

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ/MEDICINĂ DENTARĂ/FARMACIE

Novel Techniques in Targeted Therapy of Cancer

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctoral Supervisor:

Prof. Pharm. Drăgănescu Doina

Doctoral Student:

Pharm. Niculae Dragoș Andrei

Sumar

Introduction

I.	Published Scientific Literature.....	4
II.	Abbreviation List.....	6
III.	Introduction.....	9
IV.	General.....	10
	1. Introduction.....	10
	2. Homologous Recombination.....	19
	3. Non-Homologous End Joining.....	21
	3.1 mTOR Integration.....	23
	3.2 PI3K Integration.....	25
	3.3 DNA-PK Pathway.....	26
	4. Radiosensitization.....	27
	4.1 Pharmacological Radiosensitization.....	28
	5. Safety and Selectivity.....	32
	6. Tracer Protein Scaffolds.....	32
V.	Original.....	41
	1. Hypothesis and general objectives.....	41
	2. General methods.....	41
	2.1 ^{99m} Tc Radiolabeling.....	41
	2.2 Specificity Study.....	42
	2.3 Cellular Processing.....	42
	2.4 Binding Affinity Study.....	42
	2.5 ⁸⁹ Zr Radiolabeling.....	43
	2.6 Stability of ⁸⁹ Zr(IV) Complex.....	47
	2.7 <i>In-vitro</i> Uptake and Retention of p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody Conjugate.....	47
	2.8 γ -H2AX (H2AX Ser139) DNA Damage Immunofluorescence Assay.....	47
	2.9 MTS Cell Viability Assay.....	48
	2.10 MTT Cell Viability Assay.....	49
	2.11 AlphaFold2 Prediction Protocol.....	52
	2.12 Molecular Docking Protocol.....	53
	2.13 Molecular Dynamics Protocol.....	56
	3. DARPIn-drug Conjugates Targeting EpCAM for Ovarian Cancer Treatment.....	57
	3.1 Introduction.....	57
	3.2 Results.....	62

3.2.1	Radiolabeling.....	62
3.2.2	<i>In-Vitro</i> Binding Specificity.....	62
3.2.3	Cellular Processing.....	64
3.2.4	Affinity Measurement.....	65
3.3	Discussions and Conclusions.....	66
4.	⁸⁹ Zr-Radiolabelling of p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody.....	69
4.1	⁸⁹ Zr Solid Target Production and Post-Processing.....	69
4.2	p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody [⁸⁹ Zr]Zr-Oxalate Radiolabeling.....	69
4.3	Stability of [⁸⁹ Zr]Zr-Oxalate and [⁸⁹ Zr]Zr-p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody.....	72
4.4	Cell Uptake.....	74
4.5	Discussion and Conclusions.....	75
5.	<i>In-Silico</i> Evaluation of DNA-PK Inhibitors and the Possibility of Radiohalogenation.....	76
5.1	Introduction.....	76
5.2	AlphaFold2 Prediction.....	82
5.3	Molecular Docking.....	85
5.4	Molecular Dynamics.....	90
5.5	Discussion.....	94
6.	The Radiosensitizing Potential of CC-115, PIK-75 and M3814 DNA-PK Inhibitors for Breast Cancer Targeted Radiotherapy.....	96
6.1	Introduction.....	96
6.2	Results.....	98
6.3	Discussion.....	105
7.	[⁶⁷ Cu]CuCl ₂ Cytotoxic effect on a multi-panel of cancer cell lines.....	108
7.1	Results.....	108
7.2	Conclusion.....	113
VI.	Conclusions and Personal Contributions.....	113
VII.	References.....	109
VIII.	Annexes.....	136

Având în vedere ritmul accelerat al cercetării radiofarmaceutice, ultima perioadă a fost marcată de o dezvoltare exponențială. Pornind de la cercetarea fundamentală construită în ultimele trei decenii prin studii remarcabile și descoperiri esențiale, domeniul se orientează tot mai mult către utilizarea radiofarmaceuticelor deja validate și care prezintă un potențial înalt pentru un act clinic cât mai personalizat. Progresele tehnologice din medicina nucleară, precum implementarea conceptului de gemeni digitali, a modelelor de inteligență artificială pentru analiza imagistică, a metodelor *in-silico* pentru descoperirea de noi ținte și filtrare a vectorilor cât și a optimizării reacțiilor de radiomarcare și sinteză, continua să accelereze tranziția de la cercetarea fundamentală axată pe dezvoltarea și validarea noilor trasori către o abordare tot mai translatională.

Resursele sunt direcționate din ce în ce mai mult către strategii de optimizare a unor structuri deja existente, incluzând optimizarea proprietăților farmacocinetice, prelungirea timpului de circulație plasmatică, ajustarea biodistribuției, îmbunătățirea factorului de penetre a țesutului țintă, modularea comportamentului celular, cum ar fi internalizarea sau, dimpotrivă, absența acesteia, retenția intracelulară sau efluxul rapid, metode de țintire subcelulară și armonizarea combinațiilor vector–radionuclid. Un alt concept central în medicina nucleară modernă este teranostica, în care același design de trasor, marcat alternativ cu doi radionuclizi diferiți ai aceluiași element, sau foarte apropiați din punct de vedere chimic, poate fi utilizat inițial în scop imagistic, urmat ulterior de etapa terapeutică. Astfel, chiar dacă sunt utilizați doi izotopi distincți, aceștia aparțin aceluiași element, ceea ce le conferă un comportament chimic identic. În consecință, biodistribuția, logD-ul, interacțiunea cu ținta și căile de eliminare sunt, în principiu, similare. Această abordare este adesea explicată prin expresia „Ce vezi este ceea ce tratezi”.

De-a lungul hărții izotopilor, anumite perechi teranostice s-au remarcat în ultimii ani ca repere importante. Iodul dispune de un spectru larg de izotopi cu relevanță medicală, precum ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{130}I și ^{131}I ; cuprul prezintă și el mulți candidați utili, precum ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu și ^{67}Cu ; iar plumbul se remarcă prin perechea elegantă $^{203/212}\text{Pb}$. Aceștia li se adaugă și alte cupluri promițătoare, incluzând Sc, Tb, Re/Tc, Bi și Y.

Lucrarea de față abordează domeniul radiofarmaceutic într-o perspectivă integrativă, atingând unele dintre cele mai relevante direcții ale dezvoltării sale actuale. Sunt discutate strategii de optimizare a trasorilor pentru prelungirea circulației plasmatice prin atașarea unui domeniu de legare a albuminei, conjugarea proteină–medicament prin utilizarea cunoscutei toxine mertansină pe un scaffold proteic din familia DARPIN-lor, precum și strategii de marcarea cu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pentru proteina de tip DARPIN-ic EC1 împotriva receptorului EpCAM, și cu ^{89}Zr pentru un Affibody anti-HER2. În plus, sunt au fost efectuate studii *in-silico* de docking și dinamică moleculară, utilizarea unui instrument modern bazat pe inteligență artificială pentru predicția structurii proteice, precum și evaluarea inhibitorilor DNA-PK de reparare a ADN-ului pentru potențarea efectului citotoxic al ^{64}Cu Cl₂ în două modele de cancer mamar.

În contextul complex al biologiei celulare, integritatea genomului este esențială, fiind protejată de o rețea vastă de mecanisme de reparare a ADN-ului, care acționează ca sisteme de supraveghere împotriva instabilității genomice [1]. Această secțiune va descrie interacțiunile complexe dintre repararea prin unirea capetelor neomoloage (*Non-*

Homologous End Joining, NHEJ), recombinația omoloagă (*Homologous Recombination*, HR) și căile dependente de protein-kinaza dependentă de ADN (*DNA-dependent Protein Kinase*, DNA-PK), evidențiind rolurile acestora în menținerea integrității genetice. Totodată, va fi explorată interacțiunea acestor mecanisme cu calea de semnalizare *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), cu accent asupra mecanismelor lor de reglare.

Rupturile dublu-catenare ale ADN-ului (*DNA double-strand breaks*, DSB) reprezintă una dintre cele mai severe forme de leziuni ADN, constând în clivajul simultan al ambelor catene ale structurii elicoidale a ADN-ului. Aceste leziuni amenință în mod semnificativ integritatea genomică și, dacă rămân nereparate, pot conduce în timp la mutații, anomalii cromozomiale și chiar moarte celulară. DSB-urile sunt considerate caracteristici definitorii ale multor patologii, inclusiv ale cancerului, însă pot constitui, în același timp, oportunități pentru dezvoltarea unor modalități terapeutice [2].

DSB-urile sunt leziuni moleculare în care ambele schelete zahar-fosfat ale ADN-ului sunt întrerupte în regiuni apropiate, generând capete libere de ADN care compromit integritatea cromozomială [3]. Aceste leziuni pot fi induse atât de factori endogeni, cât și exogeni. Factorii endogeni includ speciile reactive de oxigen (*reactive oxygen species*, ROS) generate în timpul metabolismului celular, precum și stresul replicativ prelungit și eșecul furcilor de replicare atunci când acestea întâlnesc leziuni oxidative ale bazelor sau rupturi monocatenare nereparate. De asemenea, DSB-urile pot apărea în urma clivajului programat mediat de nucleaze, în cadrul unor rearanjamente fiziologice ale ADN-ului. Sursele exogene includ radiațiile ionizante, anumiți agenți chimioterapici — de exemplu inhibitorii de topoizomerază, care determină formarea unor complexe topoizomerază-ADN blocate — precum și mutageni de mediu utilizați în diferite domenii, precum agricultura sau industria chimică [4].

Radioterapia utilizează radiații ionizante deoarece depunerea energiei sub forma unor trasee particulare produce leziuni ADN grupate, incluzând, dar fără a se limita la, DSB-uri complexe. Dacă aceste leziuni rămân nereparate sau sunt reparate incorect, ele devin o cauză principală a morții clonogenice, prin fragmentare cromozomială sau catastrofă mitotică. Prin comparație, leziunile izolate ale bazelor și multe rupturi monocatenare ale ADN-ului (*single-strand breaks*, SSB) sunt, de regulă, reparate mai eficient [5,6]. Calitatea radiației, explicată mai precis prin tipul de particulă emisă, influențează tipul de leziune produsă prin intermediul transferului liniar de energie (*linear energy transfer*, LET). Radiațiile cu LET scăzut — fotoni, precum razele γ și X, și electroni de energie înaltă, precum particulele β^- — depun energia în mod mai dispersat, generând o densitate locală redusă a dozei și producând ionizări mai izolate. În schimb, radiațiile cu LET ridicat — particule α , neutroni prin particule încărcate secundare cu LET ridicat, precum și electroni de energie joasă, precum electronii Auger și electronii de conversie atunci când sunt emiși în apropierea sau în interiorul ADN-ului — concentrează energia pe scale micrometrice până la nanometrice, chiar femtometrice, în funcție de energia și tipul particulei. Aceasta se traduce printr-o densitate locală foarte mare de ionizare, crescând frecvența și complexitatea DSB-urilor grupate, care sunt mai lent și mai puțin probabil reparate.

Protonii prezintă, în general, un LET scăzut până la mediu, cu o creștere a LET către finalul parcursului, unde se formează vârful Bragg, determinând o depunere energetică crescută și, implicit, o creștere a ionizărilor spre capătul traiectoriei lor [7–9].

În continuare, considerăm necesară o scurtă discuție privind fizica particulelor și raționamentul utilizării adecvate a diferitelor tipuri de emisii în medicina nucleară. Acest domeniu medical utilizează dezintegrările radioactive fie pentru imagistica unei ținte de interes prin fotoni detectabili, în cadrul SPECT sau PET, fie în scop terapeutic, prin depunerea energiei particulelor rezultate pentru distrugerea celulelor țintă, în cadrul terapiei radioligandice țintite (*targeted radioligand therapy*, RLT) sau al modalităților conexe. Alegerea tipului de emisie reprezintă, în esență, o problemă de optimizare fizică aflată sub constrângeri clinice și radiochimice: modul de dezintegrare și fracțiile de ramificare determină particulele produse, valoarea Q stabilește energia disponibilă pentru produșii de dezintegrare, iar timpul de înjumătățire determină fezabilitatea utilizării medicale a izotopului, luând în considerare producția, transportul, costul și administrarea într-o fereastră clinică relevantă.

Ulterior, intervine fizica interacțiunii cu materia, care determină locul în care este depusă doza. Datorită interacțiunii lor slabe cu materia, fotonii sunt radiații indirect ionizante, iar energia lor este depusă prin formarea de electroni secundari, prin efect fotoelectric, împrăștiere Compton sau producere de perechi. În contrast, particulele încărcate, precum electronii, pozitronii, protonii sau particulele α , pierd energie în principal prin interacțiuni Coulombiene, descrise prin puterea de frânare (*stopping power*), generând parcursuri și structuri de traseu caracteristice care influențează LET, localizarea și distribuția dozei, precum și eficacitatea biologică.

În practica actuală, PET utilizează izotopi emițători β^+ , deoarece anihilarea pozitronului generează doi fotoni de 511 keV emiși în direcții opuse, permițând astfel detecția electronică bazată pe coincidență. SPECT utilizează emițători γ , cu mențiunea că sunt preferați radionuclizii cu energii gamma cât mai apropiate de intervalul optim pentru sistemul de detecție, precum și cu emisii cât mai „curate” din punct de vedere fizic [10]. Abordările terapeutice utilizează fie emițători β^- , care au un parcurs tisular de ordinul milimetrilor până la centimetrilor și pot induce efectul de iradiere încrucișată (*cross-fire*) [11], fie emițători α , care asigură un LET ridicat pe distanțe scurte și, implicit, o capacitate distructivă mare datorită ionizărilor intens concentrate [12], fie emițători de electroni Auger și electroni de conversie, care generează o avalanșă de electroni încărcăți per dezintegrare, asigurând un LET ridicat, dar necesitând potențial o țintire subcelulară din cauza parcursului ultra-scurt [13,14]. Există, de asemenea, modalități bazate pe protoni sau neutroni, constând în principal în abordări de iradiere externă, care exploatează depunerea dozei controlată în profunzime, utilizând vârful Bragg pentru hadronii încărcăți și/sau particulele încărcate secundare cu LET ridicat [15].

Modurile de dezintegrare radioactivă relevante pentru medicina nucleară includ dezintegrarea α , dezintegrarea β^- , dezintegrarea β^+ , captura electronică (*electron capture*, EC), emisia γ , conversia internă (*internal conversion*, IC) și cascadele Auger.

Dezintegrarea α emite o particulă α , respectiv un nucleu de heliu, și este asociată cu sarcină, energie și masă ridicate, producând ionizări dense pe un parcurs scurt în țesuturi, proprietăți exploatare în mod optim în terapia α țintită pentru tumori de dimensiuni reduse, precum metastazele sau celulele circulante [16]. Dezintegrarea β^- convertește un neutron într-un proton în nucleee bogate în neutroni, emițând un electron, β^- , și un antineutrino, generând un spectru energetic β continuu care determină parcursul electronului și profilul de depunere a energiei. Trebuie menționat că spectrul energetic nu are formă de clopot, iar majoritatea energiilor pe care particula β^- le poate avea în timpul procesului cuantic de dezintegrare sunt deplasate către valori mai mici, energia medie fiind aproximativ o treime din energia maximă posibilă.

