
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК [616.155.33:577.175.14]:57.08

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПОСОБОВ ДОСТАВКИ НУКЛЕАЗЫ Cas9 НА УРОВЕНЬ НОКАУТА В Т-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/Cas9 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ Jurkat

Е. С. ПОКЛАДОК¹⁾, А. Н. МЕЛЕШКО¹⁾, М. С. КИСЕЛЬ²⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский р-н, Беларусь

²⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Разработка аллогенных CAR-T-клеток представляет собой перспективное направление в иммунотерапии онкологических заболеваний, которое позволяет преодолеть ограничения, возникающие при использовании аутологичных Т-клеток. Одним из ключевых этапов создания таких клеток является эффективное введение в них компонентов системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. В настоящей статье рассматриваются стратегии оптимизации параметров электропорации нуклеазы Cas9 (мРНК, белок, плазмидный вектор) для повышения эффективности редактирования генома. Оптимизированный протокол может способствовать стандартизации производства аллогенных CAR-T-продуктов, улучшая их терапевтическую эффективность и безопасность.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; sgRNA; ген *TRAC*; ген *B2M*; нокаут; CAR.

Образец цитирования:

Покладок ЕС, Мелешко АН, Кисель МС. Исследование влияния способов доставки нуклеазы Cas9 на уровень нокаута в Т-лимфоцитах при использовании системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 на экспериментальной модели Т-клеточной линии Jurkat. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:38–47.
EDN: CDFFGG

For citation:

Pokladok KS, Meleshko AN, Kisel MS. Study of the impact of nuclease Cas9 delivery methods on knockout efficiency in T lymphocytes using the CRISPR/Cas9 genome editing system in the experimental T cell line model Jurkat. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:38–47. Russian.
EDN: CDFFGG

Сведения об авторах см. на с. 47.

Information about the authors see p. 47.

STUDY OF THE IMPACT OF NUCLEASE Cas9 DELIVERY METHODS ON KNOCKOUT EFFICIENCY IN T LYMPHOCYTES USING THE CRISPR/Cas9 GENOME EDITING SYSTEM IN THE EXPERIMENTAL T CELL LINE MODEL Jurkat

K. S. POKLADOK^a, A. N. MELESHKO^a, M. S. KISEL^b

^aRepublican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Barawliany 223053, Barawlianski sielsaviet, Minsk District, Belarus

^bInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus

Corresponding author: K. S. Pokladok (katena.pokladok@mail.ru)

Abstract. The development of allogeneic CAR-T cells represents a promising direction in cancer immunotherapy, overcoming the limitations of autologous approaches. One of the key steps in creating such cells is the efficient delivery of CRISPR/Cas9 genome editing components into them. This article explores strategies for optimising electroporation parameters for nuclease Cas9 (mRNA, plasmid vector, protein) to enhance genome editing efficiency. The optimised protocol may contribute to the standardisation of allogeneic CAR-T cell manufacturing, improving their therapeutic efficacy and safety.

Keywords: CRISPR/Cas9; sgRNA; gene *TRAC*; gene *B2M*; knockout; CAR.

Введение

Метод CAR-T-терапии онкологических заболеваний был разработан как терапия аутологичными Т-лимфоцитами, которые экспрессируют химерные антигенные рецепторы (*chimeric antigen receptor*, CAR), распознающие специфичные для опухолевых клеток мембранные антигены. Использование аутологичных клеток связано с рядом сложностей, таких как малое количество и сниженная функциональная активность Т-лимфоцитов у пациентов после химиотерапии. Аллогенные Т-клетки решают эти проблемы, но их прямое применение невозможно, во-первых, из-за развития реакции «трансплантат против хозяина» и, во-вторых, в связи с отторжением аллогенных Т-клеток иммунной системой реципиента [1].

В настоящем исследовании используем систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 для нокаута генов субъединицы альфа Т-клеточного рецептора (*TRAC*) и бета-2-микроглобулина (*B2M*), одной из цепей MHC I, в целях их элиминации с поверхности мембраны. Система CRISPR/Cas9 состоит из ДНК-эндонуклеазы Cas9 и sgRNA (*single guide RNA* – одиночная гидовая РНК), искусственной молекулы, представляющей собой гибрид таких РНК-компонентов, как 20-нуклеотидная последовательность гид РНК, комплементарная редактируемому участку генома, и scRNA (*scaffold RNA* – каркасная РНК). Оба компонента, белок Cas9 и sgRNA могут быть доставлены в клетку разными способами: в виде рибонуклеопротеина, или двух генов, или белка Cas9 независимо от sgRNA [2–5]. В случае редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9 эффективность процесса зависит не только от дизайна sgRNA [1], но и от формы доставки нуклеазы Cas9 (мРНК, белком Cas9 или плазмидным вектором).

Получение CAR-T-клеток требует стабильной генетической модификации (обычно путем ретровирусной трансдукции) для включения в геном экспрессионной кассеты CAR. Как правило, для редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 используют электропорацию мРНК белка Cas9, белком Cas9 и sgRNA. Такой способ обусловлен, во-первых, достаточной эффективностью доставки рибонуклеопротеиновых комплексов и, во-вторых, избеганием негативных эффектов конститутивной экспрессии белка Cas9, в частности *off-target*-эффекта редактирования.

Был разработан способ получения аллогенных CAR-T-клеток, при котором sgRNA доставляются в CAR-T-клетки в составе бицистронной конструкции лентивирусного вектора, который включает ген, кодирующий CAR, и двоянный ген двух sgRNA. Выбор оптимальных sgRNA и их промоторов был выполнен в исследовании [1]. Цель настоящей работы – оптимизация редактирования генов *TRAC* и *B2M* в лимфоцитах человека при получении CAR-T-продуктов путем выбора наилучшей формы доставки нуклеазы Cas9, а именно электропорации мРНК белка Cas9, белком Cas9 или плазмидной ДНК.

