

NANOLuc/h-ЦЕЛЕНТЕРАЗИН: ЭФФЕКТИВНАЯ ПАРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Беловежец Т.Н.^{1,2}, Гладких Д.В.³, Омельченко В. О.⁴, Волкова О.Ю.², Таранин А.В.², Кулемзин С.В.^{5*}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197341, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

⁴НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», 630117, г. Новосибирск, Российская Федерация

⁵ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Биолюминесцентное мечение опухолевых клеток становится стандартом при проведении доклинических исследований новых противораковых препаратов. Несмотря на разнообразие люцифераз, многие из них не подходят для прижизненной визуализации.

Цель: сравнить различные субстраты NanoLuc *in vitro*, а также показать возможность использования пары Nluc/h-целентеразин для прижизненной визуализации диссеминированных опухолевых клеток с помощью системы IVIS Spectrum.

Материалы и методы. Получение целевой клеточной линии и Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (Chimeric antigen receptor, CAR), осуществляли методом лентивирусной трансдукции клеток, измерение люминесценции производили планшетным люминометром «Luminoskan™ Microplate Luminometer», для *in vivo* визуализации в экспериментальной модели CAR Т-клеточной терапии на мышах линии NSG использовалась система прижизненной визуализации IVIS Spectrum.

Результаты. Проведено сравнение различных субстратов в тестах *in vitro* по сопоставлению яркости и стабильности люминесценции, а также показана возможность использования h-целентеразина в паре с люциферазой Nluc для прижизненной визуализации клеток в мышах. Получена генетически модифицированная клеточная линия Nalm6-Nluc-copGFP.

Заключение. Полученные результаты сравнения различных субстратов для люциферазы Nluc в тестах *in vitro* и *in vivo* позволили определить оптимальную пару фермент/субстрат, которая может быть востребована в качестве инструмента для исследований эффективности, безопасности и токсичности соединений и клеточных продуктов, разрабатываемых для противоопухолевой терапии. Плазмидная конструкция, кодирующая Nluc, может быть использована для модификации других клеточных линий, необходимых для разработки и характеристики новых генно-терапевтических подходов.

Ключевые слова: CAR Т-клеточная терапия, биолюминесценция, доклинические исследования, фуримазин, h-целентеразин, нативный целентеразин, люцифераза NanoLuc

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН Горчакову Андрею Александровичу и Гусельникову Сергею Владимировичу за помощь в работе над публикацией.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФНИ FWNR-2025-0014 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Для цитирования: Беловежец Т.Н., Гладких Д.В., Омельченко В. О., Волкова О.Ю., Таранин А.В., Кулемзин С.В. NanoLuc/h-целентеразин: эффективная пара для детекции биолюминесценции *in vitro* и *in vivo*. Гематология и трансфузиология. 2025; 70(2):146–155. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2025-70-2-146-155>

NANOLuc/h-COELENTERAZINE: AN EFFICIENT PAIR FOR BIOLUMINESCENCE IMAGING *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Belovezhets T.N.^{1,2}, Gladkikh D.V.³, Omelchenko V.O.⁴, Volkova O.Y.², Taranin A.V.², Kulemzin S.V.^{5*}

¹ Almazov National Medical Research Centre, 197341, Saint Petersburg, Russian Federation

² Institute of Molecular and Cellular Biology of the SB RAS, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the SB RAS, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS, 630117, Novosibirsk, Russian Federation

⁵ Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Bioluminescent labeling of tumor cells is becoming the standard in preclinical studies of novel anti-cancer drugs. Despite the variety of luciferases, many are not suitable for *in vivo* imaging.

Aim: to compare different Nanolux substrates *in vitro* and demonstrate the feasibility of using the NLuc/h-coelenterazine pair for *in vivo* imaging of disseminated tumor cells using the IVIS Spectrum system.

Materials and methods. The target cell line and T-cells expressing chimeric antigen receptors (CAR) were obtained via lentiviral cell transduction. Luminescence was measured with a Luminoskan™ Microplate Luminometer, while *in vivo* imaging in an NSG mouse model of CAR T-cell therapy was performed using the IVIS Spectrum system.

Results. Various substrates were compared *in vitro* for luminescence brightness and stability.

Additionally, the use of h-coelenterazine in combination with NLuc luciferase was demonstrated for *in vivo* cell imaging in mice. A genetically modified Nalm6-NLuc-CopGFP cell line was successfully obtained.

Conclusion. The comparison of various NLuc substrates *in vitro* and *in vivo* identified an optimal enzyme/substrate pair, which can serve as a valuable tool for assessing efficacy, safety and toxicity of compounds and cellular products being developed for antitumor therapy. The plasmid encoding NLuc can also be used to modify other cell lines necessary for the development and characterization of new gene therapy approaches.

Keywords: CAR T therapy, bioluminescence imaging, preclinical study, furimazine, h-coelenterazine, native coelenterazine, NanoLuc luciferase

Acknowledgments. The authors would like to thank Andrey A. Gorchakov and Sergey V. Guselnikov, employees of the Laboratory of Immunogenetics of the Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, for their assistance in preparing this publication.

Conflict of Interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial disclosure. The work was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education as part of State Assignment FWNR-2025-0014 (Agreement No. 075-15-2022-301 dated 20.04/2022).

For citation: Belovezhets T.N., Gladkikh D.V., Omelchenko V.O., Volkova O.Y., Taranin A.V., Kulemzin S.V. Nanoluc/h-coelenterazine: an efficient pair for bioluminescence imaging *in vitro* and *in vivo*. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2025; 70(2):146–155 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2025-70-2-146-155>

Введение

Проведение доклинических исследований активности противоопухолевой терапии связано с необходимостью неинвазивно оценивать изменения опухолевой нагрузки у одного и того же животного в разное время. В контексте разработки клеточной иммунотерапии также желательно иметь надежные инструменты детекции вводимых терапевтических клеточных продуктов, а значит,

иметь возможность одновременной визуализации и опухолевых, и вводимых эффекторных клеток, поскольку одной лишь информации о динамике опухолевой нагрузки недостаточно для корректной и всесторонней интерпретации ответа на проводимую терапию [1–3].

