



Горбач Е.И.✉, Мигас А.А., Вашкевич Е.П., Игнатович А.С., Шман Т.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Лабораторные исследования в оценке безопасности биомедицинского клеточного продукта естественных киллерных клеток, полученных для целей противоопухолевой адоптивной клеточной иммунотерапии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: оценка параметров безопасности ЕК-клеточного продукта: контаминация фидерной культурой и опухолевая трансформация генов с-Мус, hTERT; написание текста – Горбач Е.И.; концепция исследования, редактирование – Шман Т.В.; анализ данных, редактирование – Мигас А.А.; получение клеточного продукта, редактирование – Вашкевич Е.П.; оценка микробиологической безопасности – Игнатович А.С.

Подана: 22.08.2022

Принята: 14.11.2022

Контакты: katringorbach.biology@yandex.by

Резюме

Введение. Естественные киллерные (ЕК) клетки обладают высокой противоопухолевой и противовирусной активностью. Получение биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе ЕК-клеток в объеме, необходимом для эффективного клинического применения, является нетривиальной задачей. ЕК-клетки, экспансированные *ex vivo* в присутствии генетически модифицированных клеток линии K-562, широко используются в клинических исследованиях у пациентов с онкологическими заболеваниями. Как и любой БМКП, данный клеточный продукт должен соответствовать определенным требованиям безопасности. В дополнение к базовым параметрам (микробиологическая чистота, содержание целевой популяции клеток) в контроль качества описываемого БМКП должны быть включены критерии, учитывающие особенности технологии его получения.

Цель. Оценка микробиологической и онкогенной безопасности БМКП ЕК-клеток, полученных методом экспансии с фидерными клетками для целей адоптивной иммунотерапии.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись 27 образцов продуктов ЕК-клеток доноров до и после проведения экспансии. В качестве параметров безопасности конечного клеточного продукта определяли потенциальную контаминацию фидерными клетками, экспрессию маркеров злокачественной трансформации, микробиологическую чистоту и контаминацию микоплазмой методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Было показано, что полученные БМКП ЕК-клеток соответствовали критериям микробиологической чистоты, отсутствовала контаминация фидерной культурой, а также отсутствовали признаки злокачественной трансформации полученных клеток. Было выявлено достоверное снижение экспрессии с-Мус в конечных



клеточных продуктах по сравнению с исходным материалом, выявлена зависимость между уровнем экспрессии hTERT в конечных БМКП и длительностью культивирования клеток.

Заключение. Экспансия ЕК-клеток с использованием генно-инженерной фидерной культуры при условии соблюдения технологии позволяет получить БМКП, соответствующий установленным требованиям безопасности.

Ключевые слова: естественные киллерные клетки, биомедицинский клеточный продукт, уровень экспрессии, c-Myc, hTERT, микоплазма, BCR-ABL

Gorbach E.✉, Migas A., Vashkevich K., Ignatovich A., Shman T.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Laboratory Studies in Assessing the Safety of a Biomedical Natural Killer Cell Product Obtained for the Purposes of Antitumor Adoptive Cellular Immunotherapy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: evaluation of safety parameters of the NK cell product: feeder culture contamination and tumor transformation of the c-Myc and hTERT genes; text writing – Gorbach E.; conceptual research, editing – Shman T.; data analysis, editing – Migas A.; obtaining a cellular product, editing – Vashkevich K.; assessment of microbiological safety – Ignatovich A.

Submitted: 22.08.2022

Accepted: 14.11.2022

Contacts: katringorbach.biology@yandex.by

Abstract

Introduction. Natural killer (NK) cells have high antitumor and antiviral activity. Obtaining a biomedical cell product (BMCP) based on NK cells in the amount necessary for effective clinical use is a nontrivial task. NK cells expanded ex vivo in the presence of genetically modified K-562 cells are widely used in clinical trials in cancer patients. Like any BMCP, this cell product must meet certain safety requirements. In addition to the basic parameters (microbiological purity, content of the target cell population), the quality control of the described BMCP should include criteria co criteria taking into account specific technological features of its production.

Purpose. Evaluation of microbiological and oncogenic safety of BMCP NK cells obtained by expansion with feeder cells for purposes of adoptive immunotherapy.

Materials and methods. Materials for the study consisted of 27 samples obtained from donors NK cells products before and after expansion. Potential contamination by feeder cells, expression of malignant transformation markers, microbiological purity, and mycoplasma contamination by real-time polymerase chain reaction were determined as safety parameters for the final cellular product.