Dezintegrarea pozitronică transformă un proton într-un neutron, emițând un pozitron și un neutrino, reprezentând calea dominantă de dezintegrare în nucleee bogate în protoni. Pozitronul, fiind antiparticula electronului, se anihilează rapid cu un electron din mediul înconjurător, producând doi fotoni de 511 keV emiși aproape în direcții opuse, care constituie baza fizică a detecției prin coincidență în PET. Este important de menționat că distanța parcursă de pozitron până la evenimentul de anihilare este proporțională cu energia acestuia. Acest aspect are o importanță majoră pentru rezoluția scanărilor PET, unde sunt preferați întotdeauna pozitronii cu energie mai redusă [17]. Captura electronică reprezintă o rută alternativă de conversie a protonilor în neutroni în nucleee bogate în protoni și generează o vacanță într-un strat electronic intern. Această vacanță este rapid ocupată de electroni de pe straturi externe, generând raze X caracteristice și/sau electroni de conversie, etapă urmată de procesul de relaxare atomică ce declanșează o cascadă de electroni Auger [18,19]. Emisia γ și conversia internă sunt procese de dezexcitare nucleară în care este eliberat un foton γ caracteristic. Conversia internă transferă energia tranziției către un electron atomic, determinând ejectarea acestuia și declanșând frecvent cascade Auger ulterioare [19].

Principalul element al căii NHEJ este, fără îndoială, holoenzima DNA-PK [20]. Din punct de vedere structural, aceasta este o protein-kinază serin/treoninică, alcătuită din heterodimerul Ku70/Ku80 și subunitatea catalitică DNA-PKcs, coordonând recunoașterea și etapele inițiale ale procesării rupturilor dublu-catenare ale ADN-ului. DNA-PK este, de asemenea, cel mai mare membru al familiei protein-kinazelor înrudite cu fosfatidilinozitol-3-kinaza (*phosphatidylinositol-3-kinase-related protein kinase*, PIKK), având o masă moleculară de 460 kDa, și este codificată de gena PRKDC/XRCC7 [21]. Aceasta are, de asemenea, rolul de a fosforila diferite substraturi care facilitează repararea ulterioară a leziunilor ADN. În plus, rolul său este complex, fiind implicată în multiple procese celulare, precum transcripția, remodelarea cromatinei și apoptoza.

Procesul de recunoaștere și reparare a DSB-urilor este rapid și robust. Prima etapă constă în recunoașterea catenelor ADN rupte de către heterodimerul Ku70/Ku80 și formarea complexului cu DNA-PKcs, care stabilizează catenele ADN, menținându-le în proximitate una față de cealaltă și permițând astfel desfășurarea procesului de reparare. Ulterior, după legare, DNA-PKcs suferă autofosforilare și devine activată, acest proces

fiind esențial pentru inițierea NHEJ. DNA-PKcs fosforilează, de asemenea, ținte din aval implicate în procesarea capetelor ADN și în reparare, facilitând recrutarea factorilor de reparare. Etapa finală constă în ligarea catenelor ADN rupte de către complexul ADN ligază IV-XRCC4, asigurând astfel integritatea genomică [22].

Este important de menționat că activarea DNA-PK este declanșată în principal de apariția leziunilor ADN, în special a DSB-urilor. Heterodimerul Ku70/Ku80 are o afinitate ridicată pentru catenele ADN, iar recrutarea acestuia la nivelul situsului lezional reprezintă o etapă timpurie a răspunsului celular la rupturile ADN.

Capacitățile crescute de reparare a ADN-ului sunt frecvent asociate cu o funcție crescută a DNA-PK [23]. Din punct de vedere mecanistic, acesta este motivul pentru care DNA-PK poate contribui la rezistența față de modalitățile terapeutice care induc leziuni ADN. Mai mult, hiperactivitatea DNA-PK a fost observată în diferite fenotipuri canceroase, putând influența adaptabilitatea și supraviețuirea celulelor tumorale prin rezistență la tratament. În contrast, nivelurile scăzute de DNA-PK pot compromite funcția de reparare a ADN-ului, celulele devenind susceptibile la instabilitate genetică și mutații; deficiențele acestei proteine au fost asociate cu imunodeficiența [24]. Recent, inhibarea DNA-PK a fost recunoscută ca o potențială țintă în tratamentul cancerului, în special în combinație cu agenți care induc leziuni ADN, precum chimioterapicele și radiofarmaceuticele. Moleculele mici pot interfera cu activitatea DNA-PKcs, determinând disfuncționalitatea întregului complex kinazic. Acești compuși sunt denumiți, în mod general, inhibitori DNA-PK.

Această strategie se bazează pe capacitatea de a sensibiliza celulele canceroase la agenți intens lezionali pentru ADN, prin afectarea abilității lor intrinseci de a repara DSB-urile induse, crescând astfel eficacitatea acestor tratamente. În plus, inhibitorii DNA-PK au demonstrat potențial ca agenți antitumorali de sine stătători, prin țintirea selectivă a celulelor canceroase cu mecanisme de reparare ADN compromise, menajând în același timp celulele normale care păstrează mecanisme de reparare intacte [25,26].

Strategiile de radiosensibilizare își fundamentează raționamentul pe amplificarea efectelor citotoxice ale radiațiilor ionizante asupra celulelor tumorale într-o măsură mai mare decât asupra țesuturilor sănătoase învecinate, crescând astfel raportul citotoxic tumoral/normal, îmbunătățind controlul local și rezultatul terapeutic. Deoarece răspunsul la radioterapie este determinat în principal de factori intrinseci tumorii, precum capacitatea de reparare a ADN-ului, și de factori extrinseci, precum statusul de oxigenare, vascularizația și imunosupresia, radiosensibilizatorii exploatează aceste vulnerabilități pentru a extinde fereastra terapeutică [140].

Hipoxia reprezintă un determinant major al radioresistenței [141,142]. Conform ipotezei fixării oxigenului, oxigenul molecular stabilizează radicalii ADN induși de radiații, transformându-i în leziuni nereparabile. În mediile hipoxice, predomină însă restituția chimică, acești radicali fiind restaurați chimic prin mecanismele de reparare, reducând astfel eficacitatea biologică a radiației, așa cum este susținut de raportul de amplificare prin

oxigen de aproximativ 2,5–3 [143–145]. Literatura clinică arată că metodele care modifică statusul hipoxic îmbunătățesc controlul locoregional și supraviețuirea în radioterapia carcinomului de cap și gât [146].

Hipoxia tumorală apare în principal ca urmare a unui dezechilibru între aportul și consumul de oxigen, determinat de creșterea tumorală rapidă și dezorganizată. Pe măsură ce celulele canceroase proliferază rapid, acestea depășesc capacitatea vascularizației existente, în timp ce angiogeneza indusă tumoral, mediată în mare parte de factorul inductibil de hipoxie 1α (*hypoxia-inducible factor-1 α* , HIF-1 α) și de factorul de creștere endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), produce vase de sânge anormale structural și funcțional, tortuoase, permeabile și slab perfuzate. Acest proces conduce la o livrare heterogenă și inefficientă a oxigenului, agravată de creșterea distanțelor de difuzie față de vase și de fluxul sanguin intermitent. În plus, cererea metabolică ridicată a celulelor tumorale accentuează suplimentar depleția de oxigen, determinând apariția atât a regiunilor hipoxice cronice, cât și acute în cadrul micromediului tumoral.

Modalitățile de adresare a micromediului tumoral includ: (i) prodroguri activate de hipoxie, precum evofosfamida (TH-302), care eliberează preferențial citotoxine în condiții de oxigenare scăzută și au fost testate atât individual, cât și în combinație cu radioterapia [147,148]; (ii) modulare fiziologică prin oxigen hiperbaric, respirație cu carbogen sau nicotinamidă, pentru îmbunătățirea reoxigenării [149]; (iii) abordări de normalizare vasculară, utilizând agenți vasoactivi pentru a crește perfuzia și a reduce temporar hipoxia [150–152].

Alternativ, nanoparticulele din materiale cu număr atomic ridicat, precum aurul, oxidul de hafniu sau platina, pot crește depunerea locală a dozei și producția de ROS în timpul iradierii, prin amplificarea absorbției fotoelectrice locale și generarea de electroni secundari, conducând în final la creșterea producției de DSB-uri [153]. Acestea pot fi, de asemenea, funcționalizate pentru țintire tumorală [154]. Funcționalizarea nanoparticulelor cu motive de țintire sau încărcături citotoxice poate îmbunătăți suplimentar specificitatea tumorală și poate evita toxicitatea sistemică potențială. Datele preclinice, precum și cele clinice, s-au concentrat asupra radiosensibilizării folosind nanoparticule de aur în linii celulare de cancer mamar triplu-negativ [155] și NBTXR3, un oxid de hafniu, în combinație cu radioterapia pentru carcinomul de țesuturi moi [156–158].

Limitările actuale pentru etapa translațională includ eficiența livrării la nivel tumoral, biodistribuția și clearance-ul variabile, precum și siguranța pe termen lung, din cauza potențialei acumulări în organe critice non-țintă, precum ficatul sau splina [159–162].

Cercetarea în domeniul radiosensibilizării a câștigat recent o tracțiune semnificativă, fiind motivată de rezultate preclinice și clinice promițătoare, cu multiple clase farmacologice de molecule utilizate pentru amplificarea eficacității radioterapiei.

Radiațiile ionizante induc ROS, care produc ulterior leziuni ale ADN-ului, proteinelor și lipidelor. Celulele tumorale reduc frecvent acest efect prin suprareglarea mecanismelor antioxidante, precum glutatationul și superoxid dismutaza [27–29]. Radiosensibilizatorii din

clasa modulatorilor redox acționează prin suprasolicitarea apărării antioxidante. Disulfiramul, un inhibitor al aldehyd-dehidrogenazei, poate forma complexe cu cuprul care catalizează suplimentar producția de ROS și acționează ca inductor al apoptozei. Studiile preclinice confirmă o radiosensibilitate crescută a celulelor tratate [30–32]. Alte strategii includ depleția farmacologică a glutatationului prin butionin-sulfoximină sau inhibarea aportului de NADPH, ambele demonstrând potențial de sensibilizare a tumorilor la radioterapie [33–35].

Răspunsul la radiații este corelat cu metabolismul tumoral, întrucât glicoliza eficientă și funcția mitocondrială furnizează ATP-ul și NADPH-ul necesare reparării ADN-ului și apărării antioxidante [36,37]. Inhibarea farmacologică a glicolizei prin 2-deoxi-D-glucoză sau inhibitori ai LDH, precum și blocarea fosforilării oxidative mitocondriale prin metformin, privează celulele canceroase de energie și reduc potențialul redox. 2-Deoxi-D-glucoza a fost evaluată ca radiosensibilizator glicolitic în studii clinice timpurii [38]. Metforminul, ca inhibitor al complexului I mitocondrial, a demonstrat potențial în etapa preclinică pentru radiosensibilizarea cancerului mamar, inclusiv a liniei MCF-7, prin efecte mediate de ROS, fiind în prezent explorat ca moleculă adjuvantă în radioterapie [39]. Acest stres metabolic indus artificial agravează leziunile ADN produse de radiațiile ionizante, prin limitarea activității proteinelor de reparare și creșterea acumulării ROS [40].

Având în vedere tendința radiațiilor ionizante de a produce predominant DSB-uri, inhibarea directă a căilor de reparare implicate în remediarea acestui tip de leziuni reprezintă o strategie logică de radiosensibilizare. Strategiile pot varia de la inhibarea selectivă a căii NHEJ până la inhibarea duală sau chiar multiplă a mai multor căi de reparare. De exemplu, inhibitorul selectiv DNA-PK AZD7648 sensibilizează tumorile la radioterapie atât *in vitro*, cât și *in vivo* [41,42]. În cancerul mamar, NU7441 a întârziat repararea DSB-urilor și a crescut radiosensibilitatea celulelor MCF-7 și MDA-MB-231 [43]. Date clinice timpurii arată că M3814 poate fi combinat cu radioterapia, cu sau fără cisplatină, în studii de fază I pentru tumori toracice/carcinoame ale capului și gâtului [44]. Compusul inhibitor dual DNA-PK/mTOR, CC-115, afectează atât calea de reparare a DSB-urilor, cât și semnalizarea de supraviețuire, finalizând deja testarea de tip *first-in-human* [45]. Această clasă de inhibitori ai reparării ADN-ului a demonstrat potențial atunci când este utilizată ca radiosensibilizator, putând permite tratamente eficiente cu doze mai mici de radiații. Datele preclinice arată că asocierea inhibitorilor DNA-PK poate reduce considerabil doza de radiații necesară pentru control tumoral. De exemplu, NU7441 a sensibilizat celulele canceroase la radiații ionizante cu un factor de 4–12 ori *in vitro* [43], sugerând că un regim cu doză mult mai mică de radiații ar putea avea același potențial terapeutic. Date clinice timpurii susțin aceeași direcție: inhibitorul DNA-PK peposertib a demonstrat o radiosensibilizare importantă în studii de fază I, investigatorii sugerând că acesta ar putea permite regimuri cu doze reduse de radiații, posibil chiar mai eficient în scheme mai fracționate, menținând niveluri similare de eficacitate [44]. O tendință similară este observată și pentru agenți mai noi, precum AZD7648 sau VX-984, care au demonstrat capacitatea de a amplifica răspunsul tumoral la radiații în modele preclinice [25]. Deși sunt necesare studii suplimentare, gama largă de fenotipuri tumorale în care această clasă de

compuși a arătat un beneficiu suplimentar este incontestabilă și demonstrează că inhibarea DNA-PK poate amplifica semnificativ efectele radiațiilor, ceea ce, clinic, ar putea permite utilizarea unor doze mai mici de radiații fără compromiterea eficacității terapeutice.

Deși HR este predominant activă în fazele S și G2 ale ciclului celular, aceasta este un proces considerabil mai lent. În contrast, NHEJ este un mecanism rapid, care își menține dominanța ca principală cale preferențială de reparare a DSB-urilor induse de radiații ionizante pe parcursul tuturor fazelor ciclului celular [4]. S-a demonstrat că NHEJ repară aproximativ 75–80% dintre DSB-urile induse de radiații ionizante chiar și în faza G2, dominată de HR [46], în mare parte deoarece este activată în primele minute după iradiere, în timp ce HR necesită o rezecție extinsă a capetelor ADN, proces care se desfășoară pe parcursul mai multor ore. Tumorile radio-rezistente tind astfel să supraregleze mecanismele rapide NHEJ, ceea ce face ca inhibarea acestei căi să rămână o strategie puternică de radiosensibilizare, în special în celulele canceroase cu diviziune rapidă, suprasolicitând funcțional mecanismul mai lent de rezervă reprezentat de HR și determinând acumularea de DSB-uri nerezolvate, care împing celula către catastrofă mitotică.

DNA-PK este esențială pentru NHEJ clasic, în timp ce mTOR furnizează suport metabolic și translațional pentru reparare, proliferare și supraviețuire în condiții de stres genotoxic indus. Există o interacțiune funcțională între aceste două căi, oferind o justificare pentru inhibarea combinată, cu scopul de a intensifica radiosensibilizarea și de a contracara radio-rezistența [47,48]. A fost raportată o corelație în biopsiile de carcinom cervical, în care tumorile cu expresie redusă a proteinei Ku70 au demonstrat o radiosensibilitate mai ridicată, fiind asociate și cu o supraviețuire semnificativ mai bună a pacienților [49].

