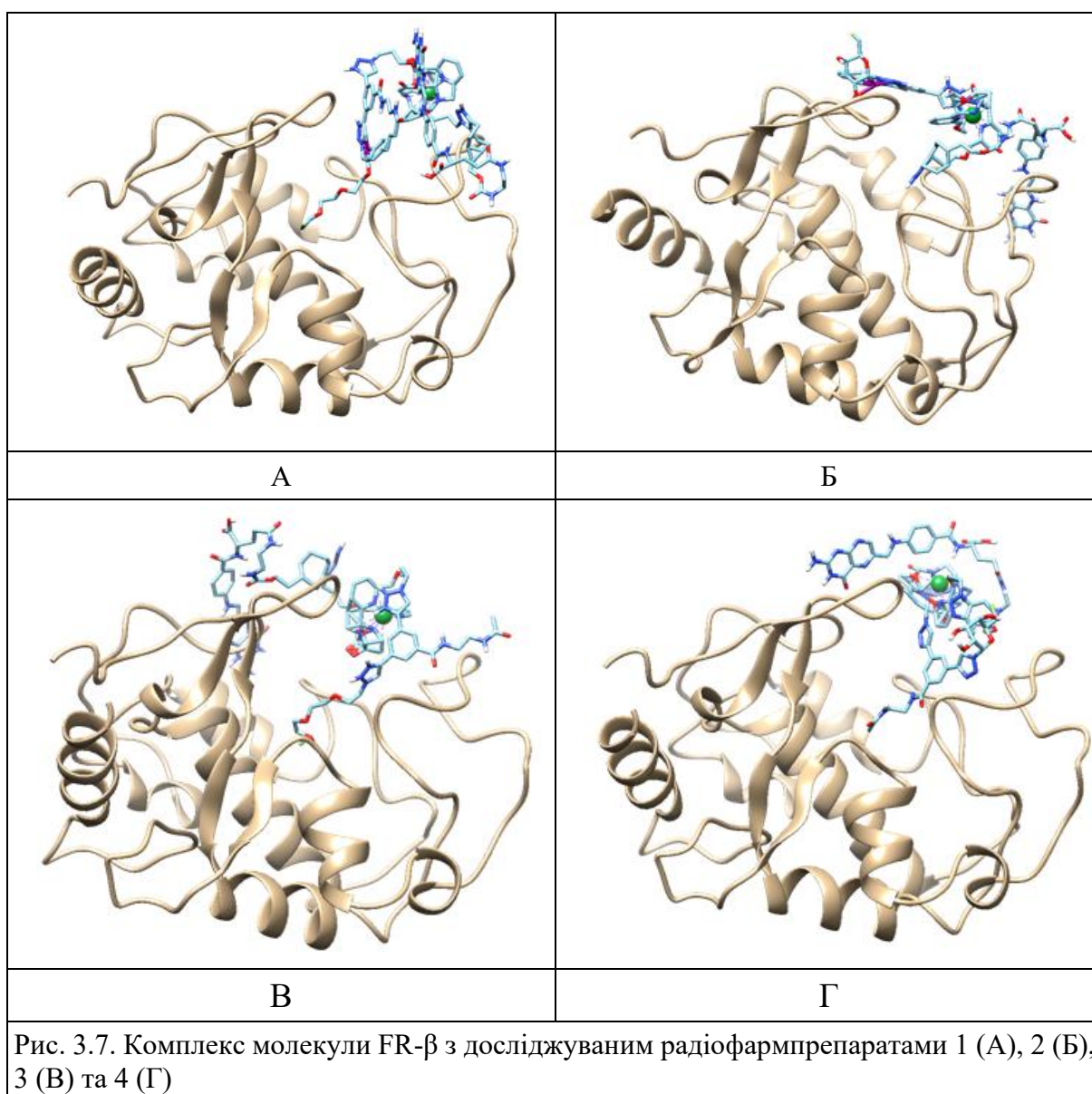
Як і у попередніх випадках, причиною відмінностей є додаткові функціональні групи. Масивніші альбумін-зв'язуючі структури у цих сполуках створюють стеричні перешкоди під час входу ліганда до сайту зв'язування, блокуючи досягнення ним фізіологічно релевантної геометрії зв'язування. Таким чином, виявлена невідповідність зумовлена лише стеричними обмеженнями, а не зниженням афінності фолатного фрагмента до рецептора.