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В рамках данного исследования использовались модельные культуры Jurkat и НЕК293Т. Клетки линии НЕК293Т культивировали в полной среде DMEM (10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)), клетки линии Jurkat – в полной среде RPMI 1640 (10 % ЭТС) с добавлением

гентамицина (10 мкг/мл). Клеточная культура Jurkat является модельной культурой Т-лимфобластного лейкоза с конститутивной экспрессией CD3, IL-2, Т-клеточного рецептора.

Первичные Т-лимфоциты получали из периферической крови донора. Кровь наслаивали на 0,5 объема градиента плотности 1,077 г/мл (гистопак), находившегося при комнатной температуре, и центрифугировали при 400 g при комнатной температуре в течение 30 мин. После центрифугирования моноклеары крови локализовались в области кольца на границе раздела сыворотка – гистопак. Слой моноклеаров крови переносили в стерильную пробирку, дважды отмывали в растворе DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline* – фосфатно-солевой буфер Дульбекко) (центрифугировали при 250 g в течение 10 мин). Для изоляции Т-лимфоцитов использовали набор для иммуномагнитной селекции EasySep Human T-cell Isolation Kit (#17951; *Stemcell*, Канада). Культивирование проводили в полной среде RPMI с добавлением 10 % ЭТС, 100 МЕ/мл IL-2.

Используемые плазмиды и векторы. Для доставки белка Cas9 в составе плазмидного вектора использовали плазмиду lentiCas9-Blast (#52962; *Addgene*, США). Данный плазмидный вектор содержит в себе ген *Cas9* под эукариотическим промотором EF1a.

Получение вирусных частиц. За день до котрансфекции 3 млн клеток линии HEK293T засевали в чашку Петри (*Sarstedt Group*, Германия) для адгезивных культур, содержащую 10 мл полной ростовой среды DMEM, и инкубировали при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении суток. Котрансфекцию проводили с использованием линейного полиэтиленimina (ПЭИ) (25 кДа) в растворе с массовым соотношением ДНК : ПЭИ = 1 : 2. Трансфицирующая смесь включала 10,2 мкг трансферного вектора, 6 мкг плазмиды pCMV dR8.91, 3 мкг плазмиды pMD2.G и 38 мкг ПЭИ в 1,2 мл раствора DPBS. Котрансфекцию проводили в 11,0 мл бесывороточной среды DMEM в течение 6–16 ч с последующей сменой среды на полную. Через 48 ч собирали супернатант, фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм, концентрировали вирусные частицы центрифугированием при 3000 g в течение 16 ч при температуре 4 °C и хранили при температуре –80 °C.

Трансдукция. Полученный вирусный концентрат использовали для трансдукции клеточной культуры Jurkat. Трансдуцировали 50 тыс. клеток в присутствии 6 мкг/мл полибрена с множественностью инфекции MOI = 5 в условиях спинокуляции при 600 g в течение 90 мин. На следующие сутки сменили среду на полную среду RPMI 1640.

Селекция. Экспрессионная кассета, доставляемая в клеточную культуру Jurkat, имела в своем составе маркерный ген *EGFP*, а также ген устойчивости к пуромицину. После оценки уровня трансдукции в среду добавляли 1 мкг/мл пуромицина для получения культуры с высоким содержанием модифицированных Т-лимфоцитов.

Синтез мРНК белка Cas9. Синтез мРНК белка Cas9 производили набором HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) (#E2060S; *New England Biolabs*, США). Матрицей для гена *Cas9* служила плаزمида pET-20b(+)*Cas9*. Данный вектор получили путем молекулярного клонирования гена *Cas9* по сайтам рестрикции BamHI и NcoI в плазмидный вектор pET-20b(+) (#69739-3; *Addgene*). В полученном векторе ген *Cas9* находится под промотором T7.

Электропорация. Доставку нуклеазы Cas9 осуществляли посредством электропорации мРНК белка Cas9, синтетическим белком Cas9 (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) и плазмидной ДНК (lentiCas9-Blast) на приборе Neon Transfection System (*Thermo Fisher Scientific*, США). Используемый режим электропорации – 1600 В, 10 мс, 3 удара. Электропорировали пробы по 100 тыс. клеток в объеме 10 мкл буфера R, после электропорации их сразу же рассаживали в лунки с 200 мкл среды RPMI (10 % ЭТС) без добавления антибиотика. Через 72 ч определяли количество клеток в каждой лунке и рассчитывали их жизнеспособность.

Проточная цитометрия. Уровень нокаута генов *TRAC* и *B2M* определяли на приборе DxFLEX (*Beckman Coulter*, США) с использованием антител anti-CD3-ECD (*BD Biosciences*, США) и anti-B2M-PE/Cy5.5 (*Abcam*, Великобритания). Уровень жизнеспособности выявляли с помощью флуоресцентного красителя DAPI.

Результаты и их обсуждение

Для доставки системы CRISPR/Cas9 использовалась следующая стратегия. Две последовательности sgRNA для генов *TRAC* и *B2M* были клонированы в один лентивирусный вектор с геном, кодирующим CAR, для одновременной доставки sgRNA и CAR в клетки Т-лимфоцитов путем трансдукции. Нуклеаза Cas9 доставлялась отдельно методом электропорации одним из трех вариантов: в виде мРНК, белка и плазмиды с геном *Cas9* (рис. 1).