Provocările importante pentru translația clinică includ necesitatea selecției pacienților pe baza biomarkerilor, de exemplu competența NHEJ, expresia DNA-PK sau statusul hipoxic, precum și protejarea țesuturilor sănătoase concomitent cu maximizarea radiosensibilizării tumorale, domeniu în care viitoarele sisteme de livrare medicamentoasă ar putea avea un rol esențial [50]. De asemenea, integrarea acestor strategii cu imunoterapia și alți agenți țintiți reprezintă o direcție importantă. Implementarea tehnicilor de radiosensibilizare în combinație cu radiofarmaceutice terapeutice și teranostice poate crește eficiența tratamentului prin valorificarea optimă a efectelor radiației în contextul terapiei radionuclidice țintite [30,33,34]. Un accent continuu ar trebui pus pe strategiile viitoare ghidate de biomarkeri și pe combinațiile terapeutice puternice, pentru obținerea unui beneficiu clinic durabil [51].

În plus, celulele tumorale au capacitatea de a dezvolta continuu mecanisme complexe de rezistență. Heterogenitatea intratumorală în ceea ce privește dependența de mecanismele de reparare a ADN-ului se traduce clinic prin faptul că doar anumite subpopulații celulare dintr-o tumoră sau metastază pot fi puternic dependente de NHEJ, permițând supraviețuirea altor clone cu o capacitate mai mare de HR sau de alăturare a capetelor mediată de polimeraza θ , respectiv alt-NHEJ [52]. Mai mult, inhibarea DNA-PK poate determina activarea compensatorie a altor căi, prin creșterea unor procese alternative de reparare a DSB-urilor. S-a demonstrat că inhibarea DNA-PKcs reduce activitatea NHEJ cu

aproximativ 94%, concomitent cu suprareglarea HR și alt-NHEJ de peste 3 ori [53]. Celulele pot, de asemenea, să restabilească semnalizarea din amonte, astfel încât pierderea capacității DNA-PK conduce la hiperactivarea kinazei ATM și la amplificarea răspunsului DDR mediat de p53 [54,55]. Tumorile deficitare în p53 ocolesc această plasă de siguranță, iar inhibarea DNA-PK nu reușește în acest caz să inducă apoptoza în celulele p53-null, care nu pot executa răspunsul la lezarea ADN-ului dependent de ATM/p53 [55]. Alte mecanisme de rezervă includ suprareglarea efluxului medicamentos, în care supraexpresia transportorului ABCG2 reduce nivelurile intracelulare ale inhibitorului DNA-PK CC-115, generând astfel rezistență la efectul acestuia, având în vedere că CC-115 este substrat atât pentru ABCG2, cât și pentru ABCB1 [56]. Aceste adaptări permit celulelor canceroase să reziste terapiilor centrate pe DNA-PK, subliniind importanța clinică a depășirii rezistenței tumorale prin utilizarea sinergică a unor rute terapeutice combinate.

Este de mare importanță să înțelegem că viitorul medicinei se apropie tot mai mult de o abordare de țintire foarte specifică, odată cu dezvoltarea unor mecanisme de livrare mai eficiente. În ultimii ani, dezvoltarea unor noi și îmbunătățite schele proteice de mici dimensiuni, ca vectori proiectați artificial pentru livrare medicamentoasă sau radiomarcare, s-a accelerat, generând o bază de date largă și diversă de biomolecule cu selectivitate ridicată, afinitate crescută și stabilitate înaltă, unele dintre acestea aflându-se în prezent în studii clinice pentru aplicații de radioimagnostică sau radioterapie.

Affibody-urile și proteinele de tip DARPin (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*) sunt schele proteice de mici dimensiuni, dezvoltate ca mimetice de anticorpi, având capacități de țintire foarte specifice [57]. Affibody-urile sunt construite peptidice de aproximativ 58 de aminoacizi, derivate din cele 3 helixuri ale domeniului Z al proteinei A din *Staphylococcus*, având o dimensiune redusă, de doar 6–7 kDa. DARPins sunt alcătuite din proteine cu repetiții de ankirină, respectiv 4–6 repetiții helix-turn-helix de aproximativ 33 de aminoacizi fiecare, fiind ușor mai mari, de aproximativ 14–18 kDa [57,58]. Ambele tipuri de constructe prezintă afinități de ordin pM–nM față de țintele lor, stabilitate termică ridicată și imunogenicitate redusă [59], fiind structuri proiectate artificial. Raționamentul utilizării lor terapeutice sau diagnostice ca vectori constă în capacitatea de a livra selectiv medicamente și radionuclizi către țintele dorite, precum receptorii tumorali supraexprimați, menajând virtual țesuturile sănătoase și concentrându-se în micromediul tumoral. Funcționalizarea specifică a vectorului poate fi realizată prin conjugare medicamentoasă la unul dintre capetele proteinei sau prin radiomarcare, fie direct pe reziduuri specifice, precum cisteina, fie utilizând chelatori precum DOTA, NOTA etc. De exemplu, DARPin EC1, care țintește receptorul EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), a fost funcționalizat cu un domeniu de legare de albumină (*albumin binding domain*, ABD), pentru prelungirea timpului de înjumătățire, precum și cu toxina DM1, derivat al mertansinei cu efect citotoxic ridicat, care se leagă de microtubuli [60,61]. Studii recente, inclusiv modele *in vitro* și animale, arată o eficacitate crescută și o toxicitate off-target redusă prin utilizarea metodelor de livrare țintită, precum conjugatele anti-HER2 affibody-DM1 [62] sau anti-HER2 DARPin-LoPE [63]. În plus, affibody-urile radiomarcate, precum ABY-025 anti-HER2 marcat cu $^{111}\text{In}/^{68}\text{Ga}$ [64,65], și DARPins, precum EC1 anti-EpCAM

marcat cu ^{125}I [58], au demonstrat capacități imagistice cu contrast ridicat și retenție tumorală selectivă. Cu toate acestea, metabolismul rapid, imunogenicitatea reziduală și stabilitatea conjugării rămân provocări care vor trebui abordate în următorii ani.

Datorită existenței unor biblioteci extinse de ținte, aceste schele proteice artificiale pot fi adaptate pentru a obține afinități și selectivități ridicate [57,66] față de ținta dorită. În plus, acestea sunt extrem de termorezistente, ceea ce deschide rute de marcare anterior inaccesibile pentru schelele proteice clasice, precum anticorpilor monoclonali, care se degradează la temperaturi mai ridicate [57,66]. Din punct de vedere farmacologic, affibody-urile de 6–7 kDa și DARPin-uri de 14–18 kDa se află sub pragul de filtrare renală, fiind eliminate rapid prin urină [57]. Affibody-urile prezintă un timp de înjumătățire foarte scurt, de ordinul minutelor până la orelor, în timp ce DARPin-uri, fiind puțin mai mari, au timpi de înjumătățire de câteva ore. Cu toate acestea, s-au depus eforturi considerabile pentru extinderea timpului lor biologic de înjumătățire, prin utilizarea ABD, PEG sau XTEN [60,61].

Deși aceste schele provin din proteine non-umane, ele au fost proiectate pentru a minimiza epitopii imunogenici. Clinic, atât affibody-urile, cât și DARPin-uri demonstrează imunogenicitate redusă [63]. Ambele clase sunt ușor de produs prin culturi bacteriene recombinante, în special *E. coli*. Pentru chimia de conjugare, grupări reactive, precum cisteinele, sunt introduse încă din etapele de proiectare în structura moleculară, permițând formarea unor legături stabile. Pentru chimia de radiomarcare, cei mai utilizați chelatori în aceste sisteme sunt DOTA, NODAGA, NOTA, DTPA, DFO etc.

Affibody-urile și DARPin-uri pot recunoaște specific ținte oncologice supraexprimate, precum HER2, EpCAM, EGFR etc., cu precizie ridicată, livrând astfel încărcătura farmacologică sau radionuclidică către celulele maligne. Comparativ cu anticorpilor monoclonali voluminoși, de aproximativ 150 kDa, care au permeabilitate redusă în tumoră și rate foarte lente de acumulare, schelele mici permit abordări terapeutice rapide și concentrate, precum și imagistică în aceeași zi [58,67].

Când sunt utilizate în scop imagistic, aceste schele trebuie de obicei adaptate cu chelatori legați covalent fie la capătul N-terminal, fie la capătul C-terminal [68]. Radionuclizii utilizați frecvent includ izotopi pentru SPECT/PET, precum ^{111}In , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{89}Zr [50], precum și nuclizi terapeutici, precum ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{211}At [68]. Pentru strategiile de tip conjugat schelă-medicament, sunt utilizate legături covalente stabile pentru a conecta vectorul de molecula activă, legături care pot fi clivate odată ajunse în interiorul celulei, pentru eliberarea încărcăturii citotoxice.

Ca vectori selectivi, aceste schele pot deplasa concentrația compusului citotoxic dintr-un cadru sistemic clasic către o concentrație artificial crescută în tumoră, extinzând fereastra terapeutică, așa cum conjugatul bazat pe trastuzumab, T-DM1, a demonstrat o reducere marcantă a toxicității sistemice comparativ cu chimioterapia clasică [60]. Similar, affibody-ul ZHER2-ABD-mcDM1 a demonstrat o concentrație de mcDM1 livrată în tumoră de 1,45 ori mai mare [60].

Dacă ținta este un receptor care se internalizează rapid, poate fi utilizat un radionuclid cu retenție intracelulară ridicată, precum metalele, sau o moleculă citotoxică, pentru a limita redistribuția off-target. În caz contrar, chiar și o țintă care nu se internalizează poate fi utilizată pentru terapie radionuclidică țintită sau pentru aplicații imagistice, atât timp cât afinitatea vectorului este ridicată și cinetica de disociere este favorabilă.

Pentru terapia radionuclidică țintită, particulele α și, mai ales, β^- pot afecta celulele adiacente, chiar dacă acestea nu exprimă ținta. Acest fenomen este denumit efect de iradiere încrucișată (*crossfire effect*) [69] și poate crește eficacitatea tratamentului în tumori heterogene, cu prețul afectării potențiale a țesutului sănătos înconjurător. Acest aspect subliniază importanța alegerii radionuclidului ideal atât pentru vector, cât și pentru tipul de tumoră tratată; de exemplu, emițătorul alfa ^{211}At poate produce leziuni foarte intense, dar într-o arie mult mai restrânsă, comparativ cu ^{177}Lu , care emite particule β^- cu LET scăzut pe o arie mai largă și stimulează efectul *bystander* până la zeci de celule distanță [70]. De asemenea, este important ca doza să fie calibrată cu atenție pentru a evita suprasaturarea tumorală, dincolo de care creșterea dozei nu mai aduce un beneficiu real, în timp ce toxicitatea off-target continuă să crească [58].

Imagistica moleculară reprezintă o componentă fundamentală a cercetării biomedicale contemporane, deoarece permite vizualizarea non-invazivă, cu rezoluție ridicată, a proceselor biologice și a metabolismului *in vivo*. Dintre radionuclizii utilizați în tomografia cu emisie de pozitroni (PET), ^{89}Zr a atras un interes considerabil datorită proprietăților sale favorabile [71]. ^{89}Zr se dezintegrează prin emisie β^+ în proporție de 22,7%, precum și prin captură electronică în proporție de 77%, către $^{89\text{m}}\text{Y}$, care ulterior emite un cuant γ de energie înaltă, de 909 keV. Emisia de pozitroni poate fi utilizată pentru a furniza un semnal PET robust, cu rezoluție spațială bună [72–74]. Timpul fizic de înjumătățire de 78,4 ore permite multiple puncte de scanare întârziate, până la 10 zile, după o singură doză injectată. Aceste avantaje particulare fac din ^{89}Zr o alegere ideală pentru biomolecule cu cinetică lentă, precum anticorpii monoclonali, sau pentru biomolecule mai rapide modificate pentru un timp de circulație prelungit, precum fragmentele de anticorpi, DARPin sau affibody-urile. Spre deosebire de izotopii PET cu timp de înjumătățire mai scurt, precum ^{18}F ($T_{1/2} = 109,7$ min) [75], ^{64}Cu ($T_{1/2} = 3,33$ h) [76] sau ^{68}Ga ($T_{1/2} = 67,6$ min) [77], care sunt mai potriviți pentru vectori cu cinetică rapidă, ^{89}Zr facilitează observarea detaliată a biodistribuției anticorpilor, a retenției tumorale și poate servi drept indicator al eficacității terapeutice pentru același vector trasor sau pentru imunoterapie utilizând același anticorp monoclonal [72,73]. Alegerea chelatorilor bifuncționali, care asigură complexarea stabilă a radiometalului fără a compromite activitatea biologică a moleculei vector, este esențială pentru succesul ^{89}Zr -immuno-PET. DFO și derivații săi, precum p-izotiocianatobenzil-deferoxamina (p-NCS-Bz-DFO), au fost utilizați pe scară largă pentru marcarea cu zirconiu datorită afinității ridicate pentru $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ și stabilității bune *in vivo* [78,79]. Cu toate acestea, în ciuda profilului termodinamic favorabil, complexul $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO prezintă încă transchelate *in vivo* și acumulare osoasă ulterioară a $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ liber, ridicând întrebări privind încrederea în evaluarea biodistribuției pe termen lung și riscul de acumulare off-target [80].

Pentru a depăși această provocare, sunt necesare dezvoltarea și optimizarea unor strategii de chelare mai performante, cu scopul de a crește stabilitatea radiocomplexului cu ^{89}Zr și de a minimiza captarea non-țintă. Clinic, ^{89}Zr -immuno-PET s-a dovedit semnificativ în medicina nucleară, în special pentru imagistica tumorilor care supraexprimă HER2, EGFR [81] și VEGF [82,83]. Un pas esențial în utilizarea anticorpilor monoclonali ca radiofarmaceutice a fost radiomarcarea trastuzumabului, un anticorp monoclonal care țintește cancerul mamar HER2-pozitiv, în care supraexpresia HER2 stimulează semnalizarea oncogenică prin activarea unei tirozin-kinaze [84–86]. Supraexpresia HER2 este observată în aproximativ 20% dintre cazurile de cancer mamar și reprezintă un prognostic critic al răspunsului terapeutic [87]; astfel, dezvoltarea trasorilor pe bază de ^{89}Zr care țințesc HER2 reprezintă o piatră de temelie în terapia oncologică de precizie.

Affibody-urile reprezintă o clasă de schele proteice proiectate care oferă o serie de avantaje față de anticorpii monoclonali convenționali în imagistica moleculară. Structural, affibody-urile sunt alcătuite dintr-un construct cu trei helixuri, mult mai mic decât anticorpii monoclonali clasici, având aproximativ 6,5–7,5 kDa, comparativ cu dimensiunea de aproximativ 150 kDa a anticorpilor monoclonali întregi. Această diferență importantă de dimensiune conferă o farmacocinetică mai rapidă, demonstrată prin clearance sanguin rapid și penetrare tumorală îmbunătățită, permițând un contrast imagistic mai ridicat și o fereastră imagistică mai scurtă după injectare. În plus, moleculele de affibody prezintă o stabilitate fizico-chimică remarcabilă într-un interval larg de temperaturi, până la 90°C, și valori de pH între 2,5 și 11, depășind semnificativ profilul de stabilitate al anticorpilor monoclonali, care sunt sensibili la condiții de mediu în afara valorilor fiziologice normale [88–90].

Affibody-urile pot fi produse eficient prin exprimare în sisteme celulare procariotice, precum *E. coli*, simplificând provocările de fabricație și reducând costurile comparativ cu anticorpii monoclonali derivați din culturi celulare mamaliene. Imunogenicitatea este mai redusă pentru affibody-uri decât pentru anticorpii monoclonali, datorită naturii lor proiectate, non-imunoglobulinice. În plus, prezența unor situsuri accesibile de conjugare face ca affibody-urile să fie adecvate pentru radiomarcarea situs-specifică, facilitând dezvoltarea radiofarmaceuticelor. Aceste proprietăți fac din affibody-uri candidați foarte atractivi pentru aplicații de imagistică moleculară, în special imagistica PET, în care biodistribuția rapidă și penetrarea tumorală ridicată sunt esențiale pentru un contrast imagistic optim [89,90].

