



РАЗРАБОТКА КОНЬЮГАТА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ GD2, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А. А. Романова¹, В. С. Фёдоров^{1,2}, Р. Б. Тагаева²,
А. О. Косогорнова¹, А. С. Мазур³, Н. М. Юдинцева², Л. Ю. Яковлева²,
Д. Е. Бобков², М. А. Шевцов²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный Технологический Институт (Технический Университет), Санкт-Петербург,

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург,

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Ресурсный центр «Магнитно-резонансные методы исследования», Санкт-Петербург, Петергоф

РЕЗЮМЕ. В опухолях нейроэктодермального происхождения наблюдается высокий уровень экспрессии дисialogанглиозида GD2, в то время как в нормальных тканях уровень его экспрессии существенно ниже, что делает GD2 перспективной мишенью для диагностики злокачественных новообразований.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: синтезировать и охарактеризовать физико-химические свойства лабораторного образца anti-GD2-mAbs@SPIONs, приготовленного на основе суперпарамагнитных наночастиц, и предназначенного для диагностики злокачественных новообразований опухолей головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Покрытые карбоксиметил-декстраном суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)), были синтезированы с использованием метода ко-преципитации в водной среде. Затем они были конъюгированы с антителами против GD2, мечеными флуоресцентным красителем (флуоресцеин-5-малеимид). Далее конъюгат anti-GD2-mAbs@SPIONs был очищен с помощью диализа.

Концентрацию железа, покрытия (карбоксиметил-декстран) и белка (антитела против GD2) в полученной наносuspension измеряли с помощью тиоцианатного метода, с помощью количественной оценки реакции полимера с антроновым реактивом и по методу Бредфорда, соответственно. С применением динамического светорассеяния были получены данные о поверхностном заряде конъюгата, установлен их гидродинамический размер и характер дисперсности. Анализ МР-контрастирующих свойств проводили с использованием метода МРТ фантомного образца на ЯМР-спектрометре.

Взаимодействие конъюгата anti-GD2-mAbs@SPIONs с клетками линии U251 (глиобластома человека) регистрировали с помощью конфокальной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Синтезирован и охарактеризован с использованием физико-химических методов лабораторный образец суперпарамагнитных наночастиц anti-GD2-mAbs@SPIONs, распознающий дисialogанглиозид GD2 на поверхности мембраны раковых клеток. Было показано специфичное накопление препарата в клетках глиобластомы по сравнению с наночастицами, неконъюгированными с антителами против GD2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Специфичность накопления магнитного конъюгата в опухолевых клетках даёт надежду на возможность использования anti-GD2-mAbs@SPIONs в диагностике злокачественных новообразований ЦНС, однако необходимы дальнейшие исследования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дисialogанглиозид GD2, опухоль головного мозга, глиобластома, конъюгат

Для цитирования: Романова А. А., Фёдоров В. С., Тагаева Р. Б., Косогорнова А. О., Мазур А. С., Юдинцева Н. М., Яковлева Л. Ю., Бобков Д. Е., Шевцов М. А. Разработка конъюгата магнитных наночастиц с антителами против GD2, предназначенного для диагностики опухолей головного мозга Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2022;14(2):128–132

DEVELOPMENT OF A CONJUGATE OF MAGNETIC NANOPARTICLES WITH ANTIBODIES AGAINST GD2, DESIGNED FOR THE DIAGNOSTICS OF BRAIN TUMORS

A. A. Romanova¹, V. S. Fedorov^{1,2}, R. B. Tagaeva², A. O. Kosogornova¹, A. S. Mazur³, N. M. Yudintceva²,
L. Y. Yakovleva², D. E. Bobkov², M. A. Shevtsov²

¹ Saint Petersburg State Institute of Technology, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

SUMMARY. In tumors of neuroectodermal origin, a high level of expression of disialoganglioside GD2 is observed, while in normal tissues its expression level is significantly lower, which makes GD2 a promising target for the diagnostics of malignant neoplasms.