Після цього ми перейшли до перевірки результатів докінгу аналізованих сполук РФП із фолатним рецептором бета. Дані про енергію спорідненості зв'язування наведені у Таблиці 4, а просторові конформації комплексів зображені на Рис. 3.7 та 3.8.

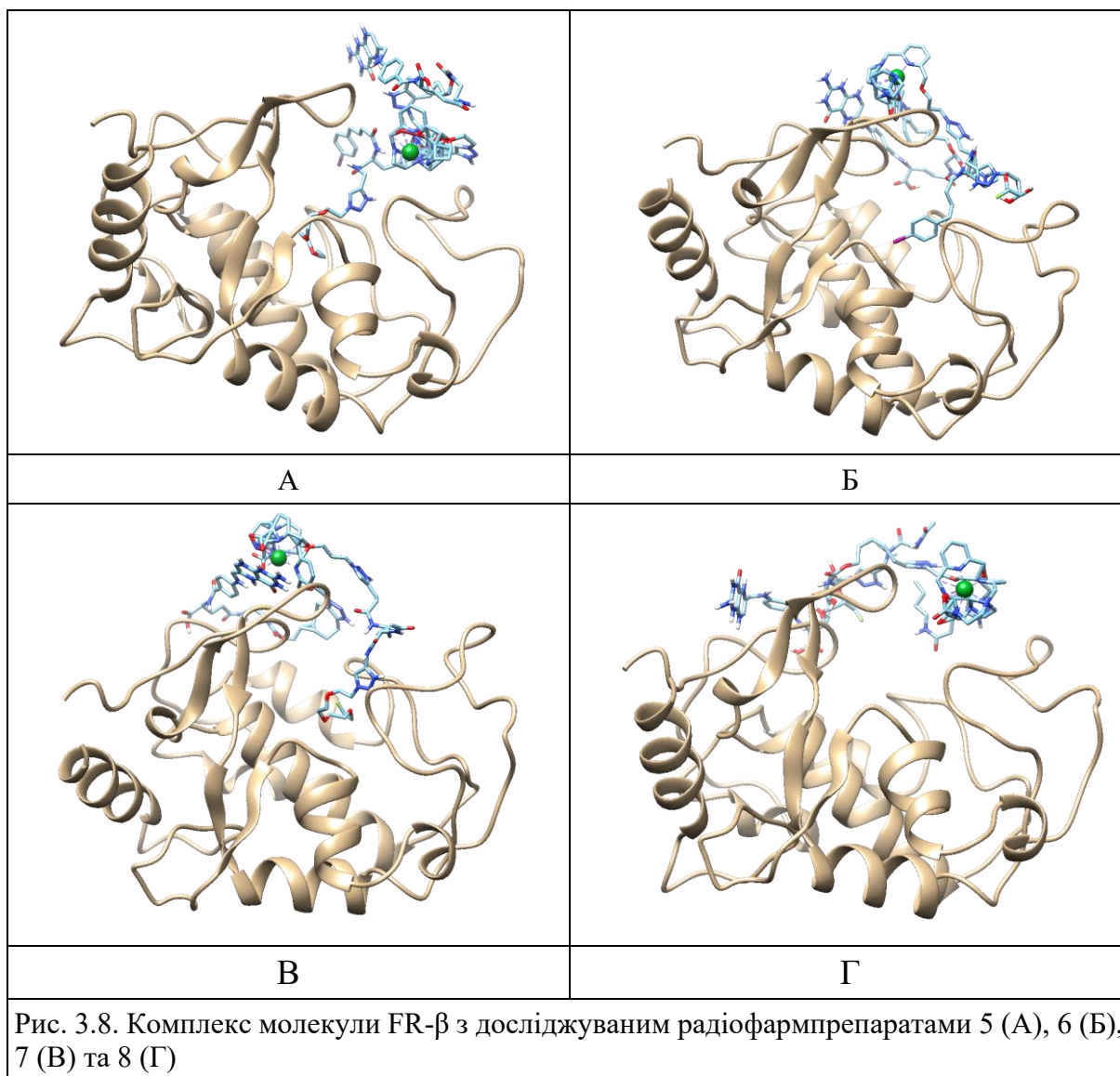
Таблиця 4. Значення енергії спорідненості зв'язування отримані у результаті докінгу 8 досліджуваних РФП із FR- β