Трансферный вектор был собран на основе лентивирусного вектора lentiCRISPR, содержащего ген устойчивости к пуромицину на 5'-конце экспрессионной кассеты. В вектор lentiCRISPR v2 (#52961; *Addgene*) по сайтам рестрикции EcoRI и KpnI были клонированы sgRNA к генам *TRAC* и *B2M* [1] под

промоторами hU6 и mU6 соответственно [2]. По сайтам рестрикции BshTI и BamHI из исходного вектора (lentiCRISPR v2) удалили ген *Cas9* и на его месте клонировали кассету, состоящую из маркерного гена *EGFP* и химерного антигенного рецептора anti-CD19 (anti-CD19-CAR) (рис. 2).

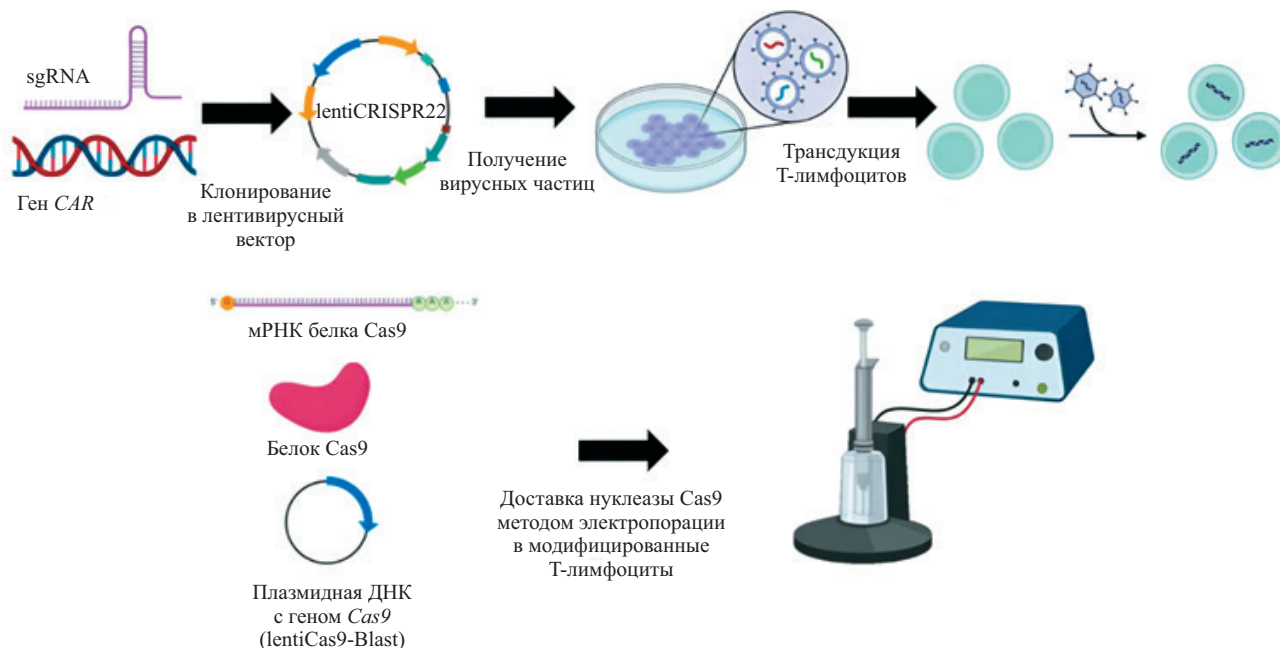


Рис. 1. Схема этапов доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 и CAR в клеточную культуру Т-лимфоцитов

Fig. 1. Schematic representation of the delivery stages of the CRISPR/Cas9 system components and CAR into T lymphocyte cell culture

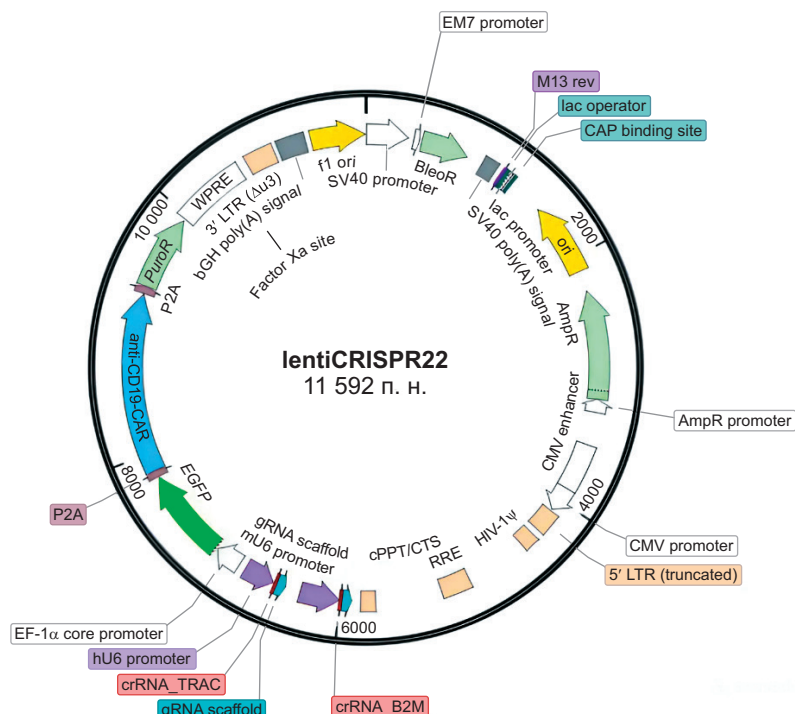


Рис. 2. lentiCRISPR22 – сконструированный вектор, содержащий экспрессионную кассету mhU6_PM – sgRNA – EGFP – anti-CD19-CAR – PuroR (ген устойчивости к пурамицину)

Fig. 2. lentiCRISPR22 is an designed vector containing the mhU6_PM – sgRNA – EGFP – anti-CD19-CAR – PuroR (puromycin resistance gene) expression cassette

Была проведена трансдукция Т-клеточной линии Jurkat лентивирусным вектором, содержащим экспрессионную кассету с CAR и sgRNA, как описано выше. Уровень трансдукции оценивался по флуоресценции репортерного гена *GFP*. Первоначальный уровень трансдукции составлял 75 %. Позже культура была обогащена трансдуцированными клетками путем селекции по гену устойчивости к пуромицину, после чего количество модифицированных клеток достигло 92 % (рис. 3).