PURPOSE OF THE STUDY: was to synthesize and characterize the physicochemical properties of a laboratory sample of antiGD2-mAbs@SPIONs, prepared on the basis of superparamagnetic nanoparticles, and intended for the diagnostics of malignant neoplasms of brain tumors.

MATERIALS AND METHODS: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) coated with carboxymethyl-dextran were synthesized using the method of co-precipitation in an aqueous medium. They were then conjugated with antibodies against GD2 labeled with a fluorescent dye (fluorescein-5-maleimide). Next, the anti-GD2-mAbs@SPIONs conjugate was purified by dialysis.

The concentration of iron, coating (carboxymethyl-dextran) and protein (antibodies against GD2) in the resulting nanosuspension was measured using the thiocyanate method, by quantifying the reaction of the polymer with an antron reagent and by the Bradford method, respectively. Using dynamic light scattering, data on the surface charge of conjugates were obtained, their hydrodynamic size and the nature of dispersion were established. The analysis of MR-contrasting properties was carried out using the MRI method of a phantom sample on an NMR spectrometer.

The interaction of the anti-GD2-mAbs@SPIONs conjugate with cells of the U251 line (human glioblastoma) was recorded using confocal microscopy.

RESULTS. A laboratory sample of superparamagnetic nanoparticles anti-GD2-mAbs@SPIONs recognizing disialoganglioside GD2 on the membrane surface of cancer cells was synthesized and characterized using physicochemical methods. A specific accumulation of the drug in glioblastoma cells has been shown in comparison with unconjugated nanoparticles.

CONCLUSION. The specificity of the accumulation of magnetic conjugate in tumor cells gives hope for the possibility of using anti-GD2-mAbs@SPIONs in the diagnostics of malignant neoplasms of the central nervous system, however, further research is needed.

KEY WORDS: disialoganglioside GD2, brain tumor, glioblastoma, conjugate

For citation: Romanova A. A., Fedorov V. S., Tagaeva R. B., Kosogornova A. O., Mazur A. S., Yudintceva N. M., Yakovleva L. Y., Bobkov D. E., Shevtsov M. A. Development of a conjugate of magnetic nanoparticles with antibodies against GD2, designed for the diagnostics of brain tumors. Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova. 2022;14(2):128–132

Введение. Глиобластома является наиболее распространенной злокачественной первичной опухолью головного мозга у взрослых, на которую приходится 57 % всех глиом и 48 % всех первичных злокачественных опухолей центральной нервной системы [1]. Несмотря на комплексное лечение мультиформной глиобластомы, включающее в себя хирургическое удаление новообразования с последующими курсами лучевой и химиотерапии, медиана общей выживаемости не превышает 15 месяцев [2]. Одно из перспективных направлений в диагностике глиобластомы может быть основано на использовании суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (SPIONs), которые в настоящее время широко применяются в биомедицине для магнитной сепарации, в качестве биосенсоров, контрастеров для магнитно-резонансной томографии (МРТ), для управляемой локальной гипертермии опухолей, целевой доставки препаратов и т.д. [3,4]. В качестве МР-контрастных веществ используют, например, ферумоксиды и ферукарботран. Ферумоксиды (Feridex, Endorem обо-

значаются AMI-25) представляют собой суперпарамагнитные наночастицы оксида железа с покрытием из низкомолекулярного декстрана с размером частиц от 120 до 180 нм и коэффициентом релаксивности r_2 298,3 мМ⁻¹с⁻¹. Ферукарботран (Resovist обозначается SHU555A) представляет собой суперпарамагнитные наночастицы оксида железа с покрытием из карбоксиметил-декстрана с размером частиц от 40 до 60 нм и коэффициентом релаксивности r_2 составляющим 151,0 мМ⁻¹с⁻¹ [5,6,7]. Концентрации железа в Feridex составляет 11,2 мг/мл, Resovist — 28,0 мг/мл [7].