Results. It was found that the obtained BMCPs of NK cells met the criteria of microbiological purity, and there was no contamination by feeder culture, as well as no signs of malignant

transformation of cells. A significant decrease in c-Myc expression level in the final cell products was revealed in comparison with the baseline, and a correlation between hTERT expression level in the final BMCPs and the duration of cell cultivation was detected.

Conclusion. Expansion of NK cells using genetically engineered feeder culture, given compliance with the technology, makes it possible to obtain BMCP that meets the established safety requirements.

Keywords: natural killer cells, biomedical cell product, expression level, c-Myc, hTERT, mycoplasma, BCR-ABL

■ ВВЕДЕНИЕ

Клеточная иммунотерапия активно внедряется в схемы лечения онкологических заболеваний. Преимуществами использования естественных киллерных клеток в онкологии являются их высокая врожденная противоопухолевая активность, а также безопасность для пациента даже при использовании аллогенных клеток. Основными направлениями применения аллогенных ЕК-клеток в онкогематологии являются: терапия пациентов с первичными острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ); терапия рецидивов острых лейкозов; профилактика рецидивирования лейкозов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [15]. Одним из способов получения ЕК-клеток является их экспансия из клеток периферической крови в присутствии генно-инженерных фидерных (стимуляторных) клеток. Широко используемыми в клинических исследованиях фидерными культурами являются клетки, полученные на основе линии K-562, модифицированной для экспрессии костимуляторного лиганда 4-1BBL и мембраносвязанной формы интерлейкина ИЛ-15 или ИЛ-21 [17]. Ранее мы получили собственную фидерную линию клеток на основе K-562 с эктопической экспрессией 4-1BBL и мембранно-связанного рекомбинантного варианта ИЛ-21 [14], которая в настоящее время используется для стимуляции экспансии ЕК-клеток при получении биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) в рамках клинических исследований (NCT05272293, NCT05334693) для иммунотерапии пациентов с ОМЛ.

Основным требованием к любому клеточному продукту является его безопасность, определяемая следующими параметрами: содержание целевой популяции клеток, отсутствие примесей нежелательных компонентов, отсутствие микробной контаминации, отсутствие признаков злокачественной трансформации и др. [21].

В случае экспансии ЕК-клеток с использованием фидерных клеток к нежелательным компонентам в конечном БМКП относятся сами фидерные клетки. Отсутствие в БМКП примеси живых фидерных клеток можно оценивать как иммунофенотипически, так и по уровню экспрессии химерного онкогена Bcr-Abl1. Экспрессия онкогена Bcr-Abl1 – продукта транслокации t(9;22) – является одним из молекулярных маркеров хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) [13]. Клетки линии K-562 характеризуются экспрессией данного химерного транскрипта, что позволяет использовать его в качестве маркера контаминации конечного ЕК-клеточного продукта клетками фидерной культуры.



Микробиологический контроль является ключевым аспектом процесса получения и оценки качества любых БМКП. Для получения микробиологически чистого клеточного продукта необходимо соблюдение ряда требований: работа в помещении соответствующего класса чистоты, использование стерильных реагентов и расходных материалов, проведение забора исходного клеточного материала в асептических условиях, проведение регулярного микробиологического контроля на всех этапах получения БМКП. В настоящее время применяются различные подходы для оценки микробиологической чистоты БМКП: визуальный контроль клеточной культуры и окраска образцов по Грамму, использование специальных сред для выявления микроорганизмов в автоматических анализаторах, проведение ПЦР-тестов для детекции микоплазмы и др.

Еще одним этапом оценки безопасности БМКП является контроль его онкогенности (туморогенности). Такой контроль является необходимым для тех БМКП, которые получают в процессе длительного культивирования, в результате чего возможна злокачественная трансформация клеток. В выполненной нами работе в качестве теста на опухолевую трансформацию был использован анализ уровней экспрессии генов *c-Myc* и *hTERT*.

