

СРАВНЕНИЕ МРНК И ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ  
COMPARISON OF MRNA AND PLASMID VECTORS

10.46235/1028-7221-16815-COT

**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МРНК И ПЛАЗМИДНЫХ  
ВЕКТОРОВ ПРИ ТРАНСФЕКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

Киселева Я. Ю.<sup>1</sup>,  
Шишкин А. М.<sup>1</sup>,  
Кулинич Т. М.<sup>1</sup>,  
Боженко В. К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России;  
Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86.

**COMPARISON OF THE EFFICACY OF MRNA AND PLASMID VECTORS  
IN TRANSFECTION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES**

Kiseleva Y. Y. <sup>a</sup>,

Shishkin A. M. <sup>a</sup>,

Kulinich T. M. <sup>a</sup>,

Bozhenko V. K. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (RSCRR) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997 Moscow, Profsoyuznaya str., 86.

## Резюме

Адаптивная CAR-T-клеточная терапия — инновационный подход в онкологии, который использует полученные от пациента генетически модифицированные Т-клетки в качестве терапевтического инструмента для борьбы с раком. Использование ДНК-плазмид и транскрибируемой *in vitro* (IVT) мРНК в качестве векторов для получения CAR-T-лимфоцитов имеет ряд преимуществ по сравнению с вирусными векторами такими как: отсутствие модификации генома клеток, высокую эффективность трансфекции, быстроту и потенциально более низкую стоимость получения конечного продукта. В работе исследована эффективность трансфекции (в терминах жизнеспособности клеток и экспрессии целевого белка) мононуклеарных клеток периферической крови и клеток перевиваемой культуры (эмбриональные клетки почки человека, HEK293) методом электропорации, используя модельные ДНК-плазмиду (pmaxGFP) и IVT-мРНК (мРНК-GFP), кодирующих зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP). Проведен подбор оптимального режима трансфекции. Показано, что, хотя мРНК-GFP даёт сравнимое количество клеток, экспрессирующих GFP, жизнеспособность клеток, и соответственно эффективность трансфекции в целом, при использовании мРНК-GFP как вектора значительно выше. При этом, сравнение уровня экспрессии клеток трансфецированных двумя методами показывает, что использование мРНК даёт более однородные показатели, тогда как при использовании плазмидного вектора уровень экспрессии отличается на несколько порядков. Было проведено сравнение изменения уровня экспрессии в течении 7 дней после трансфекции. Показано, что доля GFP позитивных клеток убывает со временем и не зависит от способа трансфекции, при этом оценка доли жизнеспособных клеток показала, что трансфекция плазмидой приводит к снижению доли жизнеспособных клеток через 7 суток до 30%, в то время как использование мРНК практически не влияет на жизнеспособность (количество живых клеток через 7 суток практически не отличается от контроля). Полученные результаты указывают, что использование IVT-мРНК может оказаться более предпочтительным средством при производстве CAR-T продуктов методом электропорации.

**Ключевые слова:** Адаптивная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T терапия, электропорация, плаزمиды, матричная РНК (мРНК).

### **Abstract**

Adaptive CAR-T cell therapy is an innovative approach in oncology that uses genetically modified T cells obtained from a patient as a therapeutic tool to fight cancer. The use of DNA plasmids and in vitro transcribed (IVT) mRNA as vectors for the production of CAR-T lymphocytes has a number of advantages compared to viral vectors, such as the absence of modification of the cell genome, high transfection efficiency, speed and potentially lower cost of obtaining the final product. The efficiency of transfection (in terms of cell viability and expression of the target protein) of peripheral blood mononuclear cells and cells of the transplanted culture (human embryonic kidney cells, HEK293) by electroporation using model DNA plasmid (pmaxGFP) and IVT-mRNA (mRNA-GFP) encoding green fluorescent protein (green fluorescent protein, GFP). The selection of the optimal transfection regime was carried out. It has been shown that, although mRNA-GFP gives a comparable number of cells expressing GFP, cell viability, and consequently the efficiency of transfection in general, is significantly higher when using mRNA-GFP as a vector. At the same time, a comparison of the expression level of cells transfected by two methods shows that the use of mRNA gives more uniform indicators, whereas when using a plasmid vector, the expression level differs by several orders of magnitude. A comparison was made of the change in expression level within 7 days after transfection. It was shown that the proportion of GFP positive cells decreases with time and does not depend on the method of transfection, while the assessment of the proportion of viable cells showed that plasmid transfection leads to a decrease in the proportion of viable cells after 7 days to 30%, while the use of mRNA practically does not affect viability (the number of living cells after 7 days is practically it does not differ from the control). The results obtained indicate that the use of IVT-mRNA may be a more preferable means in the production of CAR-T products by electroporation.