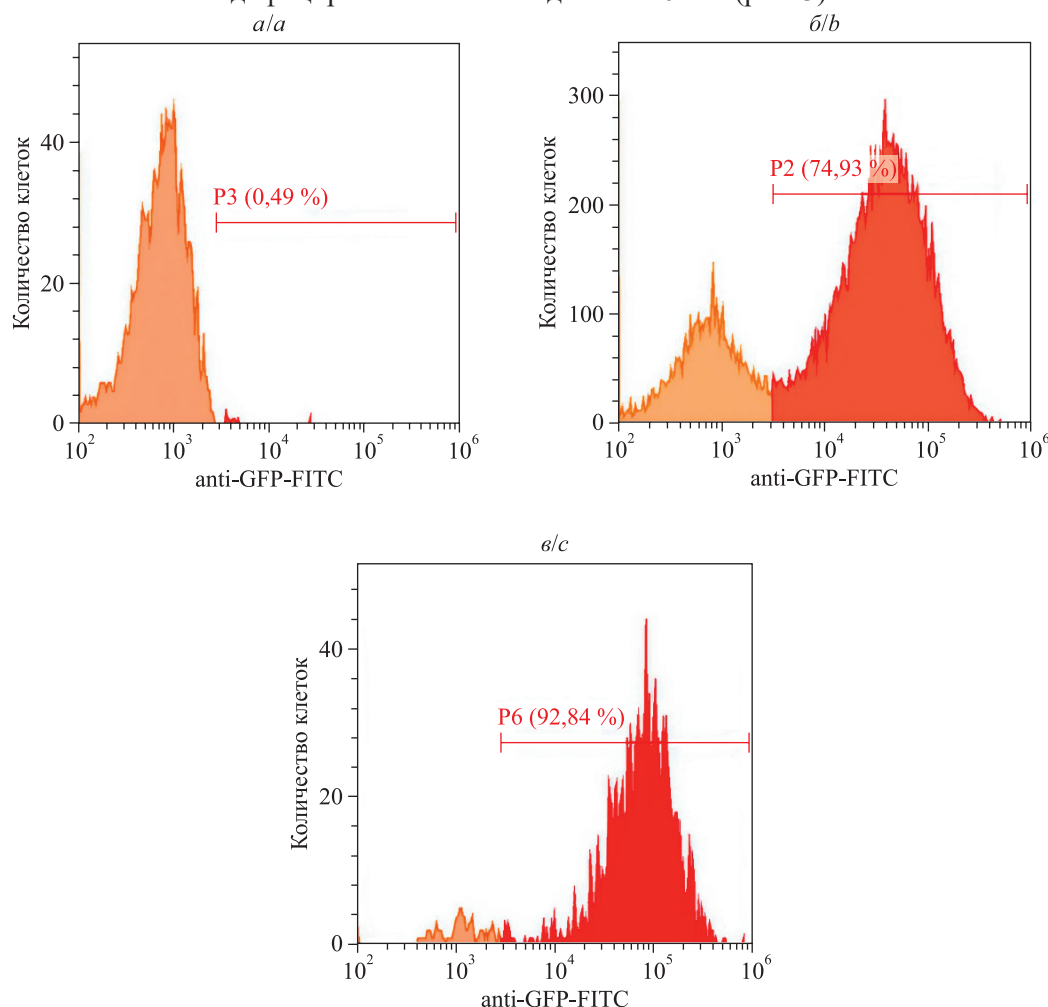


Рис. 3. Оценка эффективности трансдукции клеточной культуры Jurkat с последующей селекцией:
 а – состав клеточной культуры Jurkat, не проходившей процедуру трансдукции;
 б – состав клеточной культуры Jurkat на 3-и сутки после трансдукции (количество модифицированных клеток достигло 74 %);
 в – состав трансдуцированной клеточной культуры Jurkat на 2-е сутки после селекции (количество модифицированных клеток достигло 92 %).
 Окрашивание антителом anti-GFP-FITC

Fig. 3. Evaluation of transduction efficiency in Jurkat cell culture followed by selection:
 а – composition of Jurkat cell culture that did not undergo the transduction procedure;
 б – composition of Jurkat cell culture on the 3rd day after transduction (the number of modified cells reached 74 %);
 в – composition of Jurkat cell culture on the 2nd day after selection (the number of modified cells reached 92 %).

Antibody anti-GFP-FITC staining

После селекции была получена культура Т-лимфоцитов, содержащая 92 % клеток GFP+. Модифицированные клетки имели sgRNA к генам *TRAC* и *B2M*, а также CAR. Для активации системы редактирования CRISPR/Cas9 мы доставляли в клетки нуклеазу Cas9 методом электропорации мПНК, белком и плазмидой, кодирующей белок Cas9 (рис. 4). Режим электропорации подбирался нами ранее эмпирическим путем с целью сохранения баланса между жизнеспособностью клеточной культуры (более 85 % живых клеток) и уровнем доставки.

Оценку нокаута генов *TRAC* и *B2M* проводили методом проточной цитометрии по потере экспрессии CD3 (для гена *TRAC*) и B2M на 3-и, 7-е и 11-е сутки (рис. 5–7) для региона клеток GFP+. В качестве контроля использовали трансдуцированные клетки без электропорации.