Введение в клиническую практику терапии, основанной на адоптивном переносе Т-клеток, экспрессирующих

химерные антигенные рецепторы (Chimeric antigen receptor, CAR), для лечения больных различными заболеваниями В-клеточной природы, совершило революцию в иммуноонкологии [4, 5]. Значительные надежды возлагают на адаптацию этого подхода для терапии солидных опухолей и аутоиммунных заболеваний [6–8]. Соответственно корректное проведение доклинических исследований активности и безопасности CAR-клеточных продуктов является ключевым условием успеха этой развивающейся области молекулярной и клеточной медицины и призвано обеспечить минимизацию рисков для здоровья участвующих в таких испытаниях больных.

Самый простой вариант оценки *in vivo* активности CAR Т-клеточной терапии основан на предварительной генетической модификации клеток приживляемых опухолей для того, чтобы они были способны к флуоресценции либо люминесценции. На практике, однако, прижизненная детекция флуоресцентных белков в организме лабораторных животных достаточно затруднительна [9] и стандартом для проведения таких исследований является детекция биолуминесценции. В таком случае опухолевые клетки генетически модифицируют для стабильной экспрессии той или иной люциферазы, прививают мышам, после чего производят регулярное измерение интенсивности люминесценции, которая начинается сразу после введения соответствующего субстрата.

В арсенале исследователей есть целый ряд рекомбинантных вариантов люцифераз, которые в основном были получены из морских обитателей [10, 11]. Субстратами для таких ферментов являются целентеразин [12], варгулин [11] или их аналоги. Целентеразин часто используется для люцифераз Rluc (*Renilla reniformis*) и Gluc (*Gaussia princeps*) [13], при его окислении излучается свет с максимумом эмиссии в синей области (450–485 нм) видимого спектра. Для люциферазы Fluc (*Photinus pyralis*), широко используемой в исследованиях, требующих детекции биолуминесценции, субстратом является D-люциферин, а максимум эмиссии приходится на 565 нм видимого спектра [14, 15]. Распространенными рекомбинантными люциферазами для различных приложений также являются Mluc [16], полученная из *Metridia longa*, Cluc [17], полученная из *Cypridina noctiluca*, а также Vluc [18] и dDL [19]. Однако интенсивность люминесценции таких репортеров часто бывает недостаточной, особенно при необходимости детекции небольшого количества привитых клеток.

В 2012 г. была разработана уникальная фермент-субстратная пара (NanoLuc (=NLuc)/фуримазин) на основе мутированного варианта каталитической субъединицы люциферазы, исходно обнаруженной в глубоководной креветке *Oplophorus gracilirostris* [20]. Такая люцифераза обладает в 150 раз большей удельной активностью, чем широко используемые

люциферазы Fluc или Rluc [21]. Кроме того, NLuc обладает превосходной химической устойчивостью и термостабильностью, сохраняя активность при температуре до 55 °С или при нахождении в культуральной среде при +37 °С в течение 15 часов. Удобно и то, что NLuc является АТФ-независимой и одной из самых маленьких люцифераз по размеру (19 кДа). Диапазон использования NLuc в современных биомедицинских и диагностических приложениях крайне широк, и такая люцифераза является предпочтительным репортером в экспериментах, в которых необходимы высокая интенсивность яркости сигнала, стабильность и низкая интенсивность фоновой люминесценции.

Несмотря на все преимущества NLuc, существуют и данные об определенных сложностях в работе с экспрессирующими ее клетками из-за низкой растворимости и биодоступности ее субстрата, фуримазина [22, 23]. Такие сложности возникают в том числе из-за невозможности увеличения дозы субстрата: максимальная доза для мелких животных составляет 1,3 мкмоль в буфере на основе полиэтиленгликоля [24] и 0,016 мкмоль в фосфатно-солевом буфере [22], что ограничивает чувствительность метода.

Хотя модифицированные варианты фуримазина недавно были вполне успешно опробованы в сравнительных исследованиях и показана возможность повышения чувствительности с их использованием [23], коммерческие источники таких субстратов ограничены. В данной работе в качестве альтернативного и коммерчески доступного варианта было предложено использовать h-целентеразин и сравнить два варианта целентеразина — нативный целентеразин и h-целентеразин — с фуримазином в тесте *in vitro*, а также исследовать возможность использования пары NLuc/h-целентеразин для прижизненной визуализации диссеминированных опухолевых клеток с помощью системы IVIS Spectrum (Perkin-Elmer, США).

Целью настоящей работы было сравнение различных субстратов NanoLuc *in vitro*, а также исследование возможностей использования пары NLuc/h-целентеразин для прижизненной визуализации диссеминированных опухолевых клеток с помощью системы IVIS Spectrum.

Материалы и методы

Получение В-клеточной линии Nalm6 с внутриклеточной экспрессией NLuc

В качестве вектора для клонирования был выбран двухпромоторный вектор CD-511 серии pCDH (System Biosciences, США), структуры CMV-MCS-EF1a-copGFP. Целевая конструкция pCDH-nluc была получена клонированием кодон-оптимизированной последовательности, кодирующей люциферазу NLuc (pNL1.1 [NLuc] (Promega, США)) по уникальным сайтам рестрикции XbaI и BamHI (Thermo Fisher Scientific,

США). Псевдотипированные лентивирусные частицы были получены котрансфекцией клеток-паковщиков линии HEK293T смесью трех плазмид: pCDH-nluc и вспомогательных плазмид psPAX2 и pMD2.G с использованием кальций-фосфатной трансфекции [25]. Супернатант, содержащий псевдовидирусные частицы, собирали через 36 часов и осаждали их центрифугированием в течение 1,5 часов с ускорением 35 000 g. Осадок лентивирусных частиц ресуспендировали в среде, шоково замораживали и хранили в парах жидкого азота не более чем 3 месяца.