Сполука	Спорідненість зв'язування, ккал/моль
1	-9.2
2	-8.9
3	-8.7
4	-9.2
5	-9.4
6	-9.2
7	-9.4
8	-8.4

Хоча результати наведені у таблиці значень для FR- β показують невелику відмінність з такими для FR- α , аналізуючи просторові конформації утворених комплексів, можна відстежити, що жодна із досліджуваних сполук радіофармпрепаратів не зв'язалася із рецептором у фізіологічно коректній позиції. Основні у контексті зв'язування з фолатними рецепторами птероатні групи розвернуті назовні від акцепторного сайту білка, а у комплексах із 1 та 3-7 спостерігається занурення у нього функціональних альбумін-зв'язуючих груп, що знаходяться на протилежних кінцях описаних лігандів.

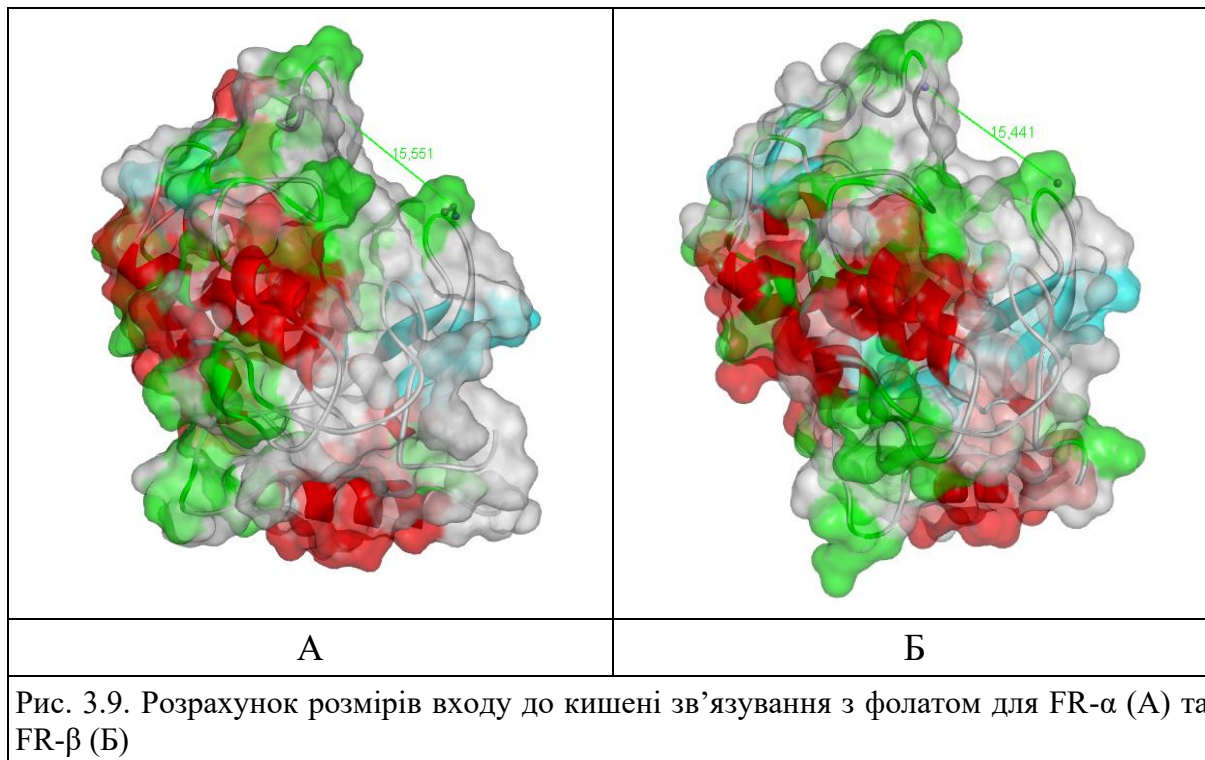


Зважаючи на результати, отримані у підрозділі 3.1, які довели високу специфічність зв'язування фолатної кислоти із фолатним рецептором бета, сильна відмінність у характері зв'язування РФП із білками-мішенями спонукає до ширшого дослідження відмінностей між FR- α та FR- β . Вище у роботі було описано, що фолатні рецептори мають високий ступінь гомологічності їх будови (близько 70%), проте структура та властивості ділянок, які обмежують вхід до зв'язувальної кишені, у них відрізняється.