**Keywords:** Adaptive immunotherapy, chimeric antigen receptor, CAR-T therapy, electroporation, plasmid, messenger RNA (mRNA).

## 1 Введение

Одним из перспективных подходов к иммунотерапии опухолей является CAR-T терапия, эффективность которой показана для ряда гемобластозов [6, 9]. В основе CAR-T терапии лежит принудительная экспрессия в лимфоцитарной клетке искусственного белка – химерного антигенного рецептора (chimeric antigen receptor, CAR), выполняющего функции распознавания специфического поверхностного антигена опухолевой клетки и последующей активации лимфоцита. Это реализуется с помощью переноса в клетку чужеродной нуклеиновой кислоты, кодирующей нужный белок. Лимфоциты традиционно считаются наиболее трудно трансфецируемыми клетками. Для получения CAR-T-лимфоцитов наиболее широко используется трансдукция клеток лентивирусными векторами [14]. Вирусная частица доставляет и интегрирует ген CAR в геном клетки, результатом чего является его стабильная экспрессия. Данная технология легла в основу терапевтических препаратов, внедренных в клиническую практику с 2017 года [6]. Однако уже на этапе их создания высказывались оправдавшиеся опасения по поводу возможной генетической трансформации клеток с высоким риском канцерогенеза [1, 10, 18]. Основные причины таких побочных эффектов связаны с нерегулируемым встраиванием ретровирусных конструкций в геном и вероятностью повреждения в областях генов онкосупрессоров или онкогенов, а также с неограниченной персистенцией генетически модифицированных клеток в организме. [4, 17, 18].

Альтернативным подходом является разработка методов получения CAR-T клеточных продуктов, использующих другие векторы для генетической модификации – плазмиды и молекулы РНК, которые не интегрируются в клеточный геном [3, 7, 13, 19]. В доклинических исследованиях было показано, что эффективность противоопухолевой CAR-терапии с использованием таких клеточных продуктов не уступает CAR-терапии на основе вирусных векторов и обладает гораздо меньшей токсичностью [5, 11, 12]. Плазмиды использовались для получения CAR-T клеток, распознающих CD19, NY-BR1, РЭА [2, 3]. Применение молекул РНК в виде искусственно синтезированной, транскрибируемой *in vitro* (IVT) мРНК позволяет экспрессировать широкий спектр функционально активных белков [15] и ряд полученных таким образом CAR-T клеточных продуктов проходит в настоящее время клинические испытания [16]. Для получения CAR-T клеточных продуктов в качестве метода внутриклеточной доставки векторов широко использовалась *ex vivo* трансдукция плазмид или IVT-мРНК в T-лимфоциты с помощью электропорации [3, 7, 13, 15, 19]. Несмотря на широкое использование электропорации для получения CAR-T клеточных продуктов, до настоящего времени не проводилось прямого сравнения эффективности применения этого метода при использовании плазмид и IVT-мРНК как векторов для доставки генетического материала.

Цель данной работы было сравнить эффективность трансфекции (в терминах жизнеспособности клеток и экспрессии целевого белка) методом

45 электропорации мононуклеарных клеток периферической крови и клеток  
46 перевиваемой культуры (эмбриональные клетки почки человека), используя  
47 модельные ДНК-плазмиду и IVT-мРНК, кодирующих зелёный  
48 флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP).

## 49 2 Материалы и методы

50 В качестве носителя генетического материала, кодирующего зелёный  
51 флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) использовали плазмиду  
52 (pmaxGFP, Lonza, Германия) и линейную матричную РНК (мРНК-GFP,  
53 НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи).