В-клеточную линию острого лимфобластного лейкоза человека Nalm6 (ATCC, США), нативно экспрессирующую белок CD19 на своей поверхности, культивировали в среде IMDM (Thermo Fisher Scientific, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (Capricorn, Германия) при 37 °C в присутствии 5% CO₂. Трансдукцию клеток Nalm6 псевдотипированными лентивирусными частицами проводили методом спинокуляции в течение 40 минут при 32 °C с ускорением 600 g и с соотношением, при котором на каждую клетку приходилось 2 лентивирусные частицы.

Несколько дней спустя, после появления флуоресцентного сигнала copGFP в популяции трансдуцированных клеток, проводили сортировку единичных copGFP-позитивных клеток на клеточном сортере «SH800» (Sony, Япония) в режиме Single cell (3 drops). После экспансии сортированных моноклонов в течение 2 недель проверяли отсутствие нетрансдуцированных (copGFP-негативных) клеток в полученных моноклональных субклинах, используя проточный цитометр «BD CantoII» (Becton Dickinson, США).

Измерение интенсивности люминесценции клеток in vitro

Для определения интенсивности люминесценции клетки полученной таким способом линии Nalm6-Nluc-copGFP два раза отмывали от культуральной среды стерильным фосфатно-солевым буфером (DPBS, «ПанЭко», Россия), центрифугируя 4 мин. при комнатной температуре с ускорением 400 g. Затем клетки подсчитывали при помощи автоматического счетчика клеток «LunaII» (LogosBio, Южная Корея) и вносили в лунки 96-луночного планшета (SPL, Южная Корея) в диапазоне от 10 до 7290 клеток/50 мкл с трехкратным увеличением количества клеток в соседних лунках. Клетки лизировали добавлением равного объема буфера для лизиса (DPBS, Triton-X до 0,1%) в течение 10 мин. с использованием орбитального шейкера при 700 об./мин. Для каждой точки измерения выполняли в трех повторах. Субстраты разводили до финальной концентрации 30 мкМ в фосфатно-солевом буфере непосредственно перед началом измерения. Дозирование субстрата по 50 мкл/лунку производили автоматически. Таким образом, после смешивания

с лизированными клетками финальная концентрация субстратов составляла 10 мкМ. Детекцию сигнала проводили немедленно после внесения субстрата в течение 0,5 сек. 50 раз при помощи планшетного люминометра Luminoskan™ Microplate Luminometer (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение CAR Т-клеток

Для получения CAR Т-клеточных продуктов мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови здорового донора центрифугированием на градиенте фиколла («ПанЭко», Россия), после чего проводили их селекцию и активацию Т-клеток магнитными частицами CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, США). Выделенные Т-клетки культивировали в среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия) в присутствии 50 единиц/мл интерлейкина-2 и 7 нг/мл интерлейкина-15 (Miltenyi Biotec, Германия). Трансдукцию псевдовидирусными лентивирусными частицами, кодирующими CAR второго поколения против белков CD19 и PSMA (см. ниже), проводили через 36 часов после выделения спинокуляцией в присутствии 10 нг/мл протамин сульфата («Синтез», Россия) в течение 40 минут при 32 °C с ускорением 600 g. Оценку трансдукции проводили через двое суток при помощи проточной цитофлуориметрии, окрашивая биотинилированным белком L («Биоспецифика», Россия) и APC-стрептавидином (Biolegend, США).

Проведение in vivo визуализации опухолевых клеток в экспериментальной модели CAR Т-клеточной терапии на мышах

Для in vivo визуализации 6–8-недельным самцам мышей линии NSG ($n = 14$) в хвостовую вену вводили по 3×10^5 Nalm6-Nluc-copGFP клеток/животное. Детекцию приживания проводили начиная с 5-х суток после введения, далее оценку опухолевой нагрузки проводили каждые 7 суток. На 6-е сутки животных разделили на две группы и ввели по 1×10^6 CAR Т-клеточных продуктов/животное, опытная группа получала CD19-специфические FMC63-CAR Т-клетки, идентичные продукту тисагенлеклейсел (Novartis, США) [26], контрольные — терапию J591-CAR (нерелевантный CAR, специфичный к PSMA человека) [27]. Для визуализации опухолевых клеток интраперитонеально вводили по 20 мкг h-целентеразина (Nanolight Technologies, США) в 100 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего через 5 мин. животных наркотизировали при помощи изофлурана. Измерение люминесценции проводили в течение 180 сек., используя систему прижизненной визуализации «IVIS Spectrum» (Perkin-Elmer, США). Полученные результаты съемки анализировали при помощи программного обеспечения Living Image (Perkin-Elmer, США). При появлении у животных выраженных болевых синдромов, изменения поведения или высокой опухолевой нагрузки

(по данным визуализации) животное выводили из эксперимента путем декапитации. После вывода животного из эксперимента образцы костного мозга (бедренная кость) и крови анализировали при помощи проточной цитометрии для подтверждения наличия или отсутствия опухолевых клеток в образцах. Работа с животными была одобрена локальным этическим комитетом ИМКБ СО РАН, решение N002 от 09.09.2024.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism» version 6. Был использован метод множественного сравнения с использованием 2-way ANOVA, значимым отличием считалось $P < 0,05$.

Результаты

Получение клеток *Nalm6-Nluc-copGFP*

Для создания целевой клеточной линии использовали плазмидную конструкцию pCDH-nluc, кодирующую люциферазу Nluc под контролем сильного промотора цитомегаловируса человека, и зеленый флуоресцентный белок копеподы *Pontellina plumata* copGFP под контролем сильного конститутивного промотора гена EF1a человека (рис. 1 А). Трансдукция клеток линии Nalm6 с MOI 2 была проведена с использованием pCDH-nluc и паковочных плазмид, обеспечивающих псевдотипирование лентивирусных частиц белком G вируса везикулярного стоматита.