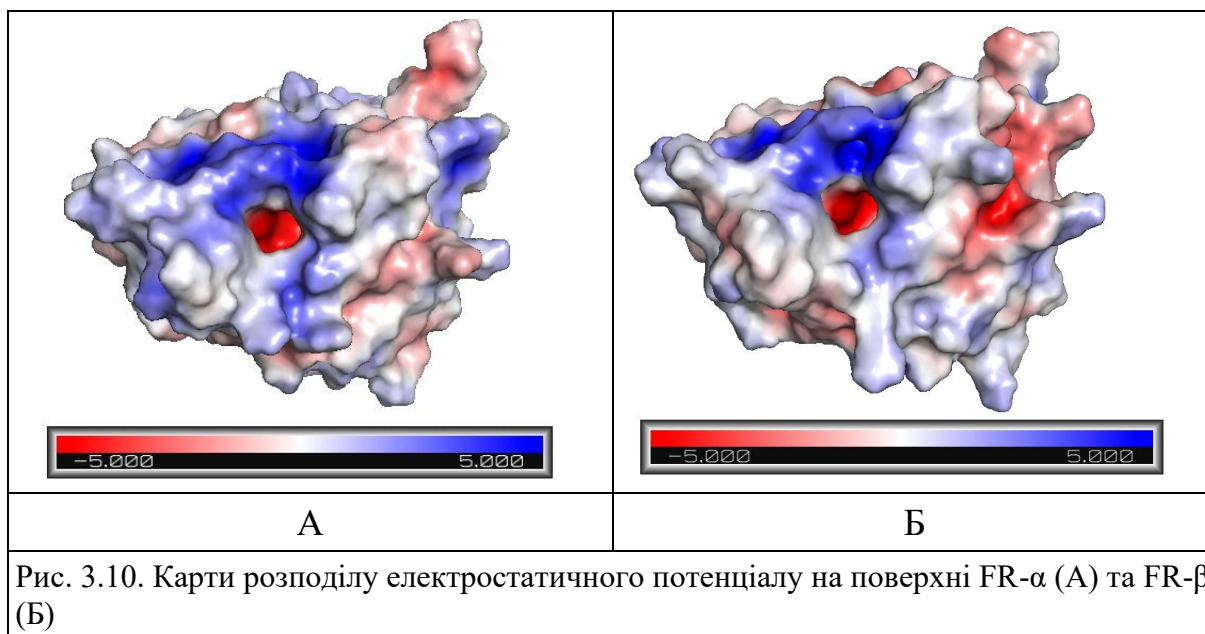


Спершу було виміряно геометричні розміри входу до кишені зв'язування для обох білків. Після проведення відстані між відповідними точками на амінокислотних залишках виявлено, що ці параметри є практично ідентичними для рецептора альфа та бета та дорівнюють $\sim 15,5$ Å (рис. 3.9).

Таким чином, оскільки у нашому випадку отримані комплекси зв'язування рецепторів з лігандами мали сильно відмінний характер, геометричні параметри цих білків не мають або мають незначний вплив на отримані результати.



Далі ми дослідили електростатичні потенціали поверхні рецепторів (рис. 3.10). На зображеннях видно, що зовнішні частини акцепторних кишень для специфічного зв'язування фолату у рецепторах відрізняються між FR-α та FR-β. Для першого позитивно заряджені (сині) ділянки навколо входу до кишені є більш вираженими та оточують його повністю, у той час як для рецептора бета позитивно заряджені ділянки є менш локалізованими та спостерігаються лише в умовно верхній частині. Відповідно, позитивно-заряджене оточення кишені FR-α є більш сприятливим для зв'язування із полярним фолатним фрагментом за умови підходящої геометрії РФП (сполуки 1-4 та 8). Тоді як для FR-β вхід у кишеньку фізіологічно-релевантного зв'язування із фолатом є менш позитивно-зарядженим, що може робити поверхневі взаємодії більш енергетично вигідними для лігандів.