Abordările terapeutice țintite au devenit o direcție promițătoare în managementul cancerului ovarian, oferind potențialul unei eficacități terapeutice crescute și al unei toxicități sistemice reduse. Cancerul ovarian este o boală heterogenă, caracterizată prin alterări diverse și căi de semnalizare complexe, necesitând dezvoltarea unor strategii terapeutice personalizate [91]. Apariția terapiilor țintite, proiectate specific pentru a exploata caracteristici moleculare aberante, precum micromediul tumoral sau receptorii supraexprimați, precum și căi dereglate în cancerul ovarian, are un potențial important pentru îmbunătățirea rezultatelor pacienților și depășirea limitărilor terapiilor convenționale. Prin țintirea selectivă a unor determinanți moleculari cheie și a

vulnerabilităților tumorale, aceste abordări de medicină de precizie oferă potențialul de a inhiba creșterea tumorală, de a reduce rezistența la tratament și de a îmbunătăți supraviețuirea globală a pacienților cu cancer ovarian.

DARPin-ul Ec1, aparținând unei clase de proteine de legare proiectate și extrem de adaptate, prezintă un design molecular unic, care permite țintirea specifică a receptorului EpCAM în cancerul ovarian [92]. Tehnologia DARPin utilizează o schelă proteică modulară, alcătuită din domenii de legare mici și foarte stabile, care pot fi proiectate pentru a recunoaște molecule țintă specifice cu afinitate și specificitate ridicate. În cazul DARPin Ec1, domeniul său de legare a fost adaptat pentru a recunoaște și a se lega selectiv de domeniul extracelular al EpCAM, o proteină de suprafață celulară supraexprimată în diverse tipuri de cancere epiteliale, inclusiv cancerul ovarian, rezultând o țintire eficientă a celulelor tumorale. Aceste caracteristici fac din Ec1 un vector sau trasor adecvat pentru livrarea selectivă a efectului citotoxic furnizat de un compus toxic, precum DM1/mertansina, care se leagă selectiv de microtubulii din celulele canceroase, conducând la inhibarea diviziunii celulare prin perturbarea asamblării microtubulilor [93].

Un domeniu de legare a albuminei (*albumin binding domain*, ABD) este o componentă proteică proiectată pentru a prezenta afinitate selectivă față de albumina serică umană (*human serum albumin*, HSA) [94], principala proteină plasmatică. Rolul principal al ABD este de a exploata caracteristicile intrinseci ale albuminei, precum abundența și timpul lung de circulație, pentru a conferi persistență extinsă în circulația sistemică agenților terapeutici sau probelor imagistice, prin formarea unui complex reversibil, non-covalent, cu albumina. Includerea unui ABD în designul molecular oferă mai multe avantaje, inclusiv evitarea clearance-ului renal rapid, protecția împotriva degradării enzimatice și distribuția facilitată în organism prin intermediul sângelui.

Designul molecular ales în această lucrare include două variante diferite, în care ABD este legat de capătul C-terminal sau N-terminal al DARPin Ec1, respectiv Ec1-ABD-DM1 și ABD-Ec1-DM1. Eticheta (HE)3 a fost inclusă la capătul N-terminal pentru ambii compuși, pentru radiomarcarea cu [^{99m}Tc] $\text{Tc}(\text{CO})_3$ și caracterizarea cantitativă a proprietăților acestora. În comparația directă în testul de specificitate a legării, a fost observată o tendință în care Ec1-ABD-DM1 a prezentat o activitate asociată celular mai mare decât ABD-Ec1-DM1, tendință similară pentru ambele linii celulare, OVCAR3 și SKOV3. Influența HSA asupra legării de EpCAM a fost evaluată prin compararea legării în prezența sau absența HSA. Pentru celulele OVCAR3, a fost observată o activitate asociată celular mai mare pentru ABD-Ec1-DM1 ($p < 0,01$) în prezența HSA, în timp ce pentru Ec1-ABD-DM1 nu a fost observată nicio diferență. În schimb, în celulele SKOV3, a fost observată o activitate asociată celular mai mare pentru Ec1-ABD-DM1 ($p < 0,001$) în absența HSA comparativ cu prezența HSA, în timp ce pentru ABD-Ec1-DM1 nu a fost observată nicio diferență. Acest lucru sugerează că formarea complexului ABD-HSA reduce legarea de EpCAM; totuși, trebuie menționat că această scădere a legării este relativ minoră, de 1,3 ori în celulele OVCAR3 și de 1,4 ori în celulele SKOV3. Afinitatea de legare față de EpCAM măsurată în prezența HSA a fost în interval subnanomolar pentru

[^{99m}Tc]Tc(CO) $_3$ -Ec1-ABD-DM1 și în interval nanomolar scăzut pentru [^{99m}Tc]Tc(CO) $_3$ -ABD-Ec1-DM1. Valorile de afinitate pentru [^{99m}Tc]Tc(CO) $_3$ -Ec1-ABD-DM1 ($0,14 \pm 0,01$ nM) sunt în bună concordanță cu valorile de afinitate obținute anterior pentru DARPin Ec1 în celulele OVCAR3, respectiv 35 pM pentru [^{125}I]I-PIB-Ec1 [58], în timp ce afinitatea [^{99m}Tc]Tc(CO) $_3$ -ABD-Ec1-DM1 ($1,24 \pm 0,11$ nM) este cu un ordin de mărime mai mică, sugerând o capacitate de legare redusă a acestui construct față de EpCAM. Observate pe o perioadă mai lungă de incubare, curbele de captare sunt foarte consistente, indicând o internalizare lentă și continuă, care urmează fracția totală asociată celular, fără atingerea unei faze de saturație chiar și după 24 de ore de incubare. Fracția internalizată a fost ușor mai ridicată pentru celulele SKOV3 ($35 \pm 1\%$) comparativ cu OVCAR3 ($25 \pm 2\%$), dar a fost similară între diferitele designuri moleculare: $25 \pm 2\%$ pentru Ec1-ABD-DM1 și $25 \pm 0\%$ pentru ABD-Ec1-DM1 în celulele OVCAR3, respectiv $35 \pm 1\%$ pentru Ec1-ABD-DM1 și $35 \pm 0\%$ pentru ABD-Ec1-DM1 în celulele SKOV3. Acest tipar de captare sugerează potențialul pentru o acțiune citotoxică de lungă durată, fără saturarea receptorilor EpCAM, precum și o captare lentă și continuă și eliberare a medicamentului DM1 din complexul ABD-HSA, ceea ce poate exercita un stres citotoxic constant asupra celulelor canceroase pe o perioadă mai lungă.

Constructele bazate pe Ec1-ABD-DM1 reprezintă, împreună cu alte complexe care conțin DM1 și se bazează pe alte schele proteice proiectate, precum affibody-ABD-DM1 [60,95] și ADAPT6-ABD-DM1 [95,96], o clasă de bioconjugate proiectate pentru livrarea medicamentoasă țintită de precizie în terapia cancerului. Integrarea unui ABD asigură circulația sistemică prelungită și acumularea tumorală crescută a încărcăturii citotoxice livrate de DM1. Aceste constructe prezintă caracteristici moleculare și atribute funcționale distincte, care contribuie la potențialul terapeutic specific fiecăruia.

Similar constructelor DARPin, complexe ADAPT6-ABD-DM1 utilizează proteine ADAPT mici (*Albumin-binding Domain-derived Affinity Proteins*), de 46–59 aminoacizi sau 5–7 kDa, proiectate pe baza unui domeniu cu structură de fascicul de trei helixuri derivat dintr-un domeniu de legare a albuminei din proteina G streptococică [91]. Acest construct oferă avantajul recunoașterii țintei bazate pe ADAPT, putând extinde gama indicațiilor oncologice țintite. Fiind molecule chiar mai mici decât DARPins, constructele care utilizează ADAPT6 ca element de țintire prezintă clearance mai rapid și ar putea fi mai potrivite pentru aplicații imagistice decât pentru intervenții terapeutice de lungă durată. În mod similar, constructele affibody-ABD-DM1 utilizează molecule affibody, proteine proiectate mici, de 58 de aminoacizi sau 6–7 kDa [97], cu structură de fascicul de trei helixuri, pentru recunoaștere și legare precisă a țintei. Complexele bazate pe affibody pentru țintirea specifică a micromediului tumoral sau a receptorilor supraexprimați au demonstrat timpi mai lungi de circulație și retenție în tumori, fiind astfel foarte bine adaptate atât pentru scopuri imagistice, cât și terapeutice.

Deși constructele bazate pe DARPin Ec1-ABD-DM1, affibody-ABD-DM1 și ADAPT6-ABD-DM1 împărtășesc obiectivul comun al livrării medicamentoase țintite folosind DM1 ca agent citotoxic, designurile lor moleculare foarte diferite și proprietățile

distincte de recunoaștere a țintei evidențiază versatilitatea și modularitatea acestor bioconjugate. Alegerea între aceste constructe depinde de factori precum profilul de expresie al receptorului țintă, farmacocinetica dorită și obiectivele terapeutice [98,99], subliniind importanța unei abordări adaptate și personalizate în optimizarea strategiilor de tratament oncologic.

Rezultatele preliminare obținute în acest proiect arată că ambele constructe proteice pot fi radiomarcate cu tricarbonil de tehnețiu-99m și demonstrează legare specifică de EpCAM pe celule canceroase vii. Rezultatele sugerează, de asemenea, că poziția domeniului ABD în conjugatele medicamentoase DM1 bazate pe Ec1 este importantă pentru țintirea EpCAM. Atunci când ABD a fost localizat la capătul N-terminal al Ec1, a fost observată o afinitate de legare redusă a constructului ABD-Ec1-DM1 față de EpCAM, comparativ cu constructul în care ABD este poziționat C-terminal, Ec1-ABD-DM1. Acest lucru indică faptul că designul molecular care conține ABD la capătul C-terminal ar putea fi preferabil pentru țintirea EpCAM față de poziționarea la capătul N-terminal în constructele bazate pe DARPin Ec1. Sunt de interes studii suplimentare care să investigheze influența ABD asupra extinderii timpului de înjumătățire al conjugatelor și asupra țintirii tumorale *in vivo*. Aceste rezultate evidențiază, de asemenea, avantajul important al utilizării conjugatelor vector-medicament și tehnicile practice necesare pentru obținerea și testarea acestor compuși.

Aceste constatări susțin raționamentul utilizării unui affibody anti-HER2 marcat cu ^{89}Zr ca alternativă la trasorii imagistici deja consacrați pe bază de anticorpi monoclonali, precum trastuzumab sau pertuzumab, a căror utilitate rămâne limitată de timpul biologic de înjumătățire scurt, fereastra imagistică întârziată și doza radioactivă crescută la nivelul țesuturilor sănătoase [72,100–102]. Moleculele de affibody oferă avantaje cheie care abordează aceste limitări, precum clearance-ul rapid, acumularea rapidă și penetrarea tumorală eficientă, datorită dimensiunii lor reduse.

Am demonstrat că soluția de [^{89}Zr]Zr-oxalat obținută după procesarea materialului iradiat depășește standardele Farmacopeei Europene, cu o puritate radionuclidică de 99,9% și o puritate radiochimică de peste 95%, având în vedere că abaterile de la aceste standarde ridicate pot genera produse finale nesigure pentru pacienți.

Un aspect semnificativ observat este stabilitatea bună a affibody-ului anti-HER2 marcat cu ^{89}Zr la punctul de timp de 24 de ore, cu o puritate radiochimică de peste 75%, atât în ser de șobolan, cât și în ser uman. Diferențele dintre puritățile radiochimice obținute pentru compusul nostru și alte entități moleculare studiate [103,104] sugerează o integritate structurală mai bună a radioconjugatului în condiții biologice, posibil datorită unui complex de chelare mai stabil sau protecției sterice oferite de scheletul affibody.

În plus, influența condițiilor de marcarea, în special pH-ul, reprezintă o observație importantă, [^{89}Zr]Zr-p-NCS-Bz-DFO-anti-HER2 affibody atingând un randament de peste 75%, cu o puritate radiochimică de peste 87%, folosind condiții blânde de marcarea, respectiv pH $7,2 \pm 0,2$ și temperatura camerei.

Am confirmat profilul de stabilitate al radio-schelei noastre, observând o degradare mai mare pentru affibody-ul anti-HER2 marcat cu ^{89}Zr în ser uman după 24 de ore de incubare. Acest test este important în evaluarea viitorului translațional al oricărui compus dezvoltat, iar necesitatea unei optimizări suplimentare rămâne esențială. Studiile viitoare ar trebui să investigheze utilizarea unor chelatori mai performanți, precum DFO*, DFO-cyclo* sau alte schele macrociclice care au fost validate și au demonstrat stabilitate mai bună în medii biologice [105–107]. În plus, strategiile situs-specifice ar putea depăși degradarea enzimatică a chelatorului [108].

Specificitatea păstrată a vectorului a fost confirmată prin analiza comparativă directă între BT-474 și MCF-7, în care linia celulară HER2-pozitivă a demonstrat captare și retenție mai bune comparativ cu varianta negativă [109,110]. Frația redusă de retenție observată în linia MCF-7, care nu exprimă HER2, este cel mai probabil datorată legării nespecifice de diferite structuri moleculare prezente pe suprafața celulară, aspect susținut de scăderea abruptă în faza de retenție. Comparativ cu BT-474, este vizibilă o diferență importantă atât în captare, cât și în retenție, BT-474 demonstrând o retenție puternică bazată pe legarea selectivă și intensă a affibody-ului de ținta HER2.

În concluzie, aceste rezultate demonstrează că [^{89}Zr]Zr-p-NCS-Bz-DFO-anti-HER2 affibody reprezintă un radiotrasor promițător pentru imagistica PET a neoplasmelor HER2-pozitive. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare *in vivo* pentru evaluarea completă a farmacocineticii, dozimetriei și profilului de siguranță, precum și pentru optimizarea ulterioară a comportamentului biologic. Biodistribuția favorabilă a affibody-ului susține suplimentar potențialul său pentru translație clinică, prin îmbunătățirea contrastului imagistic și reducerea iradierii off-target comparativ cu alternativele bazate pe anticorpi monoclonali întregi.

Integritatea analizei de docking depinde într-o mare măsură de acuratețea energiei de legare prezise, incluzând interacțiunile intermoleculare, solvatarea și modificările conformaționale. Atunci când pLDDT este utilizat ca indicator al fiabilității predicției AlphaFold2 dincolo de algoritmi de căutare, această acuratețe devine critică. Din cauza dificultății algoritmice a calculului exact al energiei libere pentru studiile de docking de rutină, funcțiile de scor sunt proiectate să utilizeze modele matematice simplificate, care pot fi clasificate în patru tipuri: bazate pe câmpuri de forță, bazate pe cunoaștere, bazate pe învățare automată și empirice. Funcțiile bazate pe fizică însumează atât interacțiunile covalente, cât și pe cele necovalente, precum interacțiunile van der Waals, atracțiile electrostatice, legăturile de hidrogen și solvatarea. Funcțiile bazate pe cunoaștere derivă potențiale statistice din baze de date proteine–ligand cunoscute, utilizând adesea relația Boltzmann inversă, în care contactele atomice frecvent observate sunt marcate ca favorabile. Modelele de învățare automată au evoluat pentru a depăși formulele liniare fixe și pentru a învăța relații neliniare din seturi mari de date. Funcțiile empirice ajustează termeni ponderați de interacțiune la date experimentale de legare [111–113].