Затем из поликлональной популяции было получено несколько моноклональных сублиний с использо-

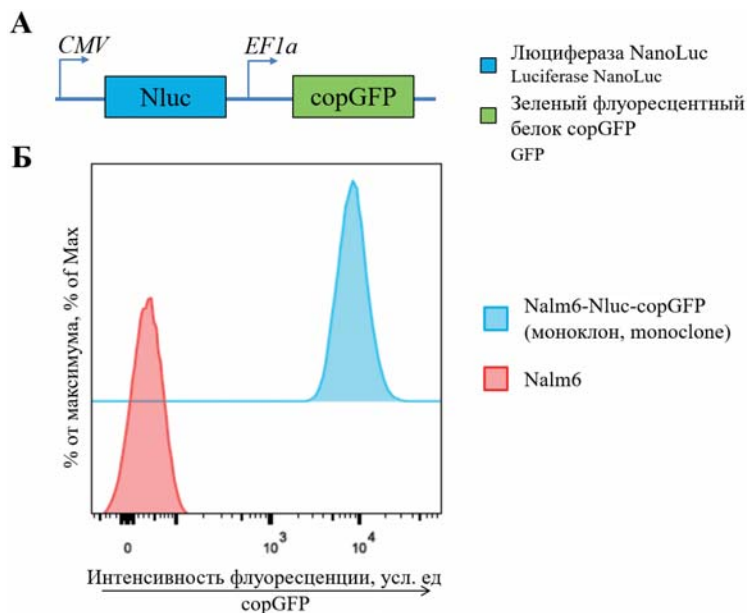


Рисунок 1. Получение и характеристика целевой клеточной линии. А — схематичное изображение структуры кассеты, кодирующей люциферазу Nluc и зеленый флуоресцентный белок copGFP; Б — полученная моноклональная линия Nalm6-Nluc-copGFP экспрессирует copGFP (анализ при помощи проточной цитофлуориметрии)

Figure 1. Development and characterization of the cell line. А — schematic representation of the structure of the cassette encoding Nluc luciferase and the green fluorescent protein copGFP; Б — the resulting monoclonal line Nalm6-Nluc-copGFP expresses copGFP (analyzed by flow cytometry)

ванием клеточного сортера «Sony SH800» и режима сортировки единичных клеток. Моноклональные линии были охарактеризованы при помощи проточной цитометрии с оценкой интенсивности экспрессии copGFP, и выбрана одна — с гомогенно высокой интенсивностью флуоресценции (рис. 1 Б). Данный моноклон был использован для всех дальнейших экспериментов.

Функциональное исследование люминесценции клеток *Nalm6-NLuc-copGFP in vitro*

Для сравнения интенсивности люминесцентного сигнала в зависимости от типа субстрата и количества клеток использовали различное количество клеток (от 10 до 7290/лунку) при фиксированной концентрации субстрата — 10 мкМ. Полученные данные (рис. 2 А) свидетельствовали о достоверно более высокой интенсивности сигнала при использовании h-целентеразина в сравнении с фуримазином. Наблюдалось двукратное превышение интенсивности люминесценции для h-целентеразина по сравнению с фуримазином. Интенсивность сигнала при добавлении нативного целентеразина в качестве субстрата была на порядок ниже, что вынудило исключить его тестирование в дальнейших экспериментах.

Помимо исследования интенсивности люминесценции в зависимости от количества клеток и определения порога чувствительности данного метода *in vitro*, оценили временную динамику угасания сигнала люминесценции с течением времени, зафиксировав концентрацию субстратов в 10 мкМ и плотность в 2430 клеток/лунку. По результатам данного теста (рис. 2 Б) установлено, что, в отличие от фуримазина, обладающего высокой стабильностью излучения, при использовании h-целентеразина происходит резкое усиление, а потом плавное ослабление интенсивности люминесценции. Однако яркость его излучения и последующая стабилизация сигнала, а также большая растворимость и меньшая токсичность делают его перспективным кандидатом для использования в тестах *in vivo*.

Прижизненная визуализация ксенотрансплантированных клеток линии *Nalm6-Nluc-copGFP* при терапии мышей CAR Т-клеточными продуктами

Для проверки способности визуализировать ксенотрансплантированные клетки линии Nalm6-Nluc-copGFP в динамике был проведен пилотный эксперимент, схема которого приведена на рисунке 3 А. После внутривенного введения 3×10^5 клеток линии Nalm6-Nluc-copGFP 14 самцам иммунодефицитной линии NSG на 5-й день проводили визуализацию и рандомизацию мышей на две группы. Одним мышам на следующий день вводили терапевтические CAR Т-клетки, узнающие CD19 на поверхности опухолевых