Згідно з отриманими результатами порівняння параметрів акцепторних кишень для обох білків, можна зробити висновок, що виражена селективність досліджуваних кон'югатів до FR-α зумовлена не геометричними відмінностями їхньої будови, а різницею у розподілі електростатичних потенціалів.

Таким чином, на основі проведеного аналізу, можна прийти висновку, що основними факторами його результативності, а саме зв'язування у лігандів у фізіологічно коректній позиції акцепторної кишені білків, є стерична відповідність сполук із рецепторами на вході до кишені зв'язування та розподіл зарядів на поверхні білків.

Підсумовуючи загальні результати проведеного молекулярного докінгу між досліджуваними радіофармпрепаратами та фолатними рецепторами, до використання у тераностичних цілях рекомендуються сполуки 1-4 і 8 для таргетування FR-α. На відміну від інших досліджуваних кон'югатів, ці комплекси утворилися у фізіологічно-релевантній позиції, що призведе до транспорту препаратів всередину пухлинних клітин і, відповідно, до діагностичного або терапевтичного ефекту, метою яких і є їхнє використання.

Визначену відсутність специфічної афінності комплексів РФП до FR- β можна назвати сприятливою у контексті даного дослідження, адже як було зазначено вище, цей рецептор експресується в організмі людини у не-епітеліальних тканинах, коли FR- α знайдено в епітеліальних видах раку. Відповідно, спорідненість досліджуваних сполук лише з однією ізоформою рецепторів робить їх більш специфічними та точними для використання у діагностиці та терапії.

ВИСНОВКИ

У даній роботі було досліджено взаємодію восьми радіофармпрепаратів класу Molecular Twins із біологічними таргетними мішенями FR- α та FR- β . З використанням методу молекулярного докінгу, визначено та проаналізовано параметри зв'язування комплексів рецепторів із лігандами. Отримані результати дозволили виявити системи, комплексоутворення яких відбулося у фізіологічно коректних позиціях, сприятливих для тераностичної дії досліджуваних сполук.

1. З метою валідації точності обраного алгоритму скринінгу, проведено молекулярний докінг між досліджуваними фолатними рецепторами і фолієвою кислотою. Порівняльний аналіз результатів моделювання із експериментальними кристалографічними даними, який складався зі співставлення просторових конформацій лігандів у сайтах

зв'язування білків та перевірки відповідності їхніх координат, дозволив підтвердити високу точність обраної системи розрахунку для використання у подальшому моделюванні.

2. Використовуючи перевірений алгоритм, проведено молекулярний докінг восьми РФП з FR- α . На основі аналізу енергії афінності зв'язування та просторової орієнтації утворених комплексів, визначено, що для сполук 1-4 і 8 зв'язування відбулося у фізіологічно-релевантних конформаціях всередині фізіологічно значущої кишені білка, тоді як сполуки 5-7 не утворили специфічних комплексів. Причинами для цього слугували відмінності між функціональними альбумін-зв'язуючим групами препаратів, які могли створювали стеричні перешкоди під час входу лігандів до сайту зв'язування.
3. Результати молекулярного докінгу РФП з FR- β показали, що жодна із досліджуваних сполук не утворила фізіологічно коректного комплексу із цією ізоформою рецептора, адже птероатні групи фолієвих залишків всіх препаратів були розгорнуті назовні від кишені зв'язування. Високі значення енергій афінності у цих випадках спричинені взаємодіями альбумін-зв'язуючих груп із поверхнею рецептора.
4. Показано, що отримана різниця між спорідненістю обраних препаратів до рецепторів, зумовлена відмінністю у розподілі електростатичних потенціалів на поверхнях цих білків. Встановлено, що інтерфейс кишені зв'язування FR- β характеризується нижчим позитивним потенціалом порівняно з FR- α , що знижує афінність полярного залишку фолату до акцепторної кишені рецептора бета та робить поверхневу локалізацію лігандів там енергетично вигіднішою. Відмінності у геометричних розмірах сайтів зв'язування між рецепторами не виявлено.
5. Перспективними для проведення подальших досліджень утворення комплексів із FR- α визначено сполуки 1, 2, 3, 4 і 8. Для оцінки