O limitare importantă a metodelor standard de docking este comportamentul non-static al biomoleculelor reale. Ligandul adoptă constant multiple conformații, iar proteinele își

modifică de obicei forma tridimensională la legare. Acest fenomen poate fi descris prin conceptele de *induced fit* și selecție conformațională: *induced fit* presupune ajustarea proteinei după apropierea ligandului, în timp ce selecția conformațională presupune că proteina există deja ca un ansamblu de stări posibile, iar ligandul se leagă de una dintre acestea, modificând astfel distribuția populațională. Acest aspect este esențial deoarece datele obținute prin docking rigid reprezintă o aproximare grosieră a comportamentului real. Pentru a gestiona flexibilitatea intrinsecă, au fost dezvoltate mai multe strategii, precum dockingul flexibil, flexibilitatea lanțurilor laterale, relaxarea moleculară și dockingul de ansamblu. Dockingul de ansamblu este deosebit de important deoarece înlocuiește metodologia bazată pe o singură structură a receptorului cu o abordare populațională, care imită mai fidel înțelegerea actuală a biologiei structurale [111,114].

O altă limitare critică este modul în care prezența apei, entropia și dinamica sunt integrate în spațiul de simulare. Dockingul are o capacitate rezonabil de bună de generare a pozițiilor de legare, dar încă nu permite predicții precise ale afinității de legare, în principal din cauza simplificării excesive a importanței solventului, a rețelelor de legături de hidrogen și a dinamicii reale a sistemului. Majoritatea metodelor de docking neglijează prezența apei sau o includ doar subtil, deși moleculele de apă pot acționa ca mediatori ai contactelor cheie și pot remodela rețeaua de interacțiuni. Entropia este, de asemenea, dificil de simulat, deoarece dinamica legării se modifică permanent, în special libertatea conformațională atât a ligandului, cât și a proteinei. Din acest motiv, funcțiile de scor din docking trebuie înțelese separat de energiile libere fizice exacte de legare, fiind mai degrabă aproximări utile pentru clasificare și generare de ipoteze, nu descrieri termodinamice complete, iar validarea experimentală rămâne necesară [111,114,115].

RMSD-ul domeniului trunchiat a fost în medie de 4 Å în toate simulările de dinamică moleculară, sugerând instabilitatea structurală a domeniului kinazic, chiar și atunci când au fost aplicate restrângeri de 30 N/m. Aceste rezultate sugerează că domeniul FAT ar putea avea un rol important în menținerea stabilității buzunarului de legare. Deși realizarea unei simulări de dinamică moleculară a întregii proteine este nefezabilă pe majoritatea sistemelor computaționale, studiile viitoare ar trebui să includă și domeniul FAT și să clarifice dacă acesta acționează ca o schelă structurală pentru domeniile catalitice kinazice funcționale.

Structura noastră PDB a inclus AZD7684 ca ligand deja co-cristalizat, pe care l-am utilizat drept control pozitiv. RMSD-ul ligandului control pozitiv după suprapunerea pe receptor a sugerat că ligandul a suferit deplasări tranzitorii față de modelul nativ de legare, înainte de o tranziție finală către o conformație mai stabilă energetic.

AZD7684 redocat și VX984 docat au prezentat disociere spontană din cauza unor valori nefavorabile ale energiei libere de legare, confirmate de calculele MM-PBSA. Această disociere spontană ar putea fi determinată de instabilitatea generală a domeniului trunchiat și de interacțiuni intermoleculare nefavorabile. PIK-75 a prezentat un profil conformațional similar cu cel al controlului nativ. Totuși, a demonstrat o conformație mai instabilă și a migrat din buzunarul de legare la punctul de timp de 150 ns. M3814 a

prezentat stabilitate în etapele inițiale, dar a migrat constant în afara buzunarului de legare, atingând un platou RMSD de peste 5 Å după 100 ns. În consecință, aceste simulări nu susțin o clasificare robustă a afinității sau presupuneri termodinamice cantitative precise.

Toate calculele MM-PBSA au generat energii libere de legare medii pozitive, demonstrând că, deși unii liganzi au rămas structural stabili relativ la sistemul foarte flexibil, toate sistemele au fost, în final, instabile termodinamic, nereușind să recreeze fidel condițiile fiziologice de legare.

Simulările care au inclus restrângeri de 30 N/m asupra tuturor atomilor proteici au arătat rezultate aproape identice, demonstrând suplimentar că restrângerile singure nu au putut compensa domeniile structurale lipsă.

În final, valorile RMSD ale ligandului suprapus și valorile instabile ale energiei libere de legare MM-PBSA indică faptul că sistemul trunchiat este instabil termodinamic și nefiabil pentru simularea precisă a energiei libere de legare a ligandului, a buzunarului de legare și a conformațiilor din jurul acestuia. Studiile viitoare ar trebui să includă alte domenii ale enzimei DNA-PKcs, pentru a obține un buzunar de legare mai stabil din punct de vedere termodinamic și fizic.

Per ansamblu, aceste date susțin raționamentul utilizării fluxurilor computaționale de lucru, inclusiv modelarea receptorilor asistată de inteligență artificială, dockingul la scară largă și screeningul focalizat al derivaților, pentru prioritizarea etapelor de design radiofarmaceutic înainte de sinteza experimentală. Astfel, studiile viitoare de docking rămân foarte relevante pentru designul trasorilor, nu ca dovadă independentă a eficacității, ci mai degrabă ca etapă rațională de filtrare în evaluarea tiparelor de modificare care păstrează angajarea țintei, permițând în același timp modificările dorite, precum radiomarcarea sau designul molecular, de exemplu domenii ABD sau structuri de spacer. Acest aspect este critic pentru inhibitorii DNA-PK, deoarece DNA-PKcs joacă un rol central în mecanismul NHEJ și este recrutată timpuriu la situsurile DSB, ceea ce o face un partener farmacologic logic pentru terapia radionuclidică țintită și chiar un vector rezonabil pentru aplicații de radioterapie tumorală. Recenzii recente au etichetat clar inhibitorii reparării ADN-ului, inclusiv inhibitorii DNA-PK, drept parteneri promițători pentru terapia radionuclidică țintită, în timp ce studiile experimentale continuă să demonstreze că inhibarea DNA-PK poate amplifica puternic răspunsul la radiații [42,116,117].

Pe de altă parte, potențialul translațional al inhibitorilor DNA-PK va depinde în mare măsură de o caracterizare experimentală mai profundă. Derivații compatibili cu dockingul trebuie validați experimental în continuare din perspectiva fezabilității sintezei, chimiei de radiomarcare, afinității față de țintă, comportamentului intracelular, localizării nucleare, rezidenței în proximitatea ADN-ului, stabilității metabolice și indicelui terapeutic. Aceeași precauție se aplică și modelelor receptorilor utilizate pentru predicție. AlphaFold2 a facilitat accesul la ipoteze structurale, însă performanța sa rămâne limitată în sistemele dinamice, în stările conformaționale induse de ligand, în regiunile flexibile și în contexte în care geometria situsului de legare este sensibilă la cofactori sau la stări proteice alternative.

Studii recente au arătat că modelele bazate pe AlphaFold pot susține screeningul virtual, subliniind necesitatea unei pregătiri mai bune a receptorului și a unor metodologii de simulare mai realiste. Acestea fiind spuse, următoarea etapă rațională se va baza probabil nu doar pe dezvoltarea unor liganzi mai buni, ci și pe instrumente predictive optimizate, structuri rafinate derivate din învățare automată, tratament îmbunătățit al flexibilității receptorului și metode de simulare moleculară predictivă mai standardizate, capabile să reducă distanța dintre datele informative de legare și comportamentul radiofarmaceutic real în sisteme biologice [118–120].

Analizând datele de viabilitate la 24 de ore, tiparul de răspuns arată o dependență clară de linia celulară. MDA-MB-231 prezintă un răspuns mai clar dependent de concentrație la inhibarea DNA-PK, în special pentru grupurile de combinație, unde tratamentele care induc leziuni ADN prezintă rezultate mai bune decât monoterapia. În contrast, MCF-7 prezintă un profil mai plat și heterogen, cu suprapuneri mai largi între barele de eroare și o inhibare dependentă de doză mai puțin consistentă. Acest fenomen este explicabil biologic prin dependența MDA-MB-231 de NHEJ, unde blocarea DNA-PK ar trebui să compromită principala cale funcțională de reparare a DSB-urilor. Studii publicate suplimentare susțin, de asemenea, faptul că MDA-MB-231 prezintă o utilizare redusă a HR și o sensibilitate crescută la inhibarea DNA-PK în contextul defectelor de reparare [121]. DNA-PK este esențială pentru repararea DSB-urilor mediată de NHEJ, iar inhibarea sa este de așteptat să crească vulnerabilitatea față de agenții care induc DSB-uri.

Strategiile combinate bazate pe $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ arată o radiosensibilizare mai puternică în MDA-MB-231 decât în MCF-7. Viabilitatea MDA-MB-231 pentru monoterapia cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ se află în intervalul de aproximativ 70–75%, în timp ce mai multe combinații inhibitor + $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ reduc suplimentar viabilitatea, demonstrând că inhibarea DNA-PK afectează repararea leziunilor ADN induse de radiație. Acest rezultat este concordant cu raționamentul terapeutic al $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ [13,14], care combină emisii β^- cu LET scăzut cu emisii de electroni Auger cu LET ridicat și s-a demonstrat că induce modificări ale viabilității celulare, leziuni ADN, stres oxidativ și căi de răspuns la stres în celulele canceroase. În contrast, inhibitorii combinați cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ nu reduc constant viabilitatea sub nivelul monoterapiei cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ în MCF-7. În mai multe condiții, viabilitatea chiar se îmbunătățește comparativ cu monoterapia cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$.

Combinațiile cu doxorubicină au demonstrat cea mai puternică potențare, în special pentru MDA-MB-231, unde datele de viabilitate arată o reducere sub nivelul controlului tratat doar cu doxorubicină pentru majoritatea condițiilor cu inhibitori. Acest lucru indică un efect sinergic sau cel puțin aditiv între inhibitorii DNA-PK și efectul genotoxic indus de doxorubicină. Tendința este prezentă și pentru linia celulară MCF-7, în special în cazul M3814 și pentru unele grupuri CC-115, deși rezoluția efectului este mai redusă comparativ cu MDA-MB-231. Aceste rezultate se potrivesc bine cu rolul cunoscut al inhibitorilor DNA-PK ca amplificatori ai leziunilor ADN induse de radiații și farmacologic. Studiile preclinice care analizează inhibarea selectivă a DNA-PK au demonstrat, de asemenea,

potențarea efectelor radiațiilor ionizante și ale doxorubicinei [42]. Totuși, pe baza exclusivă a datelor de viabilitate, efectul sinergic ar trebui confirmat prin analize suplimentare.

M3814 pare să inducă unul dintre cele mai puternice efecte inhibitorii, în special la concentrațiile mai ridicate. Totuși, există o distribuție de tip platou, încă neelucidată, pentru concentrațiile intermediare și mai mici. În viitor, este necesară o analiză mai detaliată a concentrațiilor dintre C1 și C2, pentru a obține o imagine mai clară a curbei doză–efect. CC-115 poate prezenta un efect mai larg datorită blocării cumulative atât a DNA-PK, cât și a mTOR, ceea ce înseamnă că citotoxicitatea sa poate reflecta afectarea simultană a reparării DSB-urilor și a semnalizării de supraviețuire și creștere. Acest lucru ar putea explica performanța sa bună în combinațiile cu doxorubicină, dar mai redusă în combinație cu $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$. PIK-75 este un inhibitor DNA-PK/PI3K mai puțin selectiv, iar efectul său este astfel mai dificil de interpretat, deoarece o parte a acestuia poate proveni din inhibarea căii PI3K, nu doar din blocarea DNA-PK. Per ansamblu, aceste date susțin raționamentul conform căruia inhibitorii DNA-PK sensibilizează preferențial modelul tumoral MDA-MB-231 dependent de NHEJ la leziunile ADN induse de doxorubicină și radiații, în timp ce MCF-7 prezintă un profil mai rezistent, probabil datorită păstrării capacității HR și unei posibile activități compensatorii DDR.

Analiza în funcție de timp a arătat că efectul citotoxic indus de inhibarea DNA-PK și $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ are un vârf întârziat și crește marcat la 72 de ore, în special în linia celulară MDA-MB-231 dependentă de NHEJ. Deși ambele linii celulare au menținut o viabilitate relativ ridicată în primele 24–48 de ore, MDA-MB-231 a prezentat o pierdere marcată a viabilității după 72 de ore de incubare, susținând ipoteza noastră. În contrast, MCF-7, competentă pentru HR, a prezentat doar o sensibilizare întârziată parțială, sugerând existența unei capacități compensatorii de reparare a ADN-ului sau a unui prag mai ridicat pentru letalitatea indusă de radiații.

Reducerea puternică a viabilității observată la 72 de ore este concordantă cu comportamentul biologic întârziat al leziunilor ADN nerezolvate, deși este necesară diferențierea între această particularitate biologică și cinetica rapidă a reparării DSB-urilor. Deoarece mecanismele intrinseci de reparare a DSB-urilor au loc în 1–2 ore pentru calea NHEJ sau în peste 8 ore pentru mecanismul HR [122], leziunile persistente care rămân nerezolvate peste 24 de ore sunt interpretate de obicei ca leziuni reziduale sau ca un set complex de leziuni dificil de reparat. S-a evidențiat că retenția focarelor γH2AX peste 24 de ore după lezarea ADN-ului se corelează strâns cu pierderea supraviețuirii clonogenice, iar celulele care rețin focare RAD51 la 12–24 de ore după iradiere au o probabilitate crescută de a muri [123,124]. Multiple studii arată că fragmentarea apoptotică a ADN-ului devine observabilă începând cu 48 de ore, cu efecte biologice apoptotice clare la 72 și chiar 96 de ore [125,126]. În plus, s-a demonstrat că blocarea DNA-PK prelungește activ această fereastră, împingând revenirea la valorile bazale pentru focarele $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}/\text{pATM}$ induse de radiații la aproximativ 6 ore. Atunci când inhibarea DNA-PK este utilizată în combinație cu leziuni ADN induse de radiații, focarele persistă cel puțin 72 de ore, împreună cu micronuclei și un blocaj G2/M prelungit [42]. Scăderea semnificativă a

viabilității la 72 de ore în MDA-MB-231 consolidează concluzia că inhibarea DNA-PK compromise repararea leziunilor ADN induse de [⁶⁴Cu]CuCl₂, conducând în final la moarte celulară apoptotică sau mitotică întârziată.

Rezultatele analizei γH2AX pe MDA-MB-231 ar fi putut fi determinate de o interacțiune între inhibitorii DNA-PK și fosforilarea focarelor γH2AX. Metoda se bazează pe detectarea rapidă a fosforilării moleculelor histonei H2AX din jurul leziunilor la serina 139, de către kinaze de tip PI3K-like, ca răspuns la DSB-uri induse. Interferența inhibitorilor DNA-PK cu activitatea acestor kinaze specifice ar putea fi mai pronunțată în cazul celulelor dependente de NHEJ, precum MDA-MB-231, și nu în cazul celor mai puțin dependente de NHEJ, precum MCF-7.