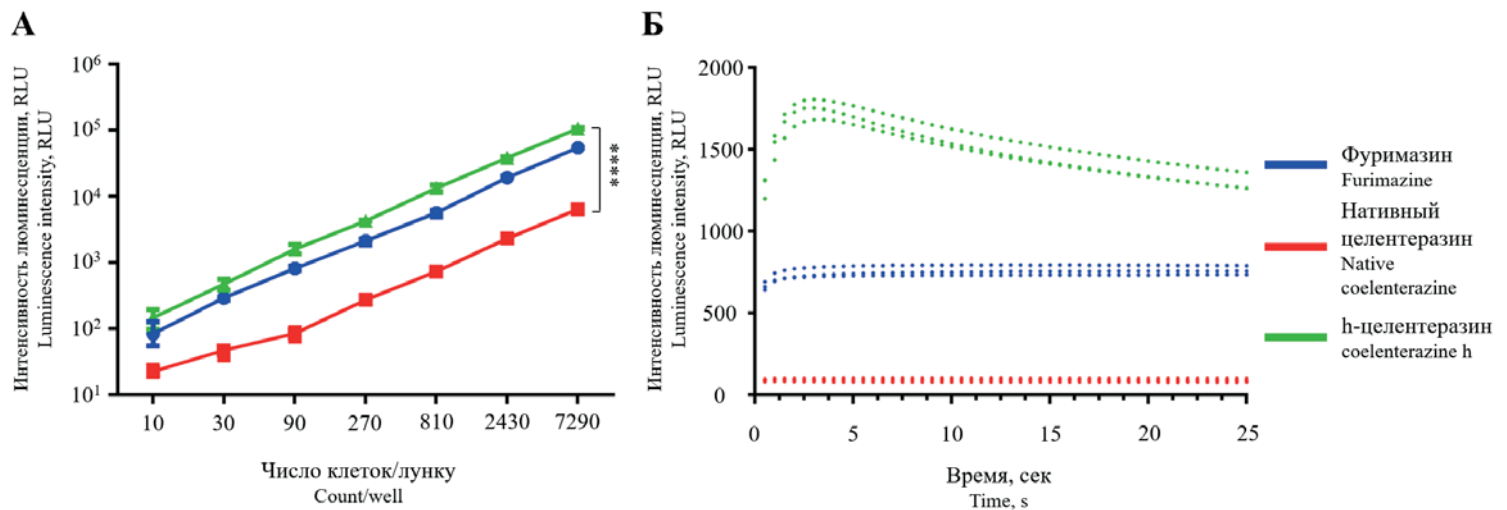


Рисунок 2. Сравнение различных субстратов в тестах *in vitro*. А — сравнение интегральных интенсивностей люминесценции за 25 секунд при использовании различных субстратов (10 мкМ) в зависимости от числа клеток Nalm6-NLuc-copGFP. Статистический анализ трех повторностей был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием 2-way ANOVA (GraphPad Prism, v6, $p < 0,001$); Б — средняя интенсивность биолуминесценции с течением времени для каждого из субстратов при концентрации 10 мкМ и числе 2430 клеток Nalm6-NLuc-copGFP/лунку

Figure 2. *In vitro* comparison of different substrates. А — comparison of integrated luminescence intensities over 25 seconds using different substrates (10 μ M) depending on the number of Nalm6-NLuc-copGFP cells. Statistical analysis of three replicates was performed by multiple comparisons using 2-way ANOVA (GraphPad Prism, v6, $p < 0,001$); Б — average bioluminescence intensity over time for each substrate at a concentration of 10 μ M and 2430 Nalm6-NLuc-copGFP cells/well

клеток (группа FMC63-CAR), другим — контрольные CAR T-клетки от того же донора, полученные тем же способом и идентично активированные/культивированные *ex vivo*, со специфичностью к белку PSMA, отсутствующему на поверхности опухолевых клеток. Далее визуализацию проводили еженедельно, на 12, 19, 26, 33, 40 и 47-й дни (рис. 3 Б). Отмечалась дальнейшая прогрессия заболевания у контрольных мышей, а у мышей, которым были введены FMC63-CAR T-клетки, наблюдали стабилизацию интенсивности сигнала, что свидетельствовало об установлении контроля над опухолью.

Суммарные данные по средней интенсивности люминесценции для обеих групп приведены на рисунке 4. Проведенный эксперимент позволил утвердительно ответить на вопрос о том, обладают ли полученные нами CAR T-клетки противоопухолевой активностью *in vivo* в ксенотрансплантированной модели, а также показал возможность прижизненной визуализации и отслеживания динамики опухолевых клеток, экспрессирующих NLuc, при помощи доступного и нетоксичного субстрата, h-целентеразина.

Валидация данных *in vivo* визуализации при помощи проточной цитометрии

Экспрессия клетками Nalm6-NLuc-copGFP помимо NLuc еще и флуоресцентного маркера copGFP позволяет независимо детектировать наличие опухолевых клеток и при необходимости проводить их фенотипирование методом проточной цитометрии. Репрезентативные данные анализа образцов для одного животного из контрольной группы J591-CAR приведены на рисунке 5. Полученные данные свиде-

тельствовали о том, что клетки Nalm6-NLuc-copGFP обнаруживались в костном мозге и периферической крови мышей в полном соответствии с данными *in vivo* визуализации.

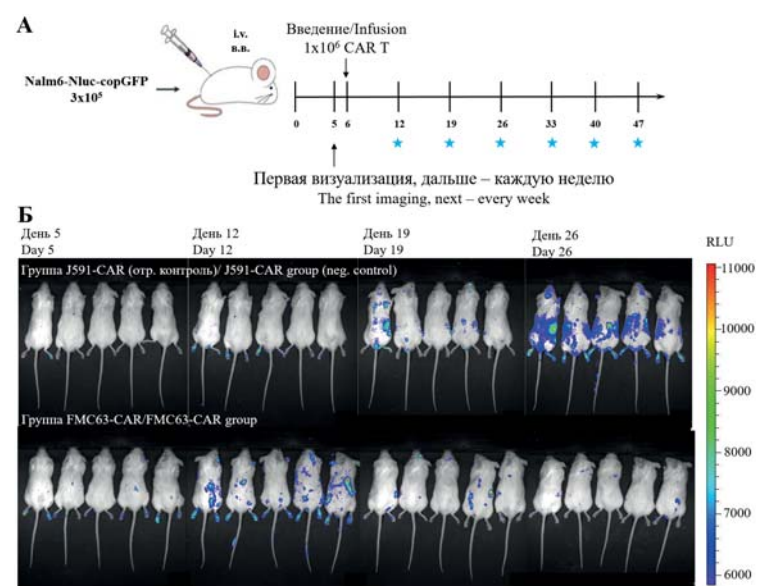


Рисунок 3. Прижизненная визуализация ксенотрансплантированных клеток линии Nalm6-NLuc-copGFP при терапии мышей CAR T-клеточными продуктами. А — схематическое изображение эксперимента; Б — *in vivo* визуализация после интраперитонеального введения 0,491 мкмоль (20 мкг) h-целентеразина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера в контрольной группе мышей. Спектральные данные были получены в течение 3 мин., через 5 минут после введения субстрата. Репрезентативные изображения приведены для 5 из 7 мышей в каждой группе с 5-го по 26-й день