стабільності їхніх систем за наближених до фізіологічних умов, рекомендовано проведення їхнього молекулярно-динамічного моделювання. Додатково рекомендовано провести скринінг взаємодії обраних радіофармпрепаратів із молекулою альбуміну сироватки людини для характеристики їхнього біорозподілу та часу циркуляції в організмі людини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. International Agency for Reaserch on Cancer. Estimated number of deaths from 2022 to 2050, Males and Females, age [0-85+]. *Cancer Tomorrow*. 08.02.2024. URL: https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en/dataviz/trends?types=1&single_unit=500000&populations=900&group_populations=0&multiple_populations=1&years=2025_2050&sexes=1_2&cancers=39 (дата звернення: 28.05.2026).
2. Рак в Україні, 2022–2023. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби : Бюлетень Національного канцер-реєстру України № 25 / голов. ред. М. М. Федоренко ; Національний інститут раку. Київ, 2024. URL: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm (дата звернення: 28.05.2026)
3. Hammoum T. A comprehensive review of passive and active nanoparticle targeting technics : інтернет-ресурс / Inside Therapeutics. URL:

- <https://insidetx.com/resources/reviews/a-comprehensive-review-of-passive-and-active-nanoparticle-targeting-technics/> (дата звернення: 28.05.2026)
4. Wilhelm S., Tavares A. J., Dai Q. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*. 2016. Vol. 1, no. 4. Art. no. 16014. URL: <https://www.nature.com/articles/natrevmats201614> (дата звернення: 28.05.2026)
 5. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications / P. Galvin, D. Thompson, K. B. Ryan et al. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012. Vol. 69, no. 3. P. 389–404. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0856-6>
 6. Funkhouser J. Reinventing pharma: the theranostic revolution. *Current Drug Discovery*. 2002. Vol. 2. P. 17–19. URL: https://www.researchgate.net/publication/288269110_Reinventing_pharma_The_theranostic_revolution (дата звернення: 28.05.2026)
 7. Nuclear Medicine Imaging : інтернет-ресурс / Radiology Key. 2016. URL: <https://radiologykey.com/nuclear-medicine-imaging-2/> (дата звернення: 28.05.2026)
 8. Moses W. W. Overview of nuclear medical imaging instrumentation and its applications / Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California. *SciSpace* : інтернет-ресурс. URL: <https://scispace.com/pdf/overview-of-nuclear-medical-imaging-instrumentation-and-1vncaq3his.pdf> (дата звернення: 28.05.2026)
 9. Kelloff G. J., Hoffman J. M., Johnson B. et al. Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005. Vol. 11, no. 8. P. 2785–2808. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2256>
 10. Radioisotopes in Medicine : інтернет-ресурс / World Nuclear Association. URL: <https://world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radioisotopes-research/radioisotopes-in-medicine> (дата звернення: 28.05.2026)

11. Volkert W. A., Hoffman T. J. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. 1999. Vol. 99, no. 9. P. 2269–2292. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr9804386>
12. Kassis A. I., Adelstein S. J. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2005. Vol. 46, no. 1 (Suppl.). P. 4S–12S. URL: https://jnm.snmjournals.org/content/46/1_suppl/4S (дата звернення: 28.05.2026)
13. Alpha-Emitting Radionuclides: Current Status and Future Perspectives / M. Miederer, M. Benešová-Schäfer, C. Mamat et al. *Pharmaceuticals*. 2024. Vol. 17, no. 1. Art. no. 76. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph17010076>
14. Pallares R. M., Abergel R. J. Development of radiopharmaceuticals for targeted alpha therapy: Where do we stand? *Frontiers in Medicine*. 2022. Vol. 9. Art. no. 1020188. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1020188>
15. Elliyaniti A. Radiopharmaceuticals in Modern Cancer Therapy. *Radiopharmaceuticals - Current Research for Better Diagnosis and Therapy* : за матеріалами монографії / IntechOpen, 2022. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99334>
16. Kramer-Marek G., Capala J. The role of nuclear medicine in modern therapy of cancer. *Tumour Biology*. 2012. Vol. 33, no. 3. P. 629–640. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0373-8>
17. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges / G. Sgouros, L. Bodei, M. R. McDevitt, J. R. Nedrow. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020. Vol. 19, no. 9. P. 589–608. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
18. Sorkin A., Puthenveedu M. A. Clathrin-Mediated Endocytosis. *Vesicle Trafficking in Cancer* : за матеріалами монографії / ed.: Y. Yarden, G. Tarcic. New York : Springer, 2013. P. 1–30. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6528-7_1
19. Boss S. D., Ametamey S. M. Development of Folate Receptor-Targeted PET Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging—A Bench-to-Bedside Journey.