### 54 **Оценка экспрессии GFP-плазмиды и мРНК-GFP в клеточной линии** 55 **НЕК293**

56 Трансфекцию культуры эмбриональных клеток почки человека – линии  
57 НЕК293 (клетки после 2-го пассажа, конфлюэнтность 70%, жизнеспособность  
58 97%) проводили на электропораторе Neon (Invitrogen, США) с использованием  
59 набора «Neon™ Transfection System 100 µL Kit», согласно рекомендациям  
60 производителя. Для каждой трансфекции использовали 1,2 млн клеток в  
61 объеме 100 мкл образца, содержащего 2 мкг либо плазмиды pmaxGFP либо  
62 мРНК-GFP. Оптимальные параметры электропорации для данной культуры  
63 клеток были подобраны с использованием плазмиды pmaxGFP, и составили:  
64 напряжение пика 1150 В, продолжительность пика 30 мс, количество  
65 пульсов – 2. Клетки после каждой трансфекции переносили в чашки Петри и  
66 культивировали в стерильных условиях без антибиотика в 5 мл культуральной  
67 среды ДМЕМ в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)  
68 при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. В  
69 качестве контроля использовали клетки, подвергнутые электропорации без  
70 плазмиды и мРНК. Через 24 ч после трансфекции клетки монослоя снимали по  
71 стандартной методике с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко,  
72 Россия) и смешивали их с культуральной средой, содержащей открепившиеся  
73 клетки. Оценку экспрессии GFP и жизнеспособности проводили методом  
74 проточной цитометрии на приборе Cell Sorter SH800S (Sony, Япония), с  
75 использованием встроенного программного обеспечения. Для оценки  
76 жизнеспособности клетки окрашивали красителем DAPI в конечной  
77 концентрации 0,2 мкг/мл.

### 78 **Оценка экспрессии GFP-плазмиды и мРНК-GFP в первичной культуре** 79 **мононуклеаров периферической крови**

80 Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из  
81 лейкоконцентрата здоровых доноров центрифугированием в градиенте  
82 плотности фиколла (1,077 г/мл; ПанЭко) при 700 g в течение 20 мин. МПК  
83 трижды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,4, используя следующие  
84 режимы центрифугирования: 350 g 10 мин, 160 g 15 мин, 300 g 10 мин и  
85 культивировали в полной ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10% ЭТС,  
86 L-глутамин и антибиотики в стандартной концентрации, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.  
87 Количество и состав выделенных МПК контролировали на гематологическом  
88 анализаторе Адвия-60 (Bayer HealthCare LLC, USA). Для трансфекции одного

образца объемом 100 мкл использовали 5-10 млн клеток, 2 мкг плазмиды рmaxGFP или мРНК-GFP. Трансфекцию проводили с помощью нуклеофактора 4D-Nucleofector System (Lonza), используя модуль X Unit, в кюветах объемом 100 мкл с помощью набора «V4XP-3024 P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ Kit L 24 reactions» в соответствии с инструкцией производителя. Клетки подвергали электропорации, используя два режима, рекомендованных производителем для нестимулированных лимфоцитов: «жесткий» режим FI-115 (High efficiency) и более мягкий EO-115 (High functionality). В качестве контроля использовали трансфекцию клеток без плазмиды и мРНК. К суспензии трансфицированных клеток добавляли 500 мкл полной ростовой среды, переносили в чашки Петри для адгезивных культур диаметром 6 см и инкубировали в 5 мл полной ростовой среды при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Оценку экспрессии GFP и жизнеспособности клеток проводили методом проточной цитометрии в динамике на 1, 4, 5, 8 и 13 сутки после трансфекции. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали красителем DAPI в конечной концентрации 0,2 мкг/мл.

### 3 Результаты и обсуждение

Оценка экспрессии плазмиды рmaxGFP и мРНК-GFP в культуре клеток НЕК293 показала их высокую эффективность: доля трансфицированных клеток составила 91±1% для рmaxGFP и 96±2% для мРНК-GFP, при этом доля жизнеспособных клеток составила 89±2% и 95±3%, соответственно. Как можно видеть, и по доле клеток, экспрессирующих GFP, и по жизнеспособности, мРНК-GFP превосходит плазмиду. Однако медиана интенсивности флуоресценции (MFI) для рmaxGFP была в 22 раза выше, чем для мРНК-GFP.