Протоонкоген *c-Myc* входит в семейство транскрипционных факторов *b-HLH*. Белок *c-Myc* локализуется в ядрах клеток и участвует в регуляции роста, дифференцировки, метаболизма и апоптоза клеток, а также контролирует клеточный цикл, синтез белка и клеточную адгезию [1, 2]. Экспрессия *c-Myc* регулируется факторами роста и контактами внеклеточного матрикса. Уровень экспрессии *c-Myc* в покоящихся клетках низкий, но как только клетка вступает в клеточный цикл, он быстро нарастает, а затем снижается и остается на базовом уровне в циркулирующих клетках. В онкогенной форме *c-Myc* может экспрессироваться от умеренных до высоких уровней и не реагировать на внешние сигналы, что и делает его одним из наиболее важных онкогенов человека [4, 6]. Разрегуляция работы данного локуса может возникать на уровнях эпигенетического контроля экспрессии, транскрипции, трансляции, в результате возникновения хромосомных транслокаций и амплификации гена, но редко является следствием прямой мутации самого гена *c-Myc* [4, 7]. Нарушение регуляции гена *c-Myc* приводит к злокачественной трансформации клетки: неконтролируемая пролиферация, избегание иммунного надзора, иммортализация, метастазирование, нестабильность генома и неконтролируемый ангиогенез [5, 12]. Как онкоген *c-Myc* избыточно экспрессируется в клетках большинства видов рака человека и является драйвером возникновения около 40% всех опухолей. Поэтому в ряде клинических протоколов оценка уровня экспрессии *c-Myc* используется как показатель оценки безопасности в отношении опухолевой трансформации клеточных продуктов [4].

Теломеразный комплекс человека состоит из двух субъединиц, каждая из которых включает в свой состав следующие компоненты: теломеразную обратную транскриптазу (*TERT*), РНК-компонент (*TERC*) и белок дискерин (*DKC1*). Экспрессия гена *hTERT*, кодирующего белок *TERT*, в норме отсутствует или определяется на низком уровне в соматических клетках. Лимфоциты входят в группу соматических клеток, в которых обнаруживается экспрессия гена *hTERT* и, соответственно, теломеразная активность [10]. Теломеразная активность строго контролируется в процессе развития, дифференцировки и активации как Т-, так и В-лимфоцитов. Несмотря на то, что основной функцией теломеразы считается удлинение теломерных участков

хромосом, она также выполняет много неканонических, т. е. не связанных с теломерами, функций: взаимодействие с сигнальными путями, защита от стресса, регуляция структуры хроматина, связывание и защита митохондриальной ДНК [11]. Одним из признаков злокачественной трансформации клетки является ее иммортализация: уклонение от репликативного старения и пролиферация без ограничений. Данный феномен зачастую возникает благодаря реактивации теломеразы в соматических клетках [10]. Высокий уровень теломеразной активности обнаруживается в клетках опухолевого клона в 90% различных типов злокачественных новообразований [9]. Сверхэкспрессия гена hTERT в опухолевых клетках достигается благодаря разнообразным генетическим и эпигенетическим механизмам, включая амплификацию локуса либо его структурные перестройки, различные мутации и эпигенетические модификации промотора hTERT [8]. Следовательно, теломераза и другие компоненты теломер представляют собой диагностический и прогностический биомаркер рака и являются мишенью для разработки терапевтических средств [10].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка микробиологической и онкогенной безопасности БМКП ЕК-клеток, полученных методом экспансии с фидерными клетками для осуществления адоптивной иммунотерапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал доноров

В работу были включены образцы мононуклеарных клеток (МНК) 27 гаплоидентичных доноров с медианой возраста 36 лет (диапазон 16–50). Критериями включения в группу доноров были: HLA-гаплоидентичный родственный донор; возраст >16 лет; негативность по ВИЧ, гепатитам В и С; отсутствие беременности или грудного вскармливания. От всех доноров было получено информированное добровольное согласие.

Получение клеточного продукта. Из 50–250 мл периферической крови методом градиентного центрифугирования выделяли МНК. Экспансию ЕК-клеток стимулировали путем совместного культивирования МНК с облученными (100 Гр) фидерными клетками ранее полученной нами линии K562-41BBL-mbIL21 [14] в соотношении 2:1 на начало экспансии и 1:1 – на 7-е сутки. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и ИЛ-2 (50 МЕ/мл; препарат ронколейкин, НПК «БИОТЕХ», Россия) в течение 11–25 сут.

Микробиологическая безопасность. Стерильность оценивали с использованием автоматического бактериологического анализатора BACT/ALERT 3D (bioMérieux, Франция) на 0 сутки, за 7 суток до предполагаемого введения клеток и в конечном клеточном продукте.

Контаминацию микоплазмой оценивали в материале МНК донора, а также конечном клеточном продукте методом ПЦР в соответствии с методикой, описанной ранее [19].

Контаминация фидерными клетками. Возможное наличие остаточных фидерных клеток в конечном клеточном продукте оценивали методом полуколичественной ПЦР в режиме реального времени со специфичными к химерному транскрипту BCR-ABL1 олигонуклеотидными праймерами и пробой. Ген «домашнего хозяйства»



Перечень олигонуклеотидных праймеров и проб для проведения анализа методом ПЦР
List of oligonucleotide primers and probes for PCR analysis

Название	Последовательность 5'-3'
cMYC_F	CCTGGTGCTCCATGAGGAGA
cMYC_R	GCCTGCCTCTTTCCACAGA
cMYC_Pr	FAM-ACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAAC-BHQ
hTERT_F	TACGTCGTGGGAGCCAGAAC
hTERT_R	CCTTCACCTCGAGGTGAGA
hTERT_Pr	FAM-TTCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGA-BHQ

Gus использовали в качестве контрольного гена, по нему же проводили нормализацию в соответствии с описанной ранее методикой [20].