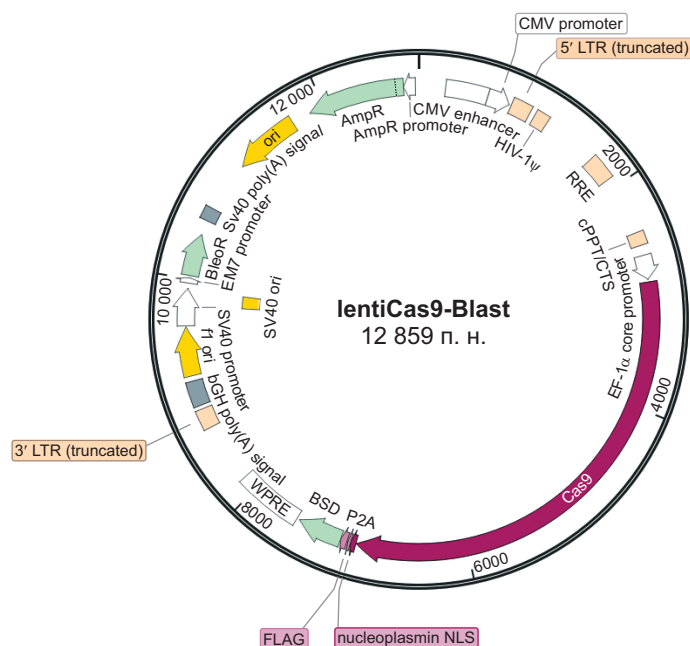


Рис. 4. lentiCas9-Blast – доставляемая электропорацией плаزمид, которая содержит ген *Cas9* под эукариотическим промотором EF-1 α

Fig. 4. lentiCas9-Blast is the plasmid delivered by electroporation, containing the gene *Cas9* under the eukaryotic EF-1 α promoter

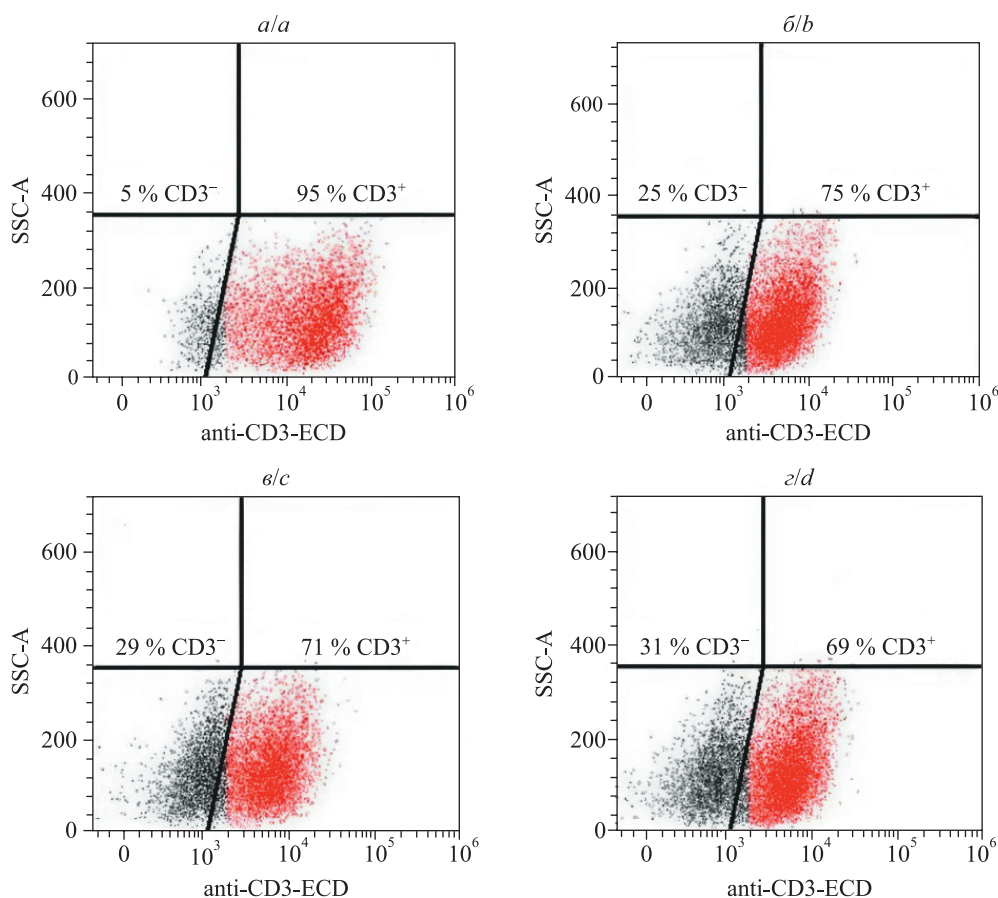


Рис. 5. Нокаут гена *TRAC* для клеточной культуры Jurkat на 11-е сутки после электропорации:

a – контроль; *б* – электропорация мРНК белка Cas9; *в* – электропорация белком Cas9; *г* – электропорация плазмидным вектором Cas9. Окрашивание антителом anti-CD3-ECD

Fig. 5. Knockout of the gene *TRAC* in Jurkat cell culture on the 11th day after electroporation: *a* – control; *b* – electroporation with protein Cas9 mRNA; *c* – electroporation with protein Cas9; *d* – electroporation with plasmid vector Cas9. Antibody anti-CD3-ECD staining