Исследование жизнеспособности клеток и экспрессии GFP-плазмиды и мРНК-GFP в первичной культуре мононуклеаров периферической крови показало, что через сутки после трансфекции плазмидой рmaxGFP в режиме FI115 доля клеток, экспрессирующих GFP, среди живых лимфоцитов была выше, чем во всех остальных условиях и составила 72±3%, а жизнеспособность 79±1%. Экспрессия GFP в клетках, трансфицированных плазмидой начала снижаться после 4 дня, в то время как жизнеспособность клеток к 4 дню упала в полтора раза. Далее оба показателя монотонно снижались и к 13 суткам их значения составляли 36±3% и 20±1%, соответственно. Для мРНК-GFP наиболее оптимальным оказался режим трансфекции EO-115, способствующий функциональной сохранности клеток. Через сутки после трансфекции доля GFP+ клеток составила 66±3%, а жизнеспособность была сравнима с контролем и составляла 88±2%. Далее к 4 и 5 суткам доля клеток, экспрессирующих GFP (GFP+клеток) немного снизилась, а к 13 суткам упала до 29±3%, при этом жизнеспособность клеток снижалась медленно и к 13 суткам достигла 63±2%.

Для того чтобы сравнить долю жизнеспособных трансфицированных клеток для всех исследуемых условий в динамике мы ввели параметр – индекс

133 эффективности трансфекции (ИЭТ). ИЭТ представляет собой произведение  
134 доли GFP<sup>+</sup>клеток и доли живых клеток. Значения ИЭТ в динамике для четырех  
135 исследуемых условий представлены на рисунке 1. Наибольший ИЭТ на  
136 протяжении 13 суток инкубации соответствовал мягкому режиму для мРНК-  
137 GFP, в тоже время этот показатель оказался наименьшим при трансфекции  
138 мРНК-GFP в жестком режиме. ИЭТ для плазмиды как для жесткого, так и  
139 мягкого режимов трансфекции оказался одинаковым.

140 На рисунке 2 представлены данные проточной цитофлюориметрии –  
141 двухпараметрические диаграммы, отображающие долю GFP<sup>+</sup>клеток и  
142 интенсивность флуоресцентного сигнала для плазмиды (жесткий режим) и для  
143 мРНК (мягкий режим) Важно отметить, что медиана интенсивности  
144 флюоресценции (MedFI), отражающая накопление продукта GFP в клетках,  
145 для плазмиды значительно (в 12 раз) выше, чем для мРНК.

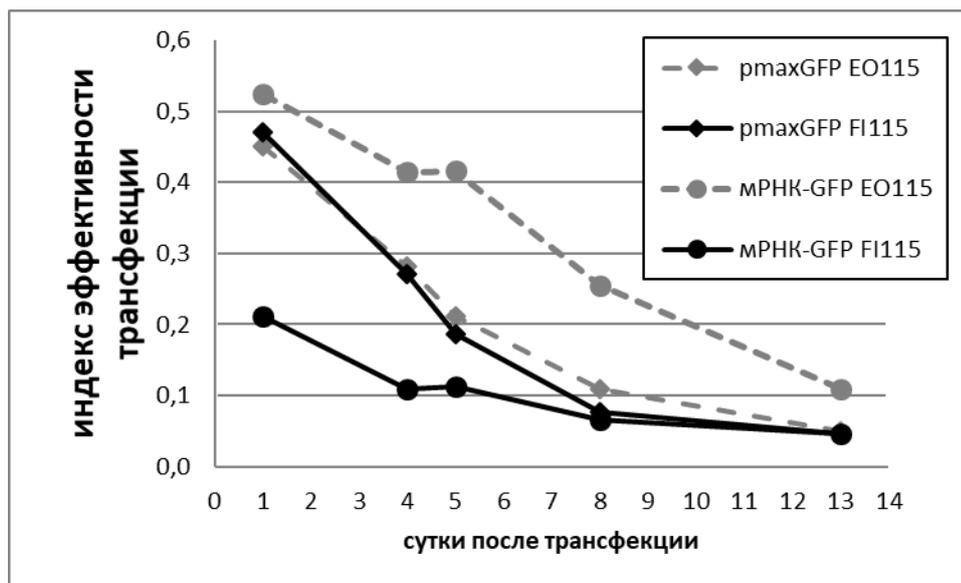
146 Результаты исследований, проведенных в разных клеточных системах –  
147 перевиваемой клеточной линии и первичной культуре мононуклеарных  
148 клеток, показали более высокую жизнеспособность клеток при использовании  
149 в качестве носителя генетического материала мРНК. При этом интенсивность  
150 флюоресценции, отражающая количество накопленного GFP в каждой клетке,  
151 значительно выше при использовании для трансфекции плазмиды, чем мРНК.  
152 Это видимо, связано с тем, что плазида, попав ядро, нарабатывает  
153 значительно большее количество копий мРНК, с которых идет трансляция,  
154 чем фиксированное количество копий мРНК, попавшее в клетки при  
155 трансфекции. Однако, поскольку жизнеспособность клеток при  
156 использовании плазмиды для трансфекции падает гораздо быстрее, чем для  
157 мРНК может оказаться, что в совокупности мРНК является более  
158 предпочтительным носителем генетической информации при получении  
159 живых клеток экспрессирующих CAR. Кроме того, поскольку согласно [8]  
160 период полужизни GFP составляет 26 ч, а наработка белка с тансфецированной  
161 мРНК, как видим в эксперименте, идет достаточно длительное время, то  
162 значит мРНК остается стабильной в живых трансфецированных клетках, по  
163 крайней мере, в течение 2 недель. Необходимо проведение дальнейших  
164 исследований по сравнению плазмиды мРНК, кодирующих уже настоящий  
165 CAR.