Ганглиозиды, такие как GM3, GM2, GM1 и GD1, экспрессируются во многих нормальных тканях человека. Один из примеров — ганглиозид GM3, в избытке присутствующий почти во всех здоровых тканях. Антиген GD2 представляет собой дисialogанглиозид, сверхэкспрессируемый в опухолях нейроэктодермального происхождения, в то время как в нормальных тканях экспрессия сильно ограничена, в основном, центральной нервной системой, периферическими чувствительными нервными волокнами,

кожными меланоцитами, лимфоцитами и мезенхимальными стволовыми клетками [8,9].

Хотя дисиалоганглиозид GD2, по-видимому, участвует в передаче сигналов клетками, его функция в нормальной клеточной физиологии до конца не выяснена. Однако при злокачественных новообразованиях дисиалоганглиозид GD2 способствует усилению пролиферации опухолевых клеток, подвижности, миграции, адгезии и инвазии, в зависимости от типа опухоли, и придает ей устойчивость к апоптозу. Дисиалоганглиозид GD2 важен для выживания раковых клеток и обладает иммуносупрессивными свойствами, подавляя активацию Т-клеток и созревание дендритных клеток [8,9].

В 2015 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило использование препарата динутуксимаб — моноклональные антитела против GD2 (mAb) для лечения нейробластомы высокого риска, после успешного завершения клинического испытания (COG ANBL0931) безопасности и токсичности иммунотерапии у пациентов с нейробластомой высокого риска в 2014 году. Это ознаменовало появление первого небелкового гликофинголипида в качестве мишени для иммунотерапии, тем самым расширив возможности для использования потенциальных фармацевтических мишеней [8].

Цель. Синтезировать и охарактеризовать с использованием физико-химических методов лабораторный образец суперпарамагнитных наночастиц anti-GD2-mAbs@SPIONs, распознающих дисиалоганглиозид GD2 на поверхности мембраны раковых клеток для диагностики злокачественных новообразований опухолей головного мозга.

Материалы и методы: Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPIONs), покрытые карбоксиметил-декстраном, были получены в водной среде по методу ко-преципитации из прекурсора солей железа под инертной атмосферой. На карбоксильные группы покрытия с помощью СМС-карбодиимида были присоединены аминогруппы гуманизированного анти-GD2 антитела, меченого флуоресцентным красителем (флуоресцеин-5-малеимид) [10].

Очистку конъюгата от непрореагировавшего красителя проводили с применением метода диализа.

Концентрацию железа в полученной наносуспении измеряли с помощью тиоцианатного метода на спектрофотометре при длине волны 575 нм; концентрацию белка — по колориметрическому методу Бредфорда, карбоксиметил-декстрана — с использованием количественной реакции полимера с антроновым реактивом. С применением метода динамического светорассеяния Zetasizer Pro (Malvern Instruments, Великобритания) были получены данные о поверхностном заряде наночастиц, установлен их гидродинамический размер и характер дисперсности. Анализ МР-контрастирующих свойств проводили с использованием фантомного образца методом МРТ. Фантомные образцы представляют собой

суспензию наночастиц в фиксирующем материале (2 %-ый гель агар-агар). Т1- и Т2-взвешенные изображения фантомного образца были получены в режиме сканирования RARE-T1+T2 при рабочей частоте 400 МГц на 1 Н на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 400 (Bruker, Германия).

Оценку взаимодействия препарата anti-GD2-mAbs@SPIONs с клеточной линией глиобластомы человека U251 регистрировали с помощью конфокальной микроскопии. Суспензию клеток линии U251 использовали для формирования сфероидов по методу висячей капли [11]. Инкубацию с препаратом anti-GD2-mAbs@SPIONs (концентрация по железу 150 мкг/мл) проводили в течение суток, после чего сфероиды фиксировали 4 %-ым раствором формальдегида, ядра окрашивали флуоресцентным красителем ДНК 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI).