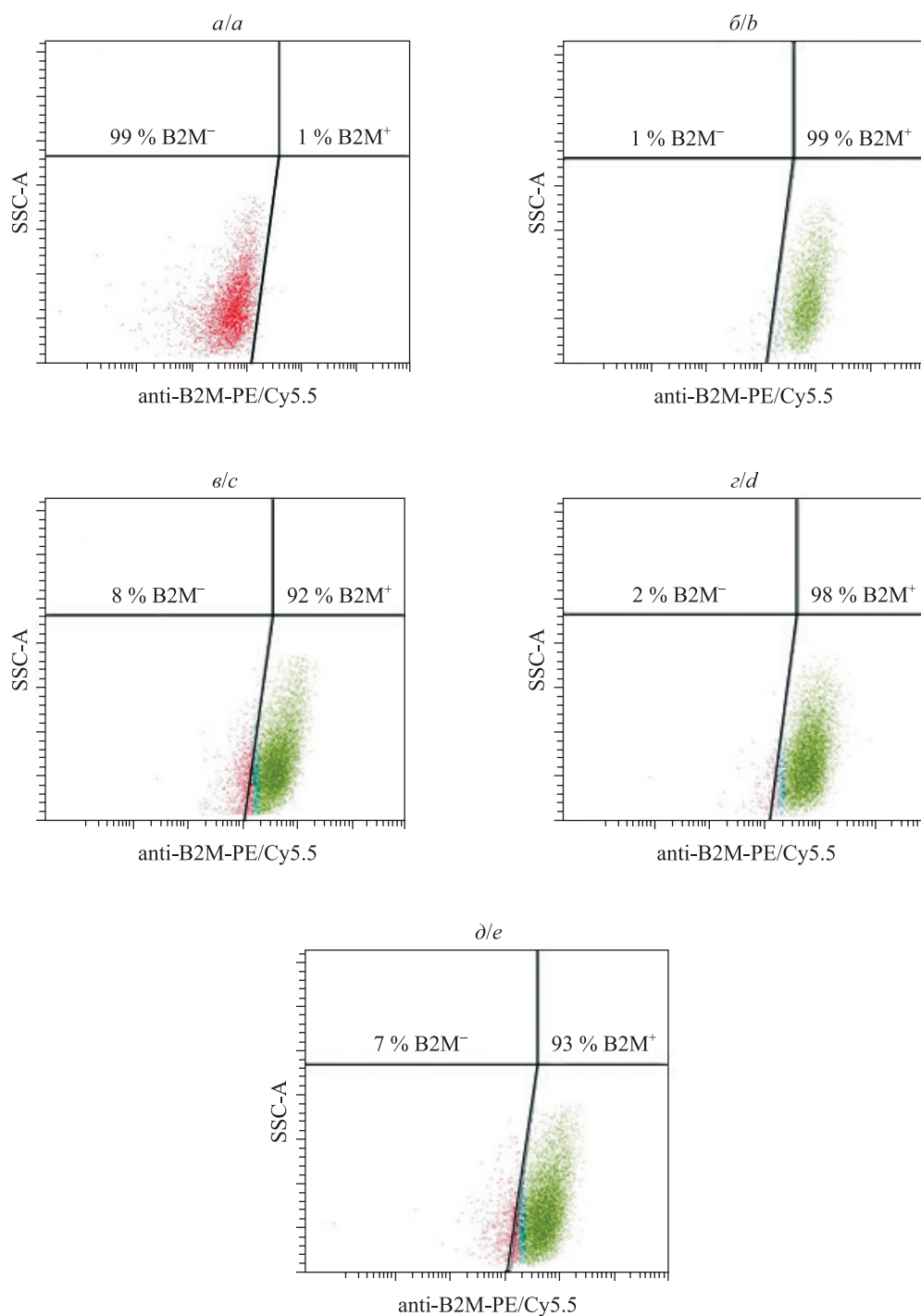


Рис. 6. Нокаут гена *B2M* для клеточной культуры Jurkat на 11-е сутки после электропорации:
a – не окрашенный антителом контроль; *б* – окрашенный антителом контроль;
в – электропорация мРНК белка Cas9; *г* – электропорация белком Cas9;
д – электропорация плазмидным вектором Cas9.
 Окрашивание антителом anti-B2M-PE/Cy5.5

Fig. 6. Knockout of the gene *B2M* in Jurkat cell culture on the 11th day after electroporation:
a – unstained antibody control; *b* – stained antibody control;
c – electroporation with protein Cas9 mRNA; *d* – electroporation with protein Cas9;
e – electroporation with plasmid vector Cas9.
 Antibody anti-B2M-PE/Cy5.5 staining

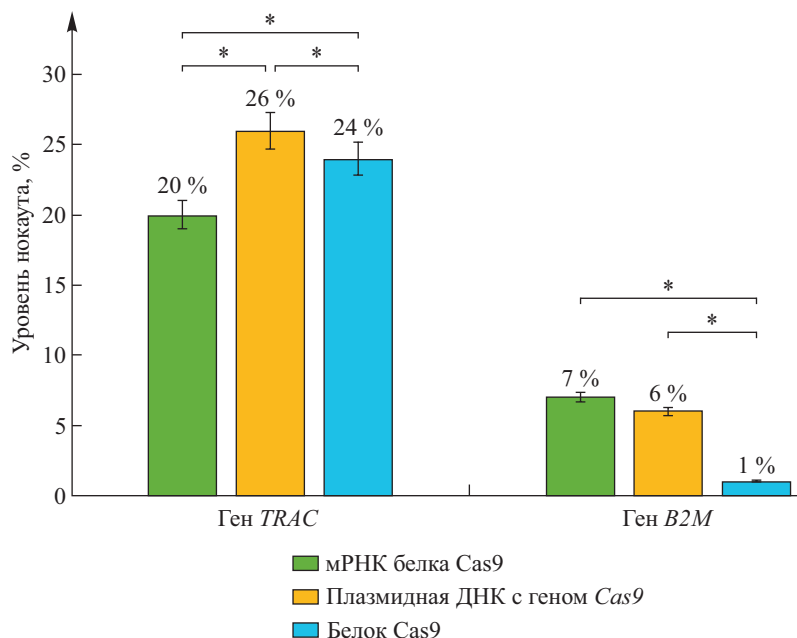


Рис. 7. Зависимость эффективности нокаута генов *TRAC* и *B2M* от способа доставки нуклеазы Cas9 в клеточную культуру Jurkat. Знаком * отмечены достоверные различия ($p < 0,05$).