166 Полученные результаты позволяют предположить, что использование  
167 мРНК для электропорации при получении CAR-T клеток может оказаться  
168 более предпочтительным средством для производства CAR-T продуктов.

РИСУНКИ

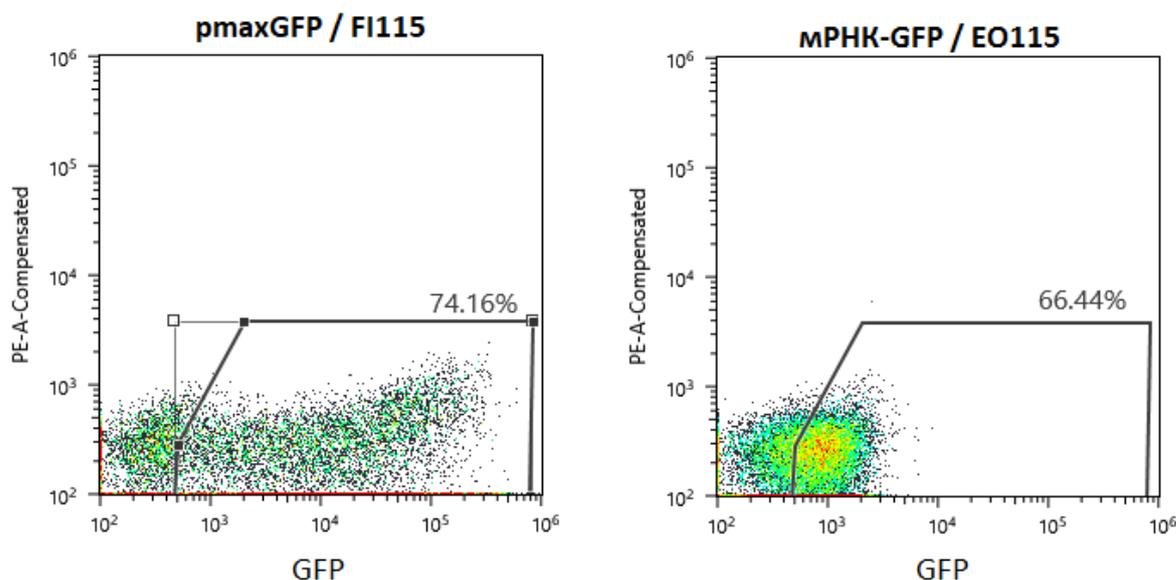
**Рисунок 1.** Динамика индекса эффективности трансфекции мононуклеаров периферической крови (МПК) плазмидой pmaxGFP и мРНК-GFP при разных режимах трансфекции.

**Figure 1.** Dynamics of the index of efficiency of transfection of peripheral blood mononuclears (MPC) by pmaxGFP plasmid and mRNA-GFP under different transfection regimes.



**Рисунок 2.** Экспрессия GFP в клетках мононуклеаров периферической крови (МПК) при трансфекции плазмидой pmaxGFP и мРНК-GFP в оптимальных режимах.

**Figure 2.** Expression of GFP in peripheral blood mononuclear cells (MPCs) during transfection by pmaxGFP plasmid and mRNA-GFP in optimal modes.



## ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДААННЫЕ

### **Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

**Кулинич Татьяна Михайловна** – к.м.н., заведующий лабораторией иммунологии и онкоцитологии ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России;  
адрес: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д.86;

телефон: 8(926)137-20-35;

e-mail: sobral@mail.ru

**Kulinich Tatyana M.** – PhD, Head of the Laboratory of Immunology and Oncocytology, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology;  
address: 117997 Moscow, Profsoyuznaya str., 86;  
telephone: 8(926)137-20-35;

e-mail: sobral@mail.ru

### **Блок 2. Информация об авторах**

**Киселёва Яна Юрьевна** – к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России;  
ORCID: 0000-0002-8352-4787

**Kiseleva Yana Y.** – PhD, Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Oncocytology, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology;  
ORCID: 0000-0002-8352-4787

**Шишкин Александр Михайлович** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и онкоцитологии, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России;  
ORCID: 0000-0003-4492-9543

**Shishkin Alexander M.** – PhD, Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Oncocytology, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology;  
ORCID: 0000-0003-4492-9543

**Кулинич Татьяна Михайловна** – к.м.н., заведующий лабораторией иммунологии и онкоцитологии ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России;  
ORCID: 0000-0003-2331-5753

**Kulinich Tatyana M.** – PhD, Head of the Laboratory of Immunology and Oncocytology, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology;  
ORCID: 0000-0003-2331-5753

**Владимир Константинович Боженко** – д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии

и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России;

ORCID: 00000001-8351-8152;

e-mail: [vbojenko@mail.ru](mailto:vbojenko@mail.ru)

**Vladimir K. Bozhenko** – PhD, Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Head of the Department of Molecular Biology and Experimental Tumor Therapy, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology;

ORCID: 00000001-8351-8152;

e-mail: [vbojenko@mail.ru](mailto:vbojenko@mail.ru)

### **Блок 3. Метаданные статьи**

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МРНК И ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ

ПРИ ТРАНСФЕКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

COMPARISON OF THE EFFICACY OF MRNA AND PLASMID VECTORS IN

TRANSFECTION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

СРАВНЕНИЕ МРНК И ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ

COMPARISON OF MRNA AND PLASMID VECTORS

**Ключевые слова:** Адоптивная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T терапия, электропорация, плаزمид, матричная РНК (мРНК).

**Keywords:** Adaptive immunotherapy, chimeric antigen receptor, CAR-T therapy, electroporation, plasmid, messenger RNA (mRNA).

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

31.03.2024

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Bonifant C.L. et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy // Molecular Therapy - Oncolytics. 2016. Vol. 3. P. 16011.	Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. Mol Ther Oncolytics. 2016 Apr 20;3:16011.	doi: 10.1038/mto.2016.11. PMID: 27626062; PMCID: PMC500826
2	Bozhenko V.K. et al. Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplasma (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice // Usp. mol. onkol. 2023. Vol. 10, № 1. P. 79–86.	Bozhenko V.K., Shishkin A.M., Shkoporov A.N., Kiseleva Y.Yu., Kulinich T.M., Bolshakova O.B., Kudinova E.A., Solodkiy V.A. Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplasma (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice. Advances in Molecular Oncology. 2023;10(1):79-86. (In Russ.)	doi: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86
3	Bozza M. et al. A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells // Sci. Adv. 2021. Vol. 7, № 16. P. eabf1333.	Bozza M, De Roia A, Correia MP, Berger A, Tuch A, Schmidt A, Zörnig I, Jäger D, Schmidt P, Harbottle RP. A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells. Sci Adv. 2021 Apr 14;7(16):eabf1333.	doi: 10.1126/sciadv.abf1333. PMID: 33853779; PMCID: PMC8046366.