Результаты. В полученном лабораторном образце магнитного конъюгата концентрация железа составила $5,32 \pm 0,83$ мг/мл, концентрация белка — $36,47 \pm 0,62$ мкг/мл, концентрация карбоксиметил-декстрана — $40,50 \pm 0,56$ мкг/мл. Наличие белка в пробе свидетельствовало об успешной конъюгации антител с наночастицами, при этом ёмкость составила 6,86 мкг антитела на 1 мг железа. Гидродинамический размер не конъюгированных с антителами (контрольных частиц) SPIONs составил $135,50 \pm 3,70$ нм. Функционализация поверхности наночастиц приводила к увеличению размера до $163,30 \pm 5,31$ нм, дзета-потенциал также изменялся при присоединении антител с — $34,28 \pm 5,53$ мВ в контроле, до — $28,95 \pm 0,41$ мВ в магнитном конъюгате. Индекс полидисперсности был равен $0,15 \pm 0,03$ у неконъюгированных наночастиц и $0,15 \pm 0,02$ у конъюгата. Полученный размер и дисперсность соответствовали требованиям, предъявляемым к наноносителям, а заряд поверхности обеспечивал агрегационную стабильность препарата. Наличие магнитофореза подтвердило магнитные свойства полученного образца anti-GD2-mAbs@SPIONs. При проведении ЯМР-спектрометрии присутствие конъюгата anti-GD2-mAbs@SPIONs снижало время Т2 релаксации протонов окружающего материала до $12,24 \pm 0,18$ мс, по сравнению со значением $52,63 \pm 0,18$ для фиксирующего материала без суспении наночастиц. Коэффициент релаксивности r_2 конъюгата anti-GD2-mAbs@SPIONs составил $163,4 \pm 8,2$ мМ⁻¹с⁻¹, а отношение Т1/Т2—153,98, что свидетельствовало о суперпарамагнитной природе наночастиц.

По сравнению с одобренными для клинического применения препаратами, коэффициент релаксивности полученного образца оказался выше.

Результаты, полученные после проведения конфокальной микроскопии сфероидов U251, инкубированных с препаратом anti-GD2-mAbs@SPIONs представлены на рисунке 1. Было показано его специфическое накопление клетках глиобластомы по сравнению с наночастицами, неконъюгированными с антителами.

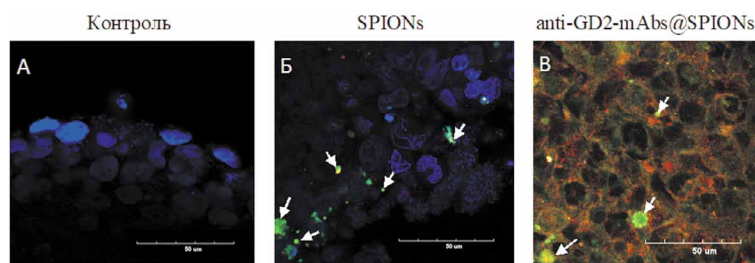


Рисунок 1. Конфокальная микроскопия сфероидов клеток глиобластомы человека U251, инкубированных с препаратом anti-GD2-mAbs@SPIONs.

(А) Сфероид клеток глиобластомы U251; (Б) Сфероид U251 после инкубации с неконъюгированными SPIONs в течение 24 часов; (В) Сфероид U251 после инкубации с препаратом anti-GD2-mAbs@SPIONs (красный) в течение 24 часов. Ядра окрашены DAPI (синий). Наночастицы детектировали с помощью отражающего лазерного сканирования (зелёный). Белыми стрелками указаны агрегаты наночастиц. Шкала, 50 мкм.

Figure 1. Confocal microscopy of U251 human glioblastoma cells spheroids incubated with anti-GD2-mAbs@SPIONs.

(A) U251 glioblastoma cells spheroid; (B) Spheroid following co-incubation with unconjugated SPIONs for 24 hours; (C) Spheroid following co-incubation with anti-GD2-mAbs@SPIONs (red) for 24 hours. Nuclei were stained with DAPI (blue). Nanoparticles were detected using reflective laser scanning (green). The white arrows indicate the aggregates of nanoparticles. Scale, 50 µm.

Заключение.