Статистическая обработка данных производилась с использованием *U*-критерия Манна – Уитни

Fig. 7. Knockout efficiency dependence of the genes *TRAC* and *B2M* on the nuclease Cas9 delivery method to Jurkat cell culture.

Sign * marked significant differences ($p < 0.05$).

Data were analysed using the Mann – Whitney *U*-test

По мере увеличения времени культивирования полученных клеточных культур наблюдался прирост популяции, негативной по TCR и МНСI. Данный факт свидетельствует о сохранении их пролиферативной активности после всех проведенных процедур модификации.

Как видно из экспериментальных данных (см. рис. 7), нокаут гена *TRAC* достоверно выше при электропорации плазмидной ДНК с геном *Cas9* ($26 \pm x$ %), чем мРНК ($20 \pm xx$ %, $p = 0,02$) и белком *Cas9* ($24 \pm xx$ %, $p = 0,04$). Для нокаута гена *B2M* не было выявлено существенных различий в использовании мРНК и плазмиды с геном *Cas9*, однако применение белка *Cas9* характеризовалось наименьшим выходом целевых клеток (около 1 %). Нокаут гена *B2M* при доставке мРНК и плазмиды с геном *Cas9* (7 %, $p = 0,03$) был достоверно более эффективным, чем при использовании белка (1 %, $p = 0,03$). Нокаут гена *B2M* более низкий, чем нокаут гена *TRAC*, что было замечено в других исследованиях [4]. Предполагаемая причина – более сложная эпигенетическая упаковка гена *B2M*. Также влияние на общую жизнеспособность первичных Т-клеток может оказывать отсутствие МНСI. Рост популяции МНСI-негативных клеток при культивировании (3-и, 7-е и 11-е сутки) может объясняться адаптацией и выходом из состояния стресса, вызванного электропорацией. Нокаут гена *TRAC* более критичен, чем нокаут гена *B2M*, поскольку он определяет риск развития реакции «трансплантат против хозяина», тогда как сохранение белка *B2M* на части клеток приведет к снижению персистенции CAR-T-клеток, но не к появлению осложнений.

Редактирование генома с доставкой нуклеазы *Cas9* в виде плазмидной ДНК не является распространенным подходом. Выгода от применения этого способа состоит в значительно более низкой стоимости получения плазмидной ДНК по сравнению со стоимостью синтеза мРНК или белка. Однако согласно некоторым данным применение метода электропорации плазмидной ДНК не эффективно в отношении первичных Т-лимфоцитов человека в связи с сильным падением общей жизнеспособности клеток [6]. Мы получили аналогичные результаты (рис. 8).

Уровень редактирования около 25 % Т-клеток кажется невысоким. Преимущество лентивирусной доставки sgRNA при трансдукции вместе с CAR состоит в том, что нокаут выбранных генов будет происходить только в CAR-T-клетках, не затрагивая остальные клетки, а уровень трансдукции в условиях клинического производства CAR-T-клеток составляет 20–50 %. Таким образом, иммуномагнитной деплеции TCR-положительных клеток будет достаточно для приемлемого выхода отредактированных CAR-T-клеток.