Studii anterioare au arătat că prezența inhibitorilor DNA-PK a determinat o scădere a focarelor γH2AX după iradierea γ a celulelor RIC1 [127,128]. Am observat o interacțiune similară pentru MDA-MB-231 atunci când au fost incubate cu CC-115, cu și fără doxorubicină. Prezența inhibitorului a determinat o ușoară scădere a γH2AX după expunerea la inductorul de leziuni ADN. Experimentele viitoare se vor concentra pe depășirea barierei pe care inhibitorii DNA-PK par să o impună funcționalității testului γH2AX și pe identificarea unor metode alternative de analiză a leziunilor ADN, precum testul cometă [129,130].

Aceste constatări arată o diferență clară între efectele inhibării DNA-PK asupra a două modele de carcinom mamar, derivată din dependența individuală de NHEJ, și propun o cale rațională pentru obținerea unui efect radioterapeutic amplificat prin exploatarea vulnerabilităților intrinseci ale tipului tumoral.

Având în vedere rezultatele actuale, studiile viitoare vor continua să evalueze concentrațiile C1 și C2 ale PIK-75 și CC-115 în ceea ce privește potențialul lor radiosensibilizator, stabilind baza pentru caracterizarea *in vivo* și urmărind obținerea unei perspective mai clare asupra rolului lor în sensibilitatea celulară la stresul genotoxic, în special asupra potențialului sinergic atunci când sunt combinați cu agenți care induc leziuni ADN și cu opțiuni terapeutice deja consacrate, mai ales abordări radioterapeutice, unde efectul lor pare să aducă cel mai mare beneficiu.

1. Heinen, C.D.; Schmutte, C.; Fishel, R. DNA Repair and Tumorigenesis: Lessons from Hereditary Cancer Syndromes. *Cancer Biology & Therapy* **2002**, *1*, 477–485, doi:10.4161/cbt.1.5.160.
2. Jackson, S.P.; Bartek, J. The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. *Nature* **2009**, *461*, 1071–1078, doi:10.1038/nature08467.
3. Mehta, A.; Haber, J.E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014**, *6*, a016428, doi:10.1101/cshperspect.a016428.
4. Rothkamm, K.; Krüger, I.; Thompson, L.H.; Lübrich, M. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology* **2003**, *23*, 5706–5715, doi:10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003.
5. Ward, J.F. The Complexity of DNA Damage: Relevance to Biological Consequences. *International Journal of Radiation Biology* **1994**, *66*, 427–432, doi:10.1080/09553009414551401.
6. Lomax, M.E.; Folkes, L.K.; O'Neill, P. Biological Consequences of Radiation-Induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* **2013**, *25*, 578–585, doi:10.1016/j.clon.2013.06.007.

7. Nikjoo, H.; Emfietzoglou, D.; Liamsuwan, T.; Taleei, R.; Liljequist, D.; Uehara, S. Radiation Track, DNA Damage and Response—a Review. *Rep. Prog. Phys.* **2016**, *79*, 116601, doi:10.1088/0034-4885/79/11/116601.
8. Ku, A.; Facca, V.J.; Cai, Z.; Reilly, R.M. Auger Electrons for Cancer Therapy – a Review. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2019**, *4*, 27, doi:10.1186/s41181-019-0075-2.
9. Baiocco, G.; Barbieri, S.; Babini, G.; Morini, J.; Alloni, D.; Friedland, W.; Kundrát, P.; Schmitt, E.; Puchalska, M.; Sihver, L.; et al. The Origin of Neutron Biological Effectiveness as a Function of Energy. *Sci Rep* **2016**, *6*, 34033, doi:10.1038/srep34033.
10. Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges. *Nucl Med Commun* **2008**, *29*, 193–207, doi:10.1097/MNM.0b013e3282f3a515.
11. Jiao, R.; Dadachova, E. Combination of Radioligand Therapy and Immunotherapy: How to Make It Work in Clinic? *Immunotargets Ther* **2025**, *14*, 755–759, doi:10.2147/ITT.S485643.
12. Guerra Liberal, F.D.C.; O’Sullivan, J.M.; McMahon, S.J.; Prise, K.M. Targeted Alpha Therapy: Current Clinical Applications. *Cancer Biother Radiopharm* **2020**, *35*, 404–417, doi:10.1089/cbr.2020.3576.
13. Serban, R.M.; Niculae, D.; Manda, G.; Neagoe, I.; Dobre, M.; Niculae, D.A.; Temelie, M.; Mustăciosu, C.; Leonte, R.A.; Chilug, L.E.; et al. Modifications in Cellular Viability, DNA Damage and Stress Responses Inflicted in Cancer Cells by Copper-64 Ions. *Front Med (Lausanne)* **2023**, *10*, 1197846, doi:10.3389/fmed.2023.1197846.
14. Niculae, D.; Dusman, R.; Leonte, R.A.; Chilug, L.E.; Dragoi, C.M.; Nicolae, A.; Serban, R.M.; Niculae, D.A.; Dumitrescu, I.B.; Draganescu, D. Biological Pathways as Substantiation of the Use of Copper Radioisotopes in Cancer Theranostics. *Front. Phys.* **2021**, *8*, doi:10.3389/fphy.2020.568296.
15. Pennock, M.; Wei, S.; Cheng, C.; Lin, H.; Hasan, S.; Chhabra, A.M.; Choi, J.I.; Bakst, R.L.; Kabarriti, R.; Simone li, C.B.; et al. Proton Bragg Peak FLASH Enables Organ Sparing and Ultra-High Dose-Rate Delivery: Proof of Principle in Recurrent Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 3828, doi:10.3390/cancers15153828.
16. Sgouros, G. Alpha-Particles for Targeted Therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60*, 1402–1406, doi:10.1016/j.addr.2008.04.007.
17. Shukla, A.K.; Kumar, U. Positron Emission Tomography: An Overview. *J Med Phys* **2006**, *31*, 13–21, doi:10.4103/0971-6203.25665.
18. Alotiby, M.; Greguric, I.; Kibédi, T.; Lee, B.Q.; Roberts, M.; Stuchbery, A.E.; Tee, P.; Tornyi, T.; Vos, M. Measurement of the Intensity Ratio of Auger and Conversion Electrons for the Electron Capture Decay of ¹²⁵I. *Phys Med Biol* **2018**, *63*, 06NT04, doi:10.1088/1361-6560/aab24b.
19. Ku, A.; Facca, V.J.; Cai, Z.; Reilly, R.M. Auger Electrons for Cancer Therapy - a Review. *EJNMMI Radiopharm Chem* **2019**, *4*, 27, doi:10.1186/s41181-019-0075-2.
20. Mahaney, B.L.; Meek, K.; Lees-Miller, S.P. Repair of Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks by Non-Homologous End-Joining. *Biochem J* **2009**, *417*, 639–650, doi:10.1042/BJ20080413.
21. Blackford, A.N.; Jackson, S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* **2017**, *66*, 801–817, doi:10.1016/j.molcel.2017.05.015.
22. Niculae, D.A.; Șerban, R.M.; Niculae, D.; Drăgănescu, D. Impeding the NHEJ Pathway for Overcoming Radioresistance in the Context of Precision Radiotherapy of Cancer. *Pharmaceutics* **2026**, *18*, 131, doi:10.3390/pharmaceutics18010131.
23. Rubin, E.; Wu, X.; Zhu, T.; Cheung, J.C.Y.; Chen, H.; Lorincz, A.; Pandita, R.K.; Sharma, G.G.; Ha, H.C.; Gasson, J.; et al. A Role for the HOXB7 Homeodomain Protein in DNA Repair. *Cancer Res* **2007**, *67*, 1527–1535, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4283.
24. Meek, K.; Gupta, S.; Ramsden, D.A.; Lees-Miller, S.P. The DNA-Dependent Protein Kinase: The Director at the End. *Immunol Rev* **2004**, *200*, 132–141, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00162.x.

25. Khan, A.J.; Misenko, S.M.; Thandoni, A.; Schiff, D.; Jhawar, S.R.; Bunting, S.F.; Haffty, B.G. VX-984 Is a Selective Inhibitor of Non-Homologous End Joining, with Possible Preferential Activity in Transformed Cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 25833–25841, doi:10.18632/oncotarget.25383.
26. van Bussel, M.T.J.; Awada, A.; de Jonge, M.J.A.; Mau-Sørensen, M.; Nielsen, D.; Schöffski, P.; Verheul, H.M.W.; Sarholz, B.; Berghoff, K.; El Bawab, S.; et al. A First-in-Man Phase 1 Study of the DNA-Dependent Protein Kinase Inhibitor Peposertib (Formerly M3814) in Patients with Advanced Solid Tumours. *Br J Cancer* **2021**, *124*, 728–735, doi:10.1038/s41416-020-01151-6.
27. Liu, R.; Bian, Y.; Liu, L.; Liu, L.; Liu, X.; Ma, S. Molecular Pathways Associated with Oxidative Stress and Their Potential Applications in Radiotherapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **2022**, *49*, 1–11, doi:10.3892/ijmm.2022.5121.
28. Azzam, E.I.; Jay-Gerin, J.-P.; Pain, D. Ionizing Radiation-Induced Metabolic Oxidative Stress and Prolonged Cell Injury. *Cancer Lett* **2012**, *327*, 48–60, doi:10.1016/j.canlet.2011.12.012.
29. Jiang, H.; Wang, H.; De Ridder, M. Targeting Antioxidant Enzymes as a Radiosensitizing Strategy. *Cancer Letters* **2018**, *438*, 154–164, doi:10.1016/j.canlet.2018.09.004.
30. Jia, Y.; Huang, T. Overview of Antabuse® (Disulfiram) in Radiation and Cancer Biology. *Cancer Manag Res* **2021**, *13*, 4095–4101, doi:10.2147/CMAR.S308168.
31. Zeng, M.; Wu, B.; Wei, W.; Jiang, Z.; Li, P.; Quan, Y.; Hu, X. Disulfiram: A Novel Repurposed Drug for Cancer Therapy. *Chin Med J (Engl)* **2024**, *137*, 1389–1398, doi:10.1097/CM9.0000000000002909.
32. Huang, J.; Campian, J.L.; DeWees, T.A.; Skrott, Z.; Mistrik, M.; Johanns, T.M.; Ansstas, G.; Butt, O.; Leuthardt, E.; Dunn, G.P.; et al. A Phase 1/2 Study of Disulfiram and Copper With Concurrent Radiation Therapy and Temozolomide for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2024**, *120*, 738–749, doi:10.1016/j.ijrobp.2024.05.009.
33. Shrieve, D.C.; Denekamp, J.; Minchinton, A.I. Effects of Glutathione Depletion by Buthionine Sulfoximine on Radiosensitization by Oxygen and Misonidazole in Vitro. *Radiat Res* **1985**, *102*, 283–294.
34. Kinsella, T.J.; Dobson, P.P.; Russo, A.; Mitchell, J.B.; Fornace, A.J. Modulation of X Ray Dna Damage by SR-2508 ± Buthionine Sulfoximine. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **1986**, *12*, 1127–1130, doi:10.1016/0360-3016(86)90241-5.
35. Delbart, W.; Marin, G.; Stamatopoulos, B.; de Wind, R.; Sirtaine, N.; Demetter, P.; Vercruyssen, M.; Woff, E.; Karfis, I.; Ghanem, G.E.; et al. Disturbing the Redox Balance Using Buthionine Sulfoximine Radiosensitized Somatostatin Receptor-2 Expressing Pre-Clinical Models to Peptide Receptor Radionuclide Therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, 2332, doi:10.3390/cancers15082332.
36. Moretton, A.; Loizou, J.I. Interplay between Cellular Metabolism and the DNA Damage Response in Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 2051, doi:10.3390/cancers12082051.
37. Ju, H.-Q.; Lin, J.-F.; Tian, T.; Xie, D.; Xu, R.-H. NADPH Homeostasis in Cancer: Functions, Mechanisms and Therapeutic Implications. *Sig Transduct Target Ther* **2020**, *5*, 231, doi:10.1038/s41392-020-00326-0.
38. Mohanti, B.K.; Rath, G.K.; Anantha, N.; Kannan, V.; Das, B.S.; Chandramouli, B.A.R.; Banerjee, A.K.; Das, S.; Jena, A.; Ravichandran, R.; et al. Improving Cancer Radiotherapy with 2-Deoxy-d-Glucose: Phase I/II Clinical Trials on Human Cerebral Gliomas. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **1996**, *35*, 103–111, doi:10.1016/S0360-3016(96)85017-6.
39. Zhu, L.; Yang, K.; Ren, Z.; Yin, D.; Zhou, Y. Metformin as Anticancer Agent and Adjuvant in Cancer Combination Therapy: Current Progress and Future Prospect. *Transl Oncol* **2024**, *44*, 101945, doi:10.1016/j.tranon.2024.101945.
40. Fiorica, F.; Tebano, U.; Napoli, G.; Franceschetto, A.; Muraro, M.; Giorgi, C.; Pinton, P. Metabolic-Modulating Effects of Radiation: Undetectable Yet Deadly—A Review on Radiotherapy. *Cancers (Basel)* **2024**, *17*, 54, doi:10.3390/cancers17010054.

41. Nakamura, K.; Karmokar, A.; Farrington, P.M.; James, N.H.; Ramos-Montoya, A.; Bickerton, S.J.; Hughes, G.D.; Illidge, T.M.; Cadogan, E.B.; Davies, B.R.; et al. Inhibition of DNA-PK with AZD7648 Sensitizes Tumor Cells to Radiotherapy and Induces Type I IFN-Dependent Durable Tumor Control. *Clin Cancer Res* **2021**, *27*, 4353–4366, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-3701.
42. Fok, J.H.L.; Ramos-Montoya, A.; Vazquez-Chantada, M.; Wijnhoven, P.W.G.; Follia, V.; James, N.; Farrington, P.M.; Karmokar, A.; Willis, S.E.; Cairns, J.; et al. AZD7648 Is a Potent and Selective DNA-PK Inhibitor That Enhances Radiation, Chemotherapy and Olaparib Activity. *Nat Commun* **2019**, *10*, 5065, doi:10.1038/s41467-019-12836-9.
43. Ciszewski, W.M.; Tavecchio, M.; Dasty, J.; Curtin, N.J. DNA-PK Inhibition by NU7441 Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation and Doxorubicin. *Breast Cancer Res Treat* **2014**, *143*, 47–55, doi:10.1007/s10549-013-2785-6.
44. Samuels, M.; Falkenius, J.; Bar-Ad, V.; Dunst, J.; van Triest, B.; Yachnin, J.; Rodriguez-Gutierrez, A.; Kuipers, M.; You, X.; Sarholz, B.; et al. A Phase 1 Study of the DNA-PK Inhibitor Peposertib in Combination With Radiation Therapy With or Without Cisplatin in Patients With Advanced Head and Neck Tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2024**, *118*, 743–756, doi:10.1016/j.ijrobp.2023.09.024.
45. Munster, P.; Mita, M.; Mahipal, A.; Nemunaitis, J.; Massard, C.; Mikkelsen, T.; Cruz, C.; Paz-Ares, L.; Hidalgo, M.; Rathkopf, D.; et al. First-In-Human Phase I Study Of A Dual mTOR Kinase And DNA-PK Inhibitor (CC-115) In Advanced Malignancy. *Cancer Manag Res* **2019**, *11*, 10463–10476, doi:10.2147/CMAR.S208720.
46. Beucher, A.; Birraux, J.; Tchouandong, L.; Barton, O.; Shibata, A.; Conrad, S.; Goodarzi, A.A.; Krempler, A.; Jeggo, P.A.; Löbrich, M. ATM and Artemis Promote Homologous Recombination of Radiation-induced DNA Double-strand Breaks in G2. *EMBO J* **2009**, *28*, 3413–3427, doi:10.1038/emboj.2009.276.
47. Danesh Pazhooh, R.; Rahnamay Farnood, P.; Asemi, Z.; Mirsafaei, L.; Yousefi, B.; Mirzaei, H. mTOR Pathway and DNA Damage Response: A Therapeutic Strategy in Cancer Therapy. *DNA Repair (Amst)* **2021**, *104*, 103142, doi:10.1016/j.dnarep.2021.103142.
48. Ma, Y.; Vassetzky, Y.; Dokudovskaya, S. mTORC1 Pathway in DNA Damage Response. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2018**, *1865*, 1293–1311, doi:10.1016/j.bbamcr.2018.06.011.
49. Wilson, C.R.; Davidson, S.E.; Margison, G.P.; Jackson, S.P.; Hendry, J.H.; West, C.M. Expression of Ku70 Correlates with Survival in Carcinoma of the Cervix. *Br J Cancer* **2000**, *83*, 1702–1706, doi:10.1054/bjoc.2000.1510.
50. Tudoroiu-Cornoiu, M.-R.; Șerban, R.M.; Cocioabă, D.; Niculae, D.A.; Drăgănescu, D.; Leonte, R.; Ion, A.C.; Niculae, D. 89Zr-Radiolabelling of p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody Immunoconjugate: Characterization and Assessment of In Vitro Potential in HER2-Positive Breast Cancer Imaging. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 739, doi:10.3390/pharmaceutics17060739.
51. Baumann, M.; Krause, M.; Overgaard, J.; Debus, J.; Bentzen, S.M.; Daartz, J.; Richter, C.; Zips, D.; Bortfeld, T. Radiation Oncology in the Era of Precision Medicine. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 234–249, doi:10.1038/nrc.2016.18.
52. Hsu, F.-M.; Zhang, S.; Chen, B.P.C. Role of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in Cancer Development and Treatment. *Transl Cancer Res* **2012**, *1*, 22–34, doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2012.04.01.
53. Lavery, D.J.; Gupta, S.K.; Bradshaw, G.A.; Hunter, A.S.; Carlson, B.L.; Calmo, N.M.; Chen, J.; Tian, S.; Sarkaria, J.N.; Nagel, Z.D. ATM Inhibition Exploits Checkpoint Defects and ATM-Dependent Double Strand Break Repair in TP53-Mutant Glioblastoma. *Nat Commun* **2024**, *15*, 5294, doi:10.1038/s41467-024-49316-8.