В результате проведённых исследований был получен и охарактеризован с привлечением современных физико-химических методов лабораторный образец суперпарамагнитных наночастиц anti-GD2-mAbs@SPIONs, распознающий дисialogанглиозид GD2 на поверхности мембраны раковых клеток глиобластомы. Специфичность накопления магнитного конъюгата в опухолевых клетках предполагает возможность использования anti-GD2-mAbs@SPIONs для диагностики злокачественных новообразований ЦНС, однако необходимы дальнейшие исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-58-55001. **Financing.** The work was carried out with the financial support of the RFBR grant № 19-58-55001.

ORCID авторов / ORCID of authors:

Романова Анастасия Алексеевна /

Romanova Anastasia Alekseevna

<https://orcid.org/0000-0002-5196-3427>

Федоров Вячеслав Сергеевич /

Fedorov Vyacheslav Sergeevich

<https://orcid.org/0000-0002-0239-7473>

Тагаева Руслана Батыровна / Tagaeva Ruslana Batyrovna

<https://orcid.org/0000-0001-8347-7274>

Козогорнова Анна Олеговна / Kosogornova Anna Olegovna

<https://orcid.org/0000-0001-6425-6142>

Мазур Антон Станиславович / Mazur Anton Stanislavovich

<https://orcid.org/0000-0002-2746-6762>

Юдинцева Наталья Михайловна /

Yudinetsva Natalia Mikhailovna

<https://orcid.org/0000-0002-7357-1571>

Яковлева Людмила Юрьевна / Yakovleva Ludmila Yurievna

<https://orcid.org/0000-0001-6151-3617>

Бобков Данила Евгеньевич / Bobkov Danila Evhenjevich

<https://orcid.org/0000-0002-0358-9266>

Шевцов Максим Алексеевич / Shevtsov Maxim Alekseevich

<https://orcid.org/0000-0002-8539-2239>

Литература/References

- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 2018;20(4):1–86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>
- Stupp, R., Hegi, M., Mason, W., van den Bent, M., Taphoorn, M., Janzer, R., Ludwin, S., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. and Mirimanoff, R. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 2009;10(5):459–466. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70025-7)
- Shasha, C., & Krishnan, K. M. (2020). Nonequilibrium Dynamics of Magnetic Nanoparticles with Applications in Biomedicine. *Advanced Materials*. 2020;33(23):1904131. <https://doi.org/10.1002/adma.201904131>
- Shevtsov, M. & Multhoff, G., 2016. Recent Developments of Magnetic Nanoparticles for Diagnostics of Brain Tumor. *Current Drug Metabolism*. 2016;17(8):737–744. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00492>
- Никитин А. А., Храмов М. А., Савченко А. Г., Абакумов М. А., Мажуга А. Г. Синтез и контрастные свойства анизотроных

- железооксидных наночастиц для МРТ диагностики. Химико-фармацевтический журнал. 2018;52(3):36–40. [Nikitin A. A., Khramtsov M. A., Savchenko A. G., Abakumov M. A., Mazhuga A. G. Synthesis and contrast properties of anisotropic iron oxide nanoparticles for MRI diagnostics. Chemical and Pharmaceutical journal. 2018;52(3):36–40 (In Russ.).] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-3-36-40>
6. Wang Y. X., Hussain S. M., Krestin G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*. 2001;11(11):2319–31. <https://doi.org/10.1007/s003300100908>
7. Wang Y. X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2011;1:35–40. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03>
8. Yu J, Hung JT, Wang SH, Cheng JY, Yu AL. Targeting glycosphingolipids for cancer immunotherapy. *FEBS Letters*. 2020;594(22):3602–2618. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13917>
9. Nazha B., Inal C., Owonikoko T. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(1000):1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01000>
10. Shevtsov, M. A., Nikolaev, B. P., Yakovleva, L. Y., Marchenko, Y. Y., Mikhrina, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Dobrodumov, A. V., Ischenko, A. M. and Yakovenko, I. V. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain tumors. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9(1):273–287. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55118>
11. Del Duca, D., Werbowetski, T., & Del Maestro, R. F. Spheroid Preparation from Hanging Drops: Characterization of a Model of Brain Tumor Invasion. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004;67(3):295–303. <https://doi.org/10.1023/b:neon.0000024220.070>