Figure 3. Live imaging of xenografted Nalm6-NLuc-copGFP cells during CAR T cell therapy in mice. А — schematic representation of the experiment; Б — *in vivo* imaging after intraperitoneal administration of 0.491 μ mol (20 μ g) h-coelenterazine in 100 μ l phosphate-buffered saline to the control group of mice. Spectral data were acquired for 3 min, 5 min after substrate administration. Representative images are shown for 5 of 7 mice in each group from days 5 to 26

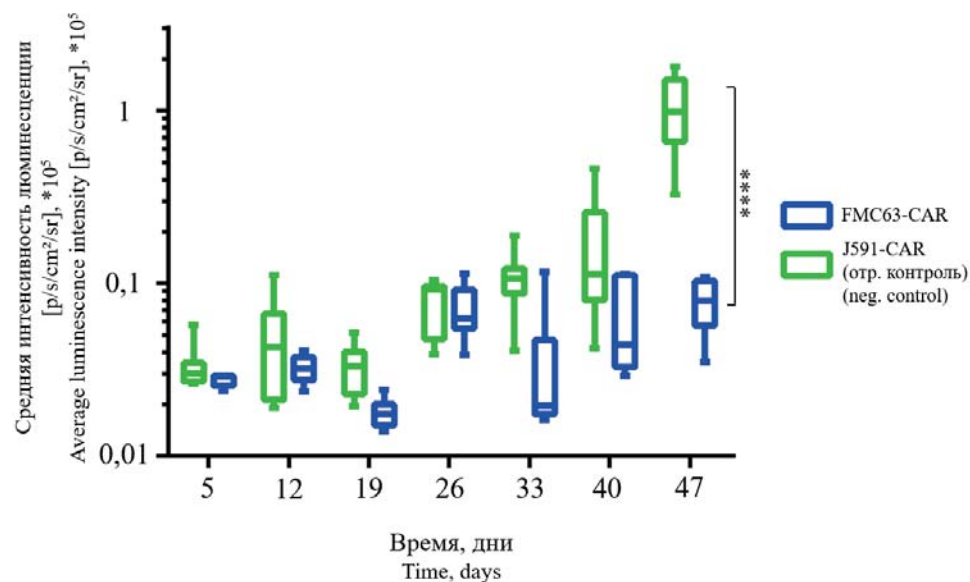


Рисунок 4. Изменения относительной интенсивности люминесценции от времени после введения в каждой группе животных ($n = 7$). На 47-й день интенсивность флуоресценции отличается достоверно, статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием 2-way ANOVA (GraphPad Prism, v6, $P < 0,001$)

Figure 4. Changes of relative luminescence intensity over time after administration, in each group of animals ($n = 7$). On day 47, the fluorescence intensity differs significantly, statistical analysis was performed using multiple comparisons with 2-way ANOVA (GraphPad Prism, v6, $P < 0,001$)

Обсуждение

Одной из причин, побудивших провести это исследование, являлось то, что, согласно литературным данным, специально разработанный для люциферазы NLuc субстрат — фуримазин может быть токсичным при многократных введениях мелким животным, кроме того, он плохо растворим в воде, и оптимальным способом введения для него остается внутривенное введение [28]. При таком способе введения сигнал быстрее разгорается и затухает, что также ограничивает использование фуримазина при более длительных процессах визуализации [23]. Кроме того, известно, что для повторяющихся измерений следует отдавать предпочтение интраперитонеальным инъекциям, учитывая большую воспроизводимость метода и меньшую подверженность ошибкам.

Еще один возможный субстрат для NLuc — нативный целентеразин — широко применялся в различных экспериментах *in vivo*, поскольку он более биологически доступен при внутривенном введении [29], однако в водных растворах он недостаточно стабилен и быстро деградирует. В отличие от нативной формы, различные C2-модифицированные варианты целентеразина обладают более высокой стабильностью в водных растворах [30], кроме того, для h-модификации была показана предпочтительность использования с белком BFP-aq [31]. Сообщений об использовании h-целентеразина в качестве субстрата для NLuc для целей прижизненной визуализации нет.

В данном исследовании провели сравнение *in vitro* трех альтернативных субстратов для люциферазы NLuc — нативного целентеразина, h-целентеразина

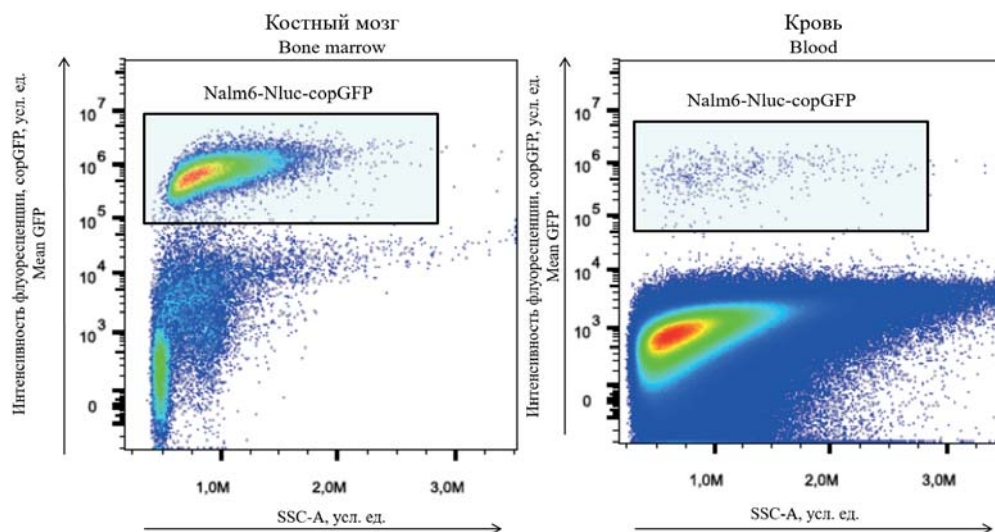


Рисунок 5. Анализ образцов костного мозга и крови животного из контрольной группы (J591-CAR) при помощи проточной цитометрии

Figure 5. Flow cytometry analysis of bone marrow and blood samples from a negative control animal (J591-CAR)

и фуримазина. В экспериментах h-целентеразин показал достоверно более высокую интенсивность люминесценции *in vitro* при эквимольном количестве субстрата.