54. Finzel, A.; Grybowski, A.; Strasen, J.; Cristiano, E.; Loewer, A. Hyper-Activation of ATM upon DNA-PKcs Inhibition Modulates P53 Dynamics and Cell Fate in Response to DNA Damage. *Molecular Biology of the Cell* **2016**, *27*, 2360–2367, doi:10.1091/mbc.E16-01-0032.
55. Haines, E.; Nishida, Y.; Carr, M.I.; Montoya, R.H.; Ostermann, L.B.; Zhang, W.; Zenke, F.T.; Blaukat, A.; Andreeff, M.; Vassilev, L.T. DNA-PK Inhibitor Peposertib Enhances P53-Dependent Cytotoxicity of DNA Double-Strand Break Inducing Therapy in Acute Leukemia. *Sci Rep* **2021**, *11*, 12148, doi:10.1038/s41598-021-90500-3.
56. Beebe, J.; Zhang, J.-T. CC-115, a Dual Mammalian Target of Rapamycin/DNA-Dependent Protein Kinase Inhibitor in Clinical Trial, Is a Substrate of ATP-Binding Cassette G2, a Risk Factor for CC-115 Resistance. *J Pharmacol Exp Ther* **2019**, *371*, 320–326, doi:10.1124/jpet.119.258392.
57. Zhang, L.; Zhang, H. Recent Advances of Affibody Molecules in Biomedical Applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2024**, *113*, 117923, doi:10.1016/j.bmc.2024.117923.
58. Vorobyeva, A.; Konovalova, E.; Xu, T.; Schulga, A.; Altai, M.; Garousi, J.; Rinne, S.S.; Orlova, A.; Tolmachev, V.; Deyev, S. Feasibility of Imaging EpCAM Expression in Ovarian Cancer Using Radiolabeled DARPin Ec1. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 3310, doi:10.3390/ijms21093310.
59. Sokolova, E.A.; Shilova, O.N.; Kiseleva, D.V.; Schulga, A.A.; Balalaeva, I.V.; Deyev, S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPin-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2399, doi:10.3390/ijms20102399.
60. Ding, H.; Xu, T.; Zhang, J.; Tolmachev, V.; Oroujeni, M.; Orlova, A.; Gräslund, T.; Vorobyeva, A. Affibody-Derived Drug Conjugates Targeting HER2: Effect of Drug Load on Cytotoxicity and Biodistribution. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 430, doi:10.3390/pharmaceutics13030430.
61. Zhang, J.; Bodenko, V.; Larkina, M.; Bezverkhniaia, E.; Xu, T.; Liao, Y.; Abouzayed, A.; Plotnikov, E.; Tretyakova, M.; Yuldasheva, F.; et al. Half-Life Extension via ABD-Fusion Leads to Higher Tumor Uptake of an Affibody-Drug Conjugate Compared to PAS- and XTENylation. *Journal of Controlled Release* **2024**, *370*, 468–478, doi:10.1016/j.jconrel.2024.04.051.
62. Westerberg, C.; Mestre Borrás, A.; Ståhl, S.; Löfblom, J. Affibody-Based HER2 Prodrug Shows Conditional Cytotoxic Effect on HER2-Positive Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2025**, *758*, 151660, doi:10.1016/j.bbrc.2025.151660.
63. Sokolova, E.A.; Shilova, O.N.; Kiseleva, D.V.; Schulga, A.A.; Balalaeva, I.V.; Deyev, S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPin-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2399, doi:10.3390/ijms20102399.
64. Sörensen, J.; Sandberg, D.; Sandström, M.; Wennborg, A.; Feldwisch, J.; Tolmachev, V.; Åström, G.; Lubberink, M.; Garske-Román, U.; Carlsson, J.; et al. First-in-Human Molecular Imaging of HER2 Expression in Breast Cancer Metastases Using the ¹¹¹In-ABY-025 Affibody Molecule. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**, *55*, 730–735, doi:10.2967/jnumed.113.131243.
65. Ahlgren, S.; Orlova, A.; Wållberg, H.; Hansson, M.; Sandström, M.; Lewsley, R.; Wennborg, A.; Abrahmsén, L.; Tolmachev, V.; Feldwisch, J. Targeting of HER2-Expressing Tumors Using ¹¹¹In-ABY-025, a Second-Generation Affibody Molecule with a Fundamentally Reengineered Scaffold. *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, *51*, 1131–1138, doi:10.2967/jnumed.109.073346.
66. Plückthun, A. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPin): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2015**, *55*, 489–511, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
67. Frejd, F.Y.; Kim, K.-T. Affibody Molecules as Engineered Protein Drugs. *Exp Mol Med* **2017**, *49*, e306–e306, doi:10.1038/emm.2017.35.
68. Murugan, D.; Vasanthakumari Thirumalaiswamy, H.; Murugesan, V.; Venkatesan, J.; Balachandran, U.; Lakshminarayanan, K.; Satpati, D.; Nikolić, S.; Rangasamy, L. Unlocking the Power of Affibody

- Conjugated Radioactive Metallopharmaceuticals for Targeted Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **2025**, 272, 108863, doi:10.1016/j.pharmthera.2025.108863.
69. Enger, S.A.; Hartman, T.; Carlsson, J.; Lundqvist, H. Cross-Fire Doses from Beta-Emitting Radionuclides in Targeted Radiotherapy. A Theoretical Study Based on Experimentally Measured Tumor Characteristics. *Phys Med Biol* **2008**, 53, 1909–1920, doi:10.1088/0031-9155/53/7/007.
 70. Mothersill, C.; Seymour, C. The Bystander Effect in Targeted Radiotherapy. In *Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer*; John Wiley & Sons, Ltd, 2010; pp. 507–525 ISBN 978-0-470-61321-4.
 71. He, H.; Qi, X.; Fu, H.; Xu, J.; Zheng, Q.; Chen, L.; Zhang, Y.; Hua, H.; Xu, W.; Xu, Z.; et al. Imaging Diagnosis and Efficacy Monitoring by [⁸⁹Zr]Zr-DFO-KN035 immunoPET in Patients with PD-L1-Positive Solid Malignancies. *Theranostics* **2024**, 14, 392–405, doi:10.7150/thno.87243.
 72. Badier, L.; Quelven, I. Zirconium 89 and Copper 64 for ImmunoPET: From Antibody Bioconjugation and Radiolabeling to Molecular Imaging. *Pharmaceutics* **2024**, 16, 882, doi:10.3390/pharmaceutics16070882.
 73. Melendez-Alafort, L.; Ferro-Flores, G.; De Nardo, L.; Ocampo-García, B.; Bolzati, C. Zirconium Immune-Complexes for PET Molecular Imaging: Current Status and Prospects. *Coordination Chemistry Reviews* **2023**, 479, 215005, doi:10.1016/j.ccr.2022.215005.
 74. Imura, R.; Jang, J.; Ozeki, A.N.; Takahashi, H.; Ida, H.; Wada, Y.; Kumakura, Y.; Akimitsu, N. Click Chemistry Enables [89Zr]Zr-DOTA Radioimmunoconjugation for Theranostic 89Zr-immunoPET. *Bioconjugate Chem.* **2024**, 35, 1744–1754, doi:10.1021/acs.bioconjchem.4c00274.
 75. Lechi, F.; Eriksson, J.; Odell, L.R.; Wegrzyniak, O.; Löfblom, J.; Frejd, F.Y.; Zhang, B.; Eriksson, O. Optimized Method for Fluorine-18 Radiolabeling of Affibody Molecules Using RESCA. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2024**, 9, 73, doi:10.1186/s41181-024-00304-9.
 76. Brühlmann, S.A.; Walther, M.; Kopka, K.; Kreller, M. Production of the PET Radionuclide ⁶¹Cu via the ⁶²Ni(p,2n)⁶¹Cu Nuclear Reaction. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2024**, 9, 3, doi:10.1186/s41181-023-00233-z.
 77. Li, X.; Li, Z.; Huang, M.; Wang, R.; Li, M.; Yang, H.; Lu, X.; Cai, H.; Tian, R. Gallium-68-Labeled ZPDGFRβ Affibody: A Potential PET Probe for Platelet-Derived Growth Factor Receptor β-Expressing Carcinomas. *Mol. Pharmaceutics* **2023**, 20, 1357–1364, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.2c00957.
 78. Chomet, M.; Schreurs, M.; Bolijn, M.J.; Verlaan, M.; Beaino, W.; Brown, K.; Poot, A.J.; Windhorst, A.D.; Gill, H.; Marik, J.; et al. Head-to-Head Comparison of DFO* and DFO Chelators: Selection of the Best Candidate for Clinical 89Zr-Immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2021**, 48, 694–707, doi:10.1007/s00259-020-05002-7.
 79. Wuensche, T.E.; Lyashchenko, S.; van Dongen, G.A.M.S.; Vugts, D. Good Practices for 89Zr Radiopharmaceutical Production and Quality Control. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2024**, 9, 40, doi:10.1186/s41181-024-00258-y.
 80. Zeglis, B.M.; Lewis, J.S. The Bioconjugation and Radiosynthesis of 89Zr-DFO-Labeled Antibodies. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* **2015**, e52521, doi:10.3791/52521.
 81. Zolghadri, S.; Mohammadpour-Ghazi, F.; Yousefnia, H. Preparation, Quality Control, and Absorbed Dose Estimation of 89Zr-DFO-Cetuximab for Imaging of EGFR-Expressing Tumors. *J Radioanal Nucl Chem* **2024**, 333, 2639–2648, doi:10.1007/s10967-024-09486-7.
 82. García-Varela, L.; Codesido, J.; Perez-Pedrosa, A.; Muñoz-González, M.; Ramos-Docampo, E.; Rey-Bretal, D.; García-Otero, X.; Gómez-Lado, N.; Turrero, A.; Beiroa, D.; et al. Biodistribution and Pharmacokinetics of [89Zr]-Anti-VEGF mAbs Using PET in Glioblastoma Rat Models. *International Journal of Pharmaceutics* **2024**, 652, 123795, doi:10.1016/j.ijpharm.2024.123795.

83. Hrynchak, I.; Cocioabă, D.; Fonseca, A.I.; Leonte, R.; do Carmo, S.J.C.; Cornoiu, R.; Falcão, A.; Niculae, D.; Abrunhosa, A.J. Antibody and Nanobody Radiolabeling with Copper-64: Solid vs. Liquid Target Approach. *Molecules* **2023**, *28*, 4670, doi:10.3390/molecules28124670.
84. Santa-Maria, C.A.; Nye, L.; Mutonga, M.B.; Jain, S.; Gradishar, W.J. Management of Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: Where Are We and Where Do We Go From Here. *Oncology (Williston Park)* **2016**, *30*, 148–155.
85. Schettini, F.; Buono, G.; Cardalesi, C.; Desideri, I.; Placido, S.D.; Mastro, L.D. Hormone Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Where We Are Now and Where We Are Going. *Cancer Treatment Reviews* **2016**, *46*, 20–26, doi:10.1016/j.ctrv.2016.03.012.
86. Deri, M.A.; Zeglis, B.M.; Francesconi, L.C.; Lewis, J.S. PET Imaging with ⁸⁹Zr: From Radiochemistry to the Clinic. *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, *40*, 3–14, doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004.
87. Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Schwartz, J.N.; Hagerty, K.L.; Allred, D.C.; Cote, R.J.; Dowsett, M.; Fitzgibbons, P.L.; Hanna, W.M.; Langer, A.; et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **2007**, *131*, 18–43, doi:10.5858/2007-131-18-ASOCCO.
88. Evaluation of [¹¹¹In]CHX-A"-DTPA-Z^{HER2:342}, an Affibody Ligand Conjugate for Targeting of HER2-Expressing Malignant Tumors - ProQuest Available online: <https://www.proquest.com/openview/47e050ca6fb2d57ad80a8ccee0add476/1?pq-origsite=gscholar&cbl=27900> (accessed on 5 May 2026).
89. Löfblom, J.; Feldwisch, J.; Tolmachev, V.; Carlsson, J.; Ståhl, S.; Frejd, F. y. Affibody Molecules: Engineered Proteins for Therapeutic, Diagnostic and Biotechnological Applications. *FEBS Letters* **2010**, *584*, 2670–2680, doi:10.1016/j.febslet.2010.04.014.
90. Tolmachev, V.; Orlova, A.; Nilsson, F.Y.; Feldwisch, J.; Wennborg, A.; Abrahmsén, L. Affibody Molecules: Potential for in Vivo Imaging of Molecular Targets for Cancer Therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2007**, *7*, 555–568, doi:10.1517/14712598.7.4.555.
91. Penny, S.M. Ovarian Cancer: An Overview. *Radiol Technol* **2020**, *91*, 561–575.
92. Huang, L.; Yang, Y.; Yang, F.; Liu, S.; Zhu, Z.; Lei, Z.; Guo, J. Functions of EpCAM in Physiological Processes and Diseases (Review). *Int J Mol Med* **2018**, *42*, 1771–1785, doi:10.3892/ijmm.2018.3764.
93. Lopus, M. Antibody-DM1 Conjugates as Cancer Therapeutics. *Cancer Lett* **2011**, *307*, 113–118, doi:10.1016/j.canlet.2011.03.017.
94. Tan, H.; Su, W.; Zhang, W.; Zhang, J.; Sattler, M.; Zou, P. Albumin-Binding Domain Extends Half-Life of Glucagon-like Peptide-1. *Eur J Pharmacol* **2021**, *890*, 173650, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173650.
95. Garousi, J.; Ding, H.; von Witting, E.; Xu, T.; Vorobyeva, A.; Oroujeni, M.; Orlova, A.; Hober, S.; Gräslund, T.; Tolmachev, V. Targeting HER2 Expressing Tumors with a Potent Drug Conjugate Based on an Albumin Binding Domain-Derived Affinity Protein. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1847, doi:10.3390/pharmaceutics13111847.
96. Garousi, J.; Xu, T.; Liu, Y.; Vorontsova, O.; Hober, S.; Orlova, A.; Tolmachev, V.; Gräslund, T.; Vorobyeva, A. Experimental HER2-Targeted Therapy Using ADAPT6-ABD-mcDM1 in Mice Bearing SKOV3 Ovarian Cancer Xenografts: Efficacy and Selection of Companion Imaging Counterpart. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1612, doi:10.3390/pharmaceutics14081612.
97. Altai, M.; Liu, H.; Ding, H.; Mitran, B.; Edqvist, P.-H.; Tolmachev, V.; Orlova, A.; Gräslund, T. Affibody-Derived Drug Conjugates: Potent Cytotoxic Molecules for Treatment of HER2 over-Expressing Tumors. *J Control Release* **2018**, *288*, 84–95, doi:10.1016/j.jconrel.2018.08.040.