- Cancers*. 2020. Vol. 12, no. 6. Art. no. 1508. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12061508>
20. δ -FR siRNA (m): sc-39974 : datasheet / Santa Cruz Biotechnology, Inc. URL: <https://datasheets.scbt.com/sc-39974.pdf> (дата звернення: 28.05.2026)
21. Folate Receptor Alpha—A Novel Approach to Cancer Therapy / T. Gonzalez, M. Muminovic, O. Nano, M. Vulfovich. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25, no. 2. Art. no. 1046. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25021046>
22. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers / M. Fernández, F. Javaid, V. Chudasama. *Chemical Science*. 2017. Vol. 9, no. 4. P. 790–810. DOI: <https://doi.org/10.1039/c7sc04004k>
23. Targeting of folate receptor β on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor–expressing T cells / R. C. Lynn, M. Poussin, A. Kalota et al. *Blood*. 2015. Vol. 125, issue 22. P. 3466–3476. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-612721>
24. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors / C. Chen, J. Ke, X. Zhou et al. *Nature*. 2013. Vol. 500, no. 7463. P. 486–489. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12327>
25. Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition / A. S. Wibowo, M. Singh, K. M. Reeder et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110, no. 38. P. 15180–15185. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1308827110>
26. Chegeni N., Kadivar F., Saraei P. Folic Acid, Folate Conjugates and Folate Receptors: Novel Applications in Imaging of Cancer and Inflammation-Related Conditions. *Cancer Management and Research*. 2025. Vol. 17. P. 1–15.
27. Folate-based radiotracers for nuclear imaging and radionuclide therapy / L. Wagner, B. Kenzhebayeva, B. Dhaini et al. *Coordination Chemistry Reviews*. 2022. Vol. 470. Art. no. 214702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214702>

28. Radiometals for Combined Imaging and Therapy / C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay et al. *Chemical Reviews*. 2013. Vol. 113, no. 2. P. 858–883. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr3003104>
29. The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker / H. A. Holik, F. M. Ibrahim, A. A. Elaine et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 10. Art. no. 3062. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27103062>
30. Unexpected Sensitivity of sst2 Antagonists to N-Terminal Radiometal Modifications / M. Fani, F. Braun, B. Waser et al. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2012. Vol. 53, no. 9. P. 1481–1489. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.102764>
31. Biodistribution, Pharmacokinetics, and Dosimetry of ^{177}Lu -, ^{90}Y -, and ^{111}In -Labeled Somatostatin Receptor Antagonist OPS201 in Comparison to the Agonist ^{177}Lu -DOTATATE: The Mass Effect / G. P. Nicolas, R. Mansi, L. McDougall et al. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2017. Vol. 58, no. 9. P. 1435–1441. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.191684>
32. Cross-Isotopic Bioorthogonal Tools as Molecular Twins for Radiotheranostic Applications / V. Rosecker, C. Denk, M. Maurer et al. *ChemBioChem*. 2019. Vol. 20, no. 12. P. 1530–1535. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.201900042>
33. Conformer Plugin : documentation / ChemAxon. URL: https://docs.chemaxon.com/latest/calculators_conformer-plugin.html (дата звернення: 28.05.2026).
34. Che X., Liu Q., Zhang L. An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina. *Results in Engineering*. 2023. Vol. 19. Art. no. 101335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101335>
35. Pawar S. S., Rohane S. H. Review on Discovery Studio: An important Tool for Molecular Docking. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2021. Vol. 14, no. 1. P. 86–88. DOI: <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2021.00014.6>
36. Sharma A., Yennamalli R. M. Chapter 16 - Docking strategies. *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* : за матеріалами

монографії / ed.: A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, T. C. Bhalla. Academic Press, 2023. P. 243–258. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00016-7>

37. PyMOL Molecular Graphics System : інтернет-ресурс / Schrödinger, LLC.
URL: <https://www.pymol.org/#page-top> (дата звернення: 28.05.2026)