Опухолевая трансформация. В качестве маркеров злокачественной трансформации ЕК-клеточного продукта определяли уровни экспрессии генов с-Мус и hTERT методом полуколичественной ПЦР в режиме реального времени с нормализацией по гену «домашнего хозяйства» Gus. Олигонуклеотидные праймеры и пробы подбирали с использованием веб-приложения Primer-BLAST (см. таблицу).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 8, построение графиков осуществляли с использованием приложения GraphPad Prism 6. Статистически значимые различия экспрессии анализируемых генов в группах определяли с использованием критерия Манна – Уитни и парного Т-критерия Вилкоксона, т. к. данные не соответствовали нормальному распределению. Уровень статистически значимых различий принимали за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы нами были проанализированы ЕК-клеточные продукты от 27 доноров. Все конечные клеточные продукты соответствовали критериям микробиологической чистоты, контаминации микоплазмой выявлено не было.

Экспансия ЕК-клеток *ex vivo* из материала МНК доноров включает в себя этап их совместного культивирования с фидерными клетками, полученными путем генетической модификации иммортализованной культуры К-562. Перед внесением в культуру МНК фидерные клетки облучают в дозе 100 Гр, что предотвращает их пролиферацию. Контроль возможной контаминации конечного продукта фидерными клетками оценивают с использованием полуколичественной ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидов, специфичных к химерному транскрипту BCR-ABL1, характерному для линии К-562. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяет выявлять единичные транскрипты данного химерного онкогена в исследуемом образце. В результате проведенного анализа не было обнаружено транскриптов BCR-ABL1 ни в одном из конечных клеточных продуктов, что свидетельствует об отсутствии пролиферации фидерных клеток в совместной культуре.

В качестве маркеров потенциальной злокачественной трансформации ЕК-клеток в процессе их экспансии *ex vivo* использовали уровни экспрессии генов с-Мус и

hTERT (рис. 1). Анализ указанных параметров показал, что уровень экспрессии гена с-Мус в исходном материале МНК доноров был достоверно выше, чем в конечных клеточных продуктах ($p=0,002$). Уровень экспрессии гена hTERT в исходном материале доноров достоверно не отличался от соответствующих показателей в конечных клеточных продуктах ($p=0,89$).

Следует отметить, что описываемая технология экспансии ЕК-клеток *ex vivo* позволяет варьировать продолжительностью культивирования и количеством стимулирующей фидерной культурой с целью увеличения выхода конечного клеточного продукта. Поэтому для исследования влияния длительности культивирования на уровень экспрессии с-Мус и hTERT анализируемая выборка была разделена на две группы (<17 сут., ≥ 17 сут.), основываясь на медианном значении длительности ведения культуры (рис. 2). Проведенный анализ показал, что уровни экспрессии гена с-Мус ($p=0,83$, $n=27$) достоверно не отличались в исходном материале МНК ($p=0,829$, $n=27$) и конечном клеточном продукте ($p=0,48$, $n=27$) в исследуемых группах (рис. 2а, с). Аналогичный анализ для гена hTERT (рис. 2b, d) также не показал значимых различий для исходного материала МНК ($p=0,63$, $n=25$), однако наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии гена hTERT с увеличением продолжительности культивирования клеток донора *ex vivo* ($p=0,001$, $n=24$).

В качестве доноров исходного материала МНК для получения БМКП ЕК-клеток в нашем исследовании выступали родственники первой линии. Данная группа имеет существенную возрастную гетерогенность, что, предположительно, может влиять на уровни экспрессии анализируемых генов в исходном материале и клеточном продукте. В связи с этим выборка была разбита на две группы по медиане возраста (36 лет). Проведенный анализ показал, что уровни экспрессии гена с-Мус (рис. 3а, с) в исходном материале ($p=0,73$, $n=25$) и конечном клеточном продукте ($p=0,85$, $n=25$), а также гена hTERT (рис. 3b, d) в материале МНК ($p=0,42$, $n=22$) и ЕК-клеток ($p=0,94$, $n=22$) не зависят от возраста донора.