98. Bragina, O.D.; Deyev, S.M.; Chernov, V.I.; Tolmachev, V.M. The Evolution of Targeted Radionuclide Diagnosis of HER2-Positive Breast Cancer. *Acta Naturae* **2022**, *14*, 4–15, doi:10.32607/actanaturae.11611.
99. Luo, R.; Liu, H.; Cheng, Z. Protein Scaffolds: Antibody Alternatives for Cancer Diagnosis and Therapy. *RSC Chemical Biology* **2022**, *3*, 830–847, doi:10.1039/D2CB00094F.
100. Laforest, R.; Lapi, S.E.; Oyama, R.; Bose, R.; Tabchy, A.; Marquez-Nostra, B.V.; Burkemper, J.; Wright, B.D.; Frye, J.; Frye, S.; et al. [89Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Imaging Biol* **2016**, *18*, 952–959, doi:10.1007/s11307-016-0951-z.
101. Manafi-Farid, R.; Ataeinia, B.; Ranjbar, S.; Jamshidi Araghi, Z.; Moradi, M.M.; Pirich, C.; Beheshti, M. ImmunoPET: Antibody-Based PET Imaging in Solid Tumors. *Front. Med.* **2022**, *9*, doi:10.3389/fmed.2022.916693.
102. Yeh, R.; O'Donoghue, J.A.; Jayaprakasam, V.S.; Mauguen, A.; Min, R.; Park, S.; Brockway, J.P.; Bromberg, J.F.; Zhi, W.I.; Robson, M.E.; et al. First-in-Human Evaluation of Site-Specifically Labeled 89Zr-Pertuzumab in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2024**, *65*, 386–393, doi:10.2967/jnumed.123.266392.
103. Ducharme, M.; Hall, L.; Eckenroad, W.; Cingoranelli, S.J.; Houson, H.A.; Jaskowski, L.; Hunter, C.; Larimer, B.M.; Lapi, S.E. Evaluation of [89Zr]Zr-DFO-2Rs15d Nanobody for Imaging of HER2-Positive Breast Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2023**, *20*, 4629–4639, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00360.
104. Rinne, S.S.; Leitao, C.D.; Abouzayed, A.; Vorobyeva, A.; Tolmachev, V.; Ståhl, S.; Löfblom, J.; Orlova, A. HER3 PET Imaging: 68Ga-Labeled Affibody Molecules Provide Superior HER3 Contrast to 89Zr-Labeled Antibody and Antibody-Fragment-Based Tracers. *Cancers* **2021**, *13*, 4791, doi:10.3390/cancers13194791.
105. Raavé, R.; Sandker, G.; Adumeau, P.; Jacobsen, C.B.; Mangin, F.; Meyer, M.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Da Costa, L.; Dubois, A.; et al. Direct Comparison of the in Vitro and in Vivo Stability of DFO, DFO* and DFOcyclo* for 89Zr-immunoPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, *46*, 1966–1977, doi:10.1007/s00259-019-04343-2.
106. Heskamp, S.; Raavé, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V.; Denat, F. 89Zr-Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art 89Zr Radiochemistry. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2211–2223, doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00325.
107. Straightforward Synthesis of DFO* - An Octadentate Chelator for Zirconium-89 - Guarrochena - 2024 - ChemMedChem - Wiley Online Library Available online: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202300495> (accessed on 4 May 2026).
108. Gao, W.; Yang, X.; Li, Q.; Liu, Y.; Huang, W.; Xia, X.; Yan, D. Covalent Affibody-Molecular Glue Drug Conjugate Nanoagent for Proximity-Enabled Reactive Therapeutics. *Advanced Science* **2025**, *12*, 2412273, doi:10.1002/advs.202412273.
109. Lee, A.V.; Oesterreich, S.; Davidson, N.E. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *J Natl Cancer Inst* **2015**, *107*, djv073, doi:10.1093/jnci/djv073.
110. Kim, Y.G.; Yoon, Y.N.; Choi, H.S.; Kim, J.-H.; Seol, H.; Lee, J.K.; Seong, M.-K.; Park, I.C.; Kim, K.I.; Kim, H.-A.; et al. Breast Cancer Stem Cells in HER2negative Breast Cancer Cells Contribute to HER2mediated Radioresistance and Molecular Subtype Conversion: Clinical Implications for Serum HER2 in Recurrent HER2negative Breast Cancer. *Oncotarget* **2017**, *9*, 5811–5822, doi:10.18632/oncotarget.23528.
111. Stanzione, F.; Giangreco, I.; Cole, J.C. Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery. *Prog Med Chem* **2021**, *60*, 273–343, doi:10.1016/bs.pmch.2021.01.004.

112. Huang, S.-Y.; Grinter, S.Z.; Zou, X. Scoring Functions and Their Evaluation Methods for Protein-Ligand Docking: Recent Advances and Future Directions. *Phys Chem Chem Phys* **2010**, *12*, 12899–12908, doi:10.1039/c0cp00151a.
113. Li, J.; Fu, A.; Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci* **2019**, *11*, 320–328, doi:10.1007/s12539-019-00327-w.
114. Guedes, I.A.; de Magalhães, C.S.; Dardenne, L.E. Receptor-Ligand Molecular Docking. *Biophys Rev* **2014**, *6*, 75–87, doi:10.1007/s12551-013-0130-2.
115. Pantsar, T.; Poso, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules* **2018**, *23*, 1899, doi:10.3390/molecules23081899.
116. Obata, H.; Ogawa, M.; Zalutsky, M.R. DNA Repair Inhibitors: Potential Targets and Partners for Targeted Radionuclide Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1926, doi:10.3390/pharmaceutics15071926.
117. Wang, T.; Kyle, A.H.; Baker, J.H.E.; Liu, N.A.; Banáth, J.P.; Teymori, S.; Minchinton, A.I. DNA-PK Inhibitor AZD7648 Is a More Potent Radiosensitizer than PARP Inhibitor Olaparib in BRCA1/2 Deficient Tumors. *DNA Repair (Amst)* **2024**, *139*, 103689, doi:10.1016/j.dnarep.2024.103689.
118. Agarwal, V.; McShan, A.C. The Power and Pitfalls of AlphaFold2 for Structure Prediction beyond Rigid Globular Proteins. *Nat Chem Biol* **2024**, *20*, 950–959, doi:10.1038/s41589-024-01638-w.
119. Alhumaid, N.K.; Tawfik, E.A. Reliability of AlphaFold2 Models in Virtual Drug Screening: A Focus on Selected Class A GPCRs. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25*, doi:10.3390/ijms251810139.
120. Baselious, F.; Hilscher, S.; Robaa, D.; Barinka, C.; Schutkowski, M.; Sippl, W. Comparative Structure-Based Virtual Screening Utilizing Optimized AlphaFold Model Identifies Selective HDAC11 Inhibitor. *Int J Mol Sci* **2024**, *25*, 1358, doi:10.3390/ijms25021358.
121. Lee, K.J.; Mann, E.; Wright, G.; Pieltz, C.G.; Nagel, Z.D.; Gassman, N.R. Exploiting DNA Repair Defects in Triple Negative Breast Cancer to Improve Cell Killing. *Ther Adv Med Oncol* **2020**, *12*, 1758835920958354, doi:10.1177/1758835920958354.
122. Penninckx, S.; Pariset, E.; Cekanaviciute, E.; Costes, S.V. Quantification of Radiation-Induced DNA Double Strand Break Repair Foci to Evaluate and Predict Biological Responses to Ionizing Radiation. *NAR Cancer* **2021**, *3*, zcab046, doi:10.1093/narcan/zcab046.
123. Banáth, J.P.; Klokov, D.; MacPhail, S.H.; Banuelos, C.A.; Olive, P.L. Residual γ H2AX Foci as an Indication of Lethal DNA Lesions. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 4, doi:10.1186/1471-2407-10-4.
124. Takano, S.; Shibamoto, Y.; Wang, Z.; Kondo, T.; Hashimoto, S.; Kawai, T.; Hiwatashi, A. Optimal Timing of a γ H2AX Analysis to Predict Cellular Lethal Damage in Cultured Tumor Cell Lines after Exposure to Diagnostic and Therapeutic Radiation Doses. *J Radiat Res* **2023**, *64*, 317–327, doi:10.1093/jrr/rrac096.
125. Ghardi, M.; Moreels, M.; Chatelain, B.; Chatelain, C.; Baatout, S. Radiation-Induced Double Strand Breaks and Subsequent Apoptotic DNA Fragmentation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Int J Mol Med* **2012**, *29*, 769–780, doi:10.3892/ijmm.2012.907.
126. Brunner, S.; Varga, D.; Bozó, R.; Polanek, R.; Tóké, T.; Szabó, E.R.; Molnár, R.; Gémes, N.; Szébeni, G.J.; Puskás, L.G.; et al. Analysis of Ionizing Radiation Induced DNA Damage by Superresolution dSTORM Microscopy. *Pathol. Oncol. Res.* **2021**, *27*, 1609971, doi:10.3389/pore.2021.1609971.
127. Urushihara, Y.; Kobayashi, J.; Matsumoto, Y.; Komatsu, K.; Oda, S.; Mitani, H. DNA-PK Inhibition Causes a Low Level of H2AX Phosphorylation and Homologous Recombination Repair in Medaka (*Oryzias Latipes*) Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *429*, 131–136, doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.128.
128. Hain, K.O.; Colin, D.J.; Rastogi, S.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. Prolonged Mitotic Arrest Induces a Caspase-Dependent DNA Damage Response at Telomeres That Determines Cell Survival. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26766, doi:10.1038/srep26766.

129. Jaiswal, M.; Anuradha, G.; Rajeswari, N.; Ahuja, Y.R. Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): Its Importance in Human Biology. *Int. J. Anthropol.* **1995**, *10*, 177–181, doi:10.1007/BF02447874.
130. Olive, P.L.; Banáth, J.P. The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 23–29, doi:10.1038/nprot.2006.5.

Literatură Științifică Publicată

1. Serban RM, Niculae D, Manda G, Neagoe I, Dobre M, **Niculae DA**, Temelie M, Mustăciosu C, Leonte RA, Chilug LE, Cornoiu MR, Cocioabă D, Stan M, Dinischiotu A. Modifications in cellular viability, DNA damage and stress responses inflicted in cancer cells by copper-64 ions. Front Med (Lausanne). 2023 Jun 21;10:1197846, ISI IF 3.0 Q1, Introduction (10-41)
doi.org/10.3389/fmed.2023.1197846
2. Tudoroiu-Cornoiu, M.-R.; Șerban, R.M.; Cocioabă, D.*; **Niculae, D.A.***; Drăgănescu, D.; Leonte, R.; Ion, A.C.; Niculae, D. 89Zr-Radiolabelling of p-NCS-Bz-DFO-Anti-HER2 Affibody Immunoconjugate: Characterization and Assessment of In Vitro Potential in HER2-Positive Breast Cancer Imaging. Pharmaceutics 2025, 17, 739, ISI IF: 5.5, Q1, Introduction, Chapter 4 (10-41; 69-76)
doi.org/10.3390/pharmaceutics17060739
3. **Niculae, D.A.**; Șerban, R.M.*; Niculae, D.*; Drăgănescu, D. Impeding the NHEJ Pathway for Overcoming Radioresistance in the Context of Precision Radiotherapy of Cancer. Pharmaceutics 2026, 18, 131, ISI IF: 5.5, Q1, Introduction, Chapter 6 (10-41; 96-108)
doi.org/10.3390/pharmaceutics18010131
4. **Niculae, D.A.**; Crișu, F.V.G.; Stoian, S.; Ion, G.N.D.*; Drăgănescu, D.; Inhibiting NHEJ: An in-silico approach of stratifying DNA-PK inhibitors, predicting radio-halogenation potential of DNA-PK inhibitors and assessing AlphaFold2 prediction accuracy. Bioengineering 2026, 13, 571., IF: 3.7, Q1, Introduction, Chapter 5 (10-41; 76-96)
doi.org/10.3390/bioengineering13050571
5. **Niculae, D.A.**; Serban, R.M.; Niculae D.*; Draganescu, D.; The Radiosensitizing Potential of CC-115, PIK-75 and M3814 DNA-PK Inhibitors for Breast Cancer Targeted Radiotherapy. International Journal of Molecular Sciences 2026 For Publishing, IF: 4.9, Q1, Introduction, Chapter 6 (10-41; 96-108)
doi.org/10.20944/preprints202605.0803.v1

Comunicări Științifice:

1. “DARPin-Drug Conjugates Targeting EpCAM for Ovarian Cancer Treatment” – Thesis Oral Presentation; Uppsala University, Uppsala, Sweden 2023;
2. “Modifications in Cellular Viability, DNA Damage and Stress Responses Inflicted in Cancer Cells by Copper-64 Ions” – Poster Presentation; ISI NucMed – Arronax, Nantes, France 2023;
3. “Radiopharmaceuticals Research Centre” – Oral Presentation; Joint IAEA-USA International School on Peaceful Uses of Nuclear Applications-Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA 2024;
4. “Investigations on Stress Responses and DNA Damage Inflicted in Cancer Cells by Copper-64 Ions” – Oral Presentation; Tumour targeting, Imaging, RadiotherapieS Workshop – Canceropole, Erquy, France 2024;
5. “Emergent medical radioisotopes produced at Radiopharmaceutical Research Centre of IFIN-HH” – Poster Presentation; SRMNIM, Suceava, Romania 2025;
6. “Radiolabeling of anti-HER2 Affibody with Zirconium-89 for PET Imaging in HER2-Positive Breast Cancer” – Poster Presentation; iSRS, Gold Coast, Queensland, Australia 2025;

7. “Exploratory Investigations on Genotoxicity and Stress Responses Inflicted in Colorectal Cancer Cells by Cu-64/67 Therapeutic Radioisotopes” – Poster Presentation; TWC, Cape Town, South Africa 2026;
8. “Preliminary Analysis of NHEJ DNA Repair Pathway Inhibitors in Breast Cancer Cell Lines” – Poster Presentation; ESRR, Bergen, Norway 2026;
9. “Preclinical Use of DNA-PK Inhibitors as Radiosensitizing Agents for Breast Cancer” – Oral Presentation; SRMNIM, Bucharest, Romania 2026;