Помимо суммарной интенсивности сигнала важным параметром при детекции люминесценции является его стабильность с течением времени. Фуримазин и его аналоги демонстрируют крайне стабильный сигнал вплоть до 30 мин. после начала измерения [23]. Согласно полученным данным, в контексте использования *in vitro* в паре с NLuc h-целентеразин является менее предпочтительным субстратом, чем фуримазин, ввиду большей динамики развития сигнала в первые 5–7 сек. после добавления. Тем не менее впоследствии сигнал от пары NLuc/h-целентеразин стабилизируется, что делает использование h-целентеразина привлекательным для *in vivo* имиджинга, где детекция начинается значительно позже, как правило, спустя 3–5 мин. после введения.

Длина волны испускаемого NLuc свечения почти на 100 нм меньше, чем длина волны излучения широко используемой люциферазы Fluc. Потенциально это может приводить к более интенсивному поглощению люминесцентного сигнала от NLuc тканями, что теоретически может маскировать люминесценцию из глубоколежащих органов. В настоящей работе не было замечено принципиального искажения паттернов люминесценции по сравнению с литературными данными для люциферазы Fluc [15]. Возможно

также, что большее поглощение сигнала компенсируется в случае NLuc заметно более сильной интенсивностью излучения. Существующие исследования в этой области по сравнению возможности визуализации при помощи как NLuc, так и Fluc в одном эксперименте в контексте ксенотрансплантации клеток линии U87 с одновременной экспрессией этих двух ферментов в бицистронной конструкции также показали более высокую интенсивность люминесценции NLuc. В этом же эксперименте была показана токсичность фуримазина для клеток и необходимость подбора альтернативного субстрата для прижизненной визуализации [15].

В результате работы был получен не только принципиально новый результат, свидетельствующий о возможности использования h-целентеразина в паре с люциферазой NLuc для прижизненной визуализации клеток в мышах, но и генетически модифицированная клеточная линия Nalm6-NLuc-copGFP, которая может быть востребована в качестве инструмента для исследований эффективности, безопасности и токсичности соединений и клеточных продуктов, разрабатываемых для противоопухолевой терапии острого лимфобластного лейкоза. Полученная плазмидная конструкция также потенциально может быть использована для модификации любых других клеточных линий, необходимых для разработки и корректной характеристики новых генно-терапевтических подходов.

Литература / References

- Emami-Shahri N., Foster J., Kashani R., et al. Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells. *Nat. Commun.* 2018;9:1081. DOI: 10.1038/s41467-018-03524-1.
- Sakemura R., Can I., Siegler E.L., Kenderian S.S. In vivo CART cell imaging: Paving the way for success in CART cell therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2021;20:625–33. DOI: 10.1016/j.omto.2021.03.003.
- Skovgard M.S., Hocine H.R., Saini J.K., et al. Imaging CAR T-cell kinetics in solid tumors: Translational implications. *Mol Ther Oncolytics.* 2021;22:355–67. DOI: 10.1016/j.omto.2021.06.006.
- Mitra A., Barua A., Huang L., et al. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol.* 2023;14:1188049. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1188049.
- Joy R., Phair K., O'Hara R., Brady D. Recent advances and current challenges in CAR-T cell therapy. *Biotechnol Lett.* 2024;46:115–26. DOI: 10.1007/s10529-023-03461-0.
- Müller F., Boeltz S., Knitz J., et al. CD19-targeted CAR T cells in refractory antisynthetase syndrome. *Lancet.* 2023;401:815–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00023-5.
- Bergmann C., Müller F., Distler J.H.W., et al. Treatment of a patient with severe systemic sclerosis (SSc) using CD19-targeted CAR T cells. *Ann Rheum Dis.* 2023;82:1117–20. DOI: 10.1136/ard-2023-223952.
- Uslu U., June C.H. Beyond the blood: expanding CAR T cell therapy to solid tumors. *Nat Biotechnol.* 2025; 43:506–515. DOI:10.1038/s41587-024-02446-2.
- Li Y., Liu M., Cui J., et al. Hepa1-6-FLuc cell line with the stable expression of firefly luciferase retains its primary properties with promising bioluminescence imaging ability. *Oncol Lett.* 2018;15:6203–10. DOI: 10.3892/ol.2018.8132.
- Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*; WORLD SCIENTIFIC, 2006., ISBN 978-981-256-801-4.
- Martini S., Haddock S.H.D. Quantification of bioluminescence from the surface to the deep sea demonstrates its predominance as an ecological trait. *Sci Rep.* 2017;7:45750. DOI: 10.1038/srep45750.
- Frank L.A., Krasitskaya V.V. Coelenterazine-Dependent Luciferases: Properties and Application in Molecular Analysis. *Moscow Univ Chem Bull.* 2024;79:203–10. DOI: 10.3103/S0027131424700184.
- Tannous B.A., Kim D.-E., Fernandez J.L., et al. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther.* 2005;11:435–43. DOI: 10.1016/j.ymt.2004.10.016.
- Contag P.R., Olomu I.N., Stevenson D.K., Contag C.H. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat. Med.* 1998;4:245–7. DOI: 10.1038/nm0298-245.
- Germain-Genevois C., Garandeau O., Couillaud F. Detection of brain tumors and systemic metastases using nanoluc and fluc for dual reporter imaging. *Mol Imaging Biol.* 2016;18:62–9. DOI: 10.1007/s11307-015-0864-2.
- Markova S.V., Golz S., Frank L.A., et al. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. *J. Biol. Chem.* 2004;279:3212–7. DOI: 10.1074/jbc.M309639200.
- Nakajima Y., Kobayashi K., Yamagishi K., et al. cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004;68:565–70. DOI: 10.1271/bbb.68.565.
- Thompson E.M., Nagata S., Tsuji F.I. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:6567–71. DOI: 10.1073/pnas.86.17.6567.