4	Bulcha J.T. et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape // <i>Sig Transduct Target Ther.</i> 2021. Vol. 6, № 1. P. 53.	Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. <i>Signal Transduct Target Ther.</i> 2021 Feb 8;6(1):53.	doi: 10.1038/s41392-021-00487-6. PMID: 33558455; PMCID: PMC7868676.
5	Chen W. et al. Path towards mRNA delivery for cancer immunotherapy from bench to bedside // <i>Theranostics.</i> 2024. Vol. 14, № 1. P. 96–115.	Chen W, Zhu Y, He J, Sun X. Path towards mRNA delivery for cancer immunotherapy from bench to bedside. <i>Theranostics.</i> 2024 Jan 1;14(1):96-115.	doi: 10.7150/thno.89247. PMID: 38164145; PMCID: PMC10750210.
6	Chen Y.-J., Abila B., Mostafa Kamel Y. Car-t: what is next? // <i>Cancers.</i> 2023. Vol. 15, № 3. P. 663.	Chen YJ, Abila B, Mostafa Kamel Y. CAR-T: What Is Next? <i>Cancers (Basel).</i> 2023 Jan 21;15(3):663.	doi: 10.7150/thno.89247. PMID: 38164145; PMCID: PMC10750210
7	Cooper L.J.N. et al. Manufacturing of gene-modified cytotoxic T lymphocytes for autologous cellular therapy for lymphoma // <i>Cytotherapy.</i> 2006. Vol. 8, № 2. P. 105–117.	Cooper LJ, Ausubel L, Gutierrez M, Stephan S, Shakeley R, Olivares S, Serrano LM, Burton L, Jensen MC, Forman SJ, DiGiusto DL. Manufacturing of gene-modified cytotoxic T lymphocytes for autologous cellular therapy for lymphoma. <i>Cytotherapy.</i> 2006;8(2):105-17.	doi: 10.1080/14653240600620176. PMID: 16698684.
8	Corish P., Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells // <i>Protein Engineering, Design and Selection.</i> 1999. Vol. 12, № 12. P. 1035–1040.	Corish P, Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. <i>Protein Eng.</i> 1999 Dec;12(12):1035-40.	doi: 10.1093/protein/12.12.1035. PMID: 10611396.

9	Garfall A.L. et al. Anti-BCMA/CD19 CAR T Cells with Early Immunomodulatory Maintenance for Multiple Myeloma Responding to Initial or Later-Line Therapy // Blood Cancer Discovery. 2023. Vol. 4, № 2. P. 118–133.	Garfall AL, Cohen AD, Susanibar-Adaniya SP, Hwang WT, Vogl DT, Waxman AJ, Lacey SF, Gonzalez VE, Fraietta JA, Gupta M, Kulikovskaya I, Tian L, Chen F, Koterba N, Bartoszek RL, Patchin M, Xu R, Plesa G, Siegel DL, Brennan A, Nelson AM, Ferthio R, Cosey A, Shea KM, Leskowitz R, Four M, Wilson WV, Miao F, Lancaster E, Carreno BM, Linette GP, Hexner EO, Young RM, Bu D, Mansfield KG, Brogdon JL, June CH, Milone MC, Stadtmauer EA. Anti-BCMA/CD19 CAR T Cells with Early Immunomodulatory Maintenance for Multiple Myeloma Responding to Initial or Later-Line Therapy. Blood Cancer Discov. 2023 Mar 1;4(2):118-133.	doi: 10.1158/2643-3230.BCD-22-0074. PMID: 36413381; PMCID: PMC9975770.
10	Ghilardi G. et al. T cell lymphoma and secondary primary malignancy risk after commercial CAR T cell therapy // Nat Med. 2024.	Ghilardi G, Fraietta JA, Gerson JN, Van Deerlin VM, Morrisette JJD, Caponetti GC, Paruzzo L, Harris JC, Chong EA, Susanibar Adaniya SP, Svoboda J, Nasta SD, Ugwuanyi OH, Landsburg DJ, Fardella E, Waxman AJ, Chong ER, Patel V, Pajarillo R, Kulikovskaya I, Lieberman DB, Cohen AD, Levine BL, Stadtmauer EA, Frey NV, Vogl DT, Hexner EO, Barta SK, Porter DL, Garfall AL, Schuster SJ, June CH, Ruella M. T cell lymphoma and secondary primary malignancy risk after commercial CAR T cell therapy. Nat Med. 2024 Jan 24.	doi: 10.1038/s41591-024-02826-w. Epub ahead of print. PMID: 38266761.