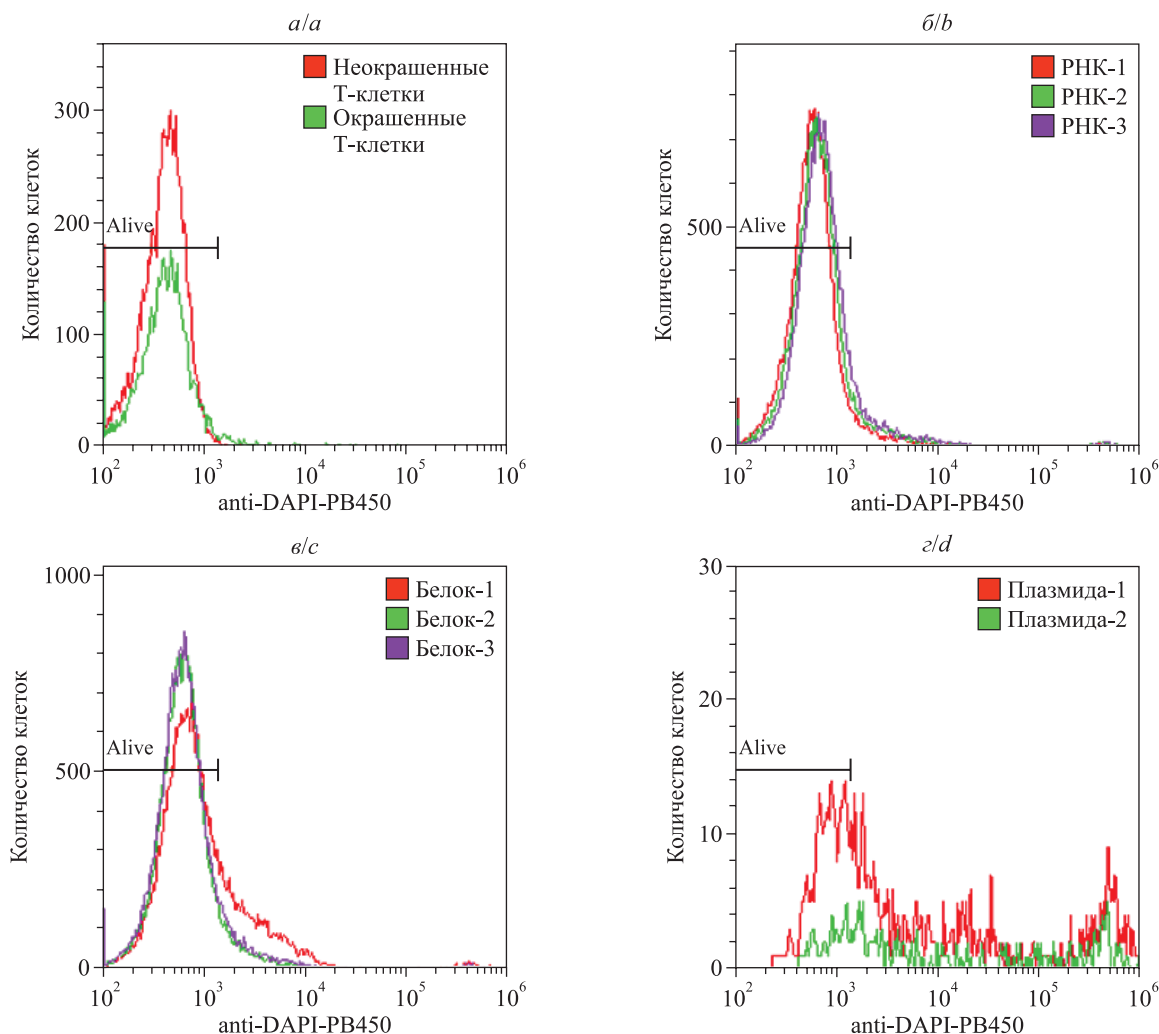


Рис. 8. Экспериментальные данные по влиянию способа доставки нуклеазы Cas9 методом электропорации на жизнеспособность первичных Т-лимфоцитов: *a* – контрольные трансдуцированные образцы, не проходившие электропорацию (средняя жизнеспособность составила 91 %); *б* – трансдуцированные и электропорированные мРНК Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 84 %); *в* – трансдуцированные и электропорированные белком Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 76 %); *г* – трансдуцированные и электропорированные плазмидным вектором Т-клетки (средняя жизнеспособность составила 27 %).
Окрашивание антителом anti-DAPI-PB450

Fig. 8. Experimental data on the impact of nuclease Cas9 delivery method by electroporation on the viability of primary T lymphocytes: *a* – control transduced samples not subjected to electroporation (average viability was 91 %); *b* – transduced and electroporated mRNA T cells (average viability was 84 %); *c* – transduced and electroporated protein T cells (average viability was 76 %); *d* – transduced and electroporated plasmid vector T cells (average viability was 27 %).
Antibody anti-DAPI-PB450 staining

Закключение

На экспериментальной модели Т-клеточной линии Jurkat мы отработали способ редактирования генов *TRAC* и *B2M*, сопряженный с введением гена, кодирующего CAR. С этой целью лучшие кандидаты sgRNA были включены в бицистронный лентивирусный вектор под промоторами U6, а нуклеаза Cas9 доставлялась в клетки методом электропорации мРНК, белком и плазмидной ДНК. Сравнительный анализ показал, что наилучшим способом редактирования оказалась доставка плазмидной ДНК с геном *Cas9*. Эффективность редактирования гена *B2M* достоверно ниже нокаута гена *TRAC*. При проведении эксперимента на первичных лимфоцитах в аналогичных условиях было подтверждено негативное влияние плазмидной ДНК на общую жизнеспособность культуры после электропорации. Метод нуждается в совершенствовании, направленном на увеличение выхода целевых клеток (негативных по экспрессии B2M и MHC I и экспрессирующих CAR) для получения аллогенных CAR-T-продуктов, однако он является пригодным для применения в экспериментальных целях.

Библиографические ссылки

1. Кушнерова ЕВ, Мигас АА, Клыч АВ, Ласюков ЕА, Мелешко АН. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:19–26. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-2-19-26.
2. Покладок ЕС, Мелешко АН, Кушнерова ЕВ. Оценка эффективности нокаута Т-клеточного рецептора и МНСI в клетках Т-лимфоцитов с использованием различных экспрессионных кассет. В: Мартинович Г, Волотовский ИД, Лукьяненко ЛМ, Слобожанина ЕИ, Кабашникова ЛФ, Вересов ВГ и др., редакторы. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции; 25–27 июня 2024 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2024. с. 263–264.
3. Kagoya Y, Guo T, Yeung B, Saso K, Anczurowski M, Wang C-H, et al. Genetic ablation of HLA class I, class II, and the T cell receptor enables allogeneic T cells to be used for adoptive T cell therapy. *Cancer Immunology Research*. 2020;8(7):926–936. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0508.
4. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(9):2255–2266. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300.
5. Stenger D, Stief TA, Kaeuferle T, Willier S, Rataj F, Schober K, et al. Endogenous TCR promotes *in vivo* persistence of CD19-CAR-T cells compared to a CRISPR/Cas9-mediated TCR knockout CAR. *Blood*. 2020;136(12):1407–1418. DOI: 10.1182/blood.2020005185.
6. Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, Foster AE, Vera JF, Manuri PR, et al. Optimization of the *PiggyBac* transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*. 2009;32(8):826–836. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ad762b.

Получена 03.07.2025 / исправлена 25.08.2025 / принята 25.08.2025.
Received 03.07.2025 / revised 25.08.2025 / accepted 25.08.2025.

Авторы:

Екатерина Сергеевна Покладок – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Александр Николаевич Мелешко – ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Мария Сергеевна Кисель – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологий.

Authors:

Kathrine S. Pokladok, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
katena.pokladok@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0009-1444-4714>
Alexander N. Meleshko, leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
meleshko@tut.by
<https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>
Maryia S. Kisel, researcher at the laboratory of molecular diagnostics and biotechnology.
marusen.kee@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3432-0064>