19. Suzuki C., Nakajima Y., Akimoto H., et al. A new additional reporter enzyme, dinoflagellate luciferase, for monitoring of gene expression in mammalian cells. *Gene*. 2005;344:61–6. DOI: 10.1016/j.gene.2004.09.028.
20. Shimomura, O. Masugi T., Johnson F.H., Haneda Y. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus graciliorostris*. *Biochemistry*. 1978;17:994–8. DOI: 10.1021/bi00599a008.
21. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* 2012;7:1848–57. DOI: 10.1021/cb3002478.
22. Stacer A.C., Nyati S., Moudgil P., et al. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. *Mol. Imaging*. 2013;12:1–13. DOI: 10.2310/7290.2013.00062.
23. Gaspar N., Walker J.R., Zambito G., et al. Evaluation of NanoLuc substrates for bioluminescence imaging of transferred cells in mice. *J Photochem Photobiol B*. 2021;216:112128. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112128.
24. Chu J., Oh Y., Sens A., et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. *Nat Biotechnol*. 2016;34:760–7. DOI: 10.1038/nbt.3550.
25. Kutner R.H., Zhang X.-Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*. 2009;4:495–505. DOI: 10.1038/nprot.2009.22.
26. Brentjens R.J., Riviere I., Park J.H., et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011;118:4817–28. DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
27. Belovezhets T., Kulemin S., Volkova O., et al. Comparative Pre-Clinical Analysis of CD20-Specific CAR T Cells Encompassing 1F5-, Leu16-, and 2F2-Based Antigen-Recognition Moieties *Int J Mol. Sci.* 2023;24:3698. DOI: 10.3390/ijms24043698.
28. Shipunova V.O., Shilova O.N., Shramova E.I., et al. A Highly Specific Substrate for NanoLuc Luciferase Furimazine Is Toxic in vitro and in vivo. *Russ J Bioorg Chem*. 2018;44:225–8. DOI: 10.1134/S1068162018020085.
29. Taylor A., Sharkey J., Plagge A., et al. Multicolour In Vivo Bioluminescence Imaging Using a NanoLuc-Based BRET Reporter in Combination with Firefly Luciferase. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018;2018:2514796. DOI: 10.1155/2018/2514796.
30. Inouye S., Sahara-Miura Y., Sato J., et al. Expression, purification and luminescence properties of coelenterazine-utilizing luciferases from *Renilla*, *Oplophorus* and *Gaussia*: comparison of substrate specificity for C2-modified coelenterazines. *Protein Expr Purif*. 2013;88:150–6. DOI:10.1016/j.pep.2012.12.006.
31. Inouye S., Sasaki S. Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photo-protein aequorin: catalytic properties for the oxidation of coelenterazine as an oxygenase. *FEBS Lett*. 2006;580:1977–82. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.02.065.

Информация об авторах

Беловежец Татьяна Николаевна, научный сотрудник лаборатории инженерии антител ИМКБ СО РАН; младший научный сотрудник НИО иммуноонкологии НИЦ персонализированной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», e-mail: ochotanya@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0147-4078>

Гладких Даниил Викторович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: medulla35@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3736-0803>

Омельченко Виталий Олегович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии соединительной ткани НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: v.o.omelchenko@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6606-7185>

Волкова Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН ИМКБ СО РАН, e-mail: volkova@mcb.nsc.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8329-7182>

Таранин Александр Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН ИМКБ СО РАН, e-mail: taranin@mcb.nsc.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9184-4238>

Information about the authors

Tatyana N. Belovezhets, Research Fellow Laboratory of Antibody Engineering Institute of Molecular and Cellular Biology of the SB RAS; Junior Researcher Research Department of Immuno-Oncology of Research Centre Personalized Oncology Almazov National Medical Research Centre, e-mail: ochotanya@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0147-4078>

Daniil V. Gladkikh, Cand. Sci. (Biol.), junior researcher Laboratory of Nucleic Acids Biochemistry Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the SB RAS, e-mail: medulla35@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3736-0803>

Vitaliy O. Omelchenko, Cand. Sci. (Med.), Research fellow Laboratory of Connective tissue disease Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS, e-mail: v.o.omelchenko@gmail.com,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6606-7185>

Olga Y. Volkova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Fellow Laboratory of Immunogenetics Institute of Molecular and Cellular Biology of the SB RAS, e-mail: volkova@mcb.nsc.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8329-7182>

Alexander V. Taranin, Dr. Sci. (Biol.), head Laboratory of Immunogenetics Institute of Molecular and Cellular Biology of the SB RAS, e-mail: taranin@mcb.nsc.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9184-4238>

Кулемзин Сергей Викторович*, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биосенсорных технологий, Институт медицины и медицинских технологий ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4706-623X>

Sergey V. Kulemzin*, Cand. Sci.(Biol.), Head of Laboratory of Biosensor Technologies of Institute of Medicine and Medical Technologies Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russian Federation,
e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4706-623X>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 29.04.2025

Принята к печати: 10.06.2025

*** Corresponding author**

Received 29 Apr 2025

Accepted 10 Jun 2025