11	Kenoosh H.A. et al. Recent advances in mRNA-based vaccine for cancer therapy; bench to bedside // ICell Biochem Funct. 2024. Mar;42(2). P.3954	Kenoosh HA, Pallathadka H, HJazi A, Al-Dhalimy AMB, Zearah SA, Ghildiyal P, Al-Mashhadani ZI, Mustafa YF, Hizam MM, Elawady A. Recent advances in mRNA-based vaccine for cancer therapy; bench to bedside. Cell Biochem Funct. 2024 Mar;42(2):e3954	doi: 10.1002/cbf.3954. PMID: 38403905.
12	Koppu V. et al. Current Perspectives and Future Prospects of mRNA Vaccines against Viral Diseases: A Brief Review // Int J Mol Cell Med. 2022. Vol. 11, № 3.	Koppu V, Polaju D, Puvvala B, Madineni K, Balaji S, Sheela CMP, Manchikanti SSC, Moon SM. Current Perspectives and Future Prospects of mRNA Vaccines against Viral Diseases: A Brief Review. Int J Mol Cell Med. 2022;11(3):260-272.	doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.11.3.260. PMID: 37605738; PMID: PMC10440005.
13	Krug C. et al. A GMP-compliant protocol to expand and transfect cancer patient T cells with mRNA encoding a tumor-specific chimeric antigen receptor // Cancer Immunol Immunother. 2014. Vol. 63, № 10. P. 999–1008.	Krug C, Wiesinger M, Abken H, Schuler-Thurner B, Schuler G, Dörrie J, Schaft N. A GMP-compliant protocol to expand and transfect cancer patient T cells with mRNA encoding a tumor-specific chimeric antigen receptor. Cancer Immunol Immunother. 2014 Oct;63(10):999-1008.	doi: 10.1007/s00262-014-1572-5. Epub 2014 Jun 18. PMID: 24938475.
14	Labbé R.P., Vessillier S., Rafiq Q.A. Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives // Viruses. 2021. Vol. 13, № 8. P. 1528.	Labbé RP, Vessillier S, Rafiq QA. Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives. Viruses. 2021 Aug 2;13(8):1528.	doi: 10.3390/v13081528. PMID: 34452392; PMID: PMC8402758.

15	Liu C. et al. mRNA-based cancer therapeutics // Nat Rev Cancer. 2023. Vol. 23, № 8. P. 526–543.	Liu C, Shi Q, Huang X, Koo S, Kong N, Tao W. mRNA-based cancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 2023 Aug;23(8):526-543.	doi: 10.1038/s41568-023-00586-2. Epub 2023 Jun 13. PMID: 37311817
16	Qin S. et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases // Sig Transduct Target Ther. 2022. Vol. 7, № 1. P. 166.	Qin S, Tang X, Chen Y, Chen K, Fan N, Xiao W, Zheng Q, Li G, Teng Y, Wu M, Song X. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. Signal Transduct Target Ther. 2022 May 21;7(1):166.	doi: 10.1038/s41392-022-01007-w. PMID: 35597779; PMCID: PMC9123296.
17	Sayadmanesh A. et al. Strategies for modifying the chimeric antigen receptor (CAR) to improve safety and reduce toxicity in CAR T cell therapy for cancer // International Immunopharmacology. 2023. Vol. 125. P. 111093.	Sayadmanesh A, Yekehfallah V, Valizadeh A, Abedelahi A, Shafaei H, Shanebandi D, Basiri M, Baradaran B. Strategies for modifying the chimeric antigen receptor (CAR) to improve safety and reduce toxicity in CAR T cell therapy for cancer. Int Immunopharmacol. 2023 Dec;125(Pt A):111093.	doi: 10.1016/j.intimp.2023.111093. Epub 2023 Oct 26. PMID: 37897950
18	Wang H. et al. Strategies for Reducing Toxicity and Enhancing Efficacy of Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy in Hematological Malignancies // IJMS. 2023. Vol. 24, № 11. P. 9115.	Wang, H.; Tang, L.; Kong, Y.; Liu, W.; Zhu, X.; You, Y. Strategies for Reducing Toxicity and Enhancing Efficacy of Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy in Hematological Malignancies. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 9115.	doi: 10.3390/ijms24119115. PMID: 37298069; PMCID: PMC10252534
19	Zhang Z. et al. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering //	Zhang Z, Qiu S, Zhang X, Chen W. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. BMC Biotechnol. 2018 Jan 30;18(1):4.	doi: 10.1186/s12896-018-0419-0. PMID: 29378552; PMCID: PMC5789706.

	BMC Biotechnol. 2018. Vol. 18, № 1. P. 4.		
--	--	--	--