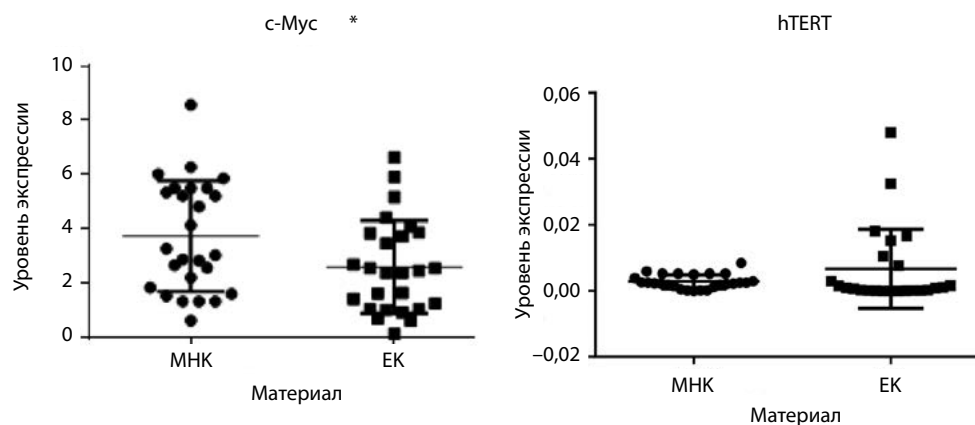


Рис. 1. Уровень экспрессии генов с-Мус и hTERT в МНК и ЕК-клеточных продуктах
Fig. 1. Expression level of c-Myc and hTERT genes in MNCs and NK cell products

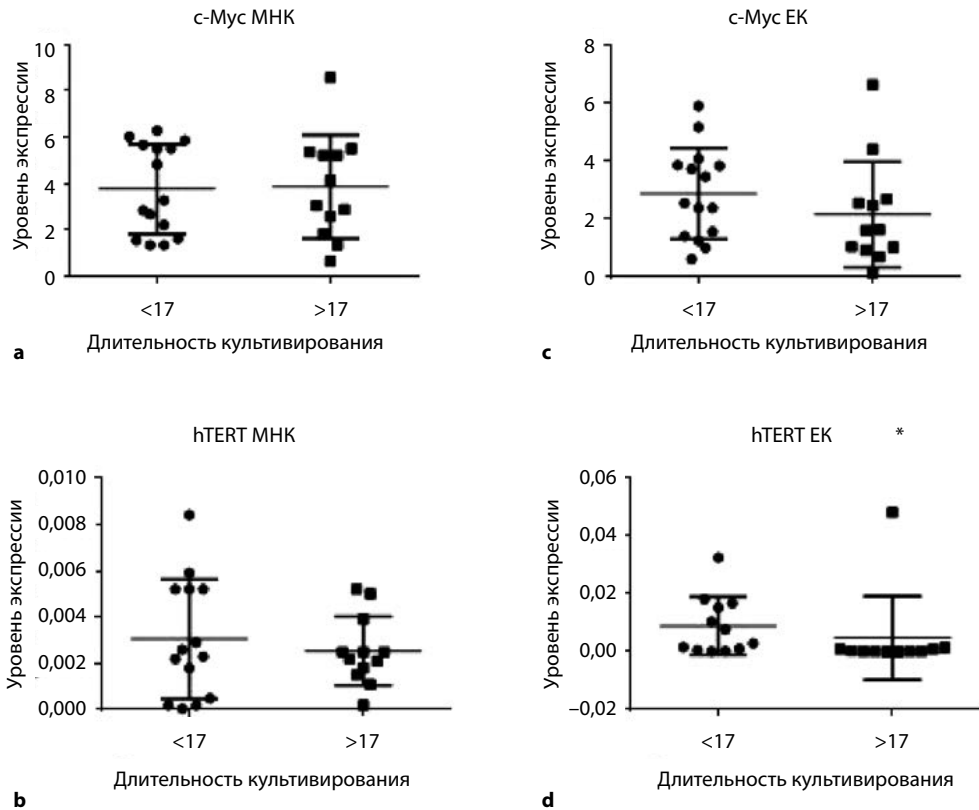


Рис. 2. Зависимость уровней экспрессии генов c-Myc и hTERT от длительности культивирования
Fig. 2. Dependence of c-Myc and hTERT genes expression levels on the duration of cultivation

На основании общепринятых стандартов [21], а также с учетом особенности описываемой технологии получения БМКП EK-клеток был разработан перечень критериев, позволяющих оценить безопасность соответствующего клеточного продукта:

- микробиологическая чистота (да/нет);
- содержание целевой популяции клеток (>90%) и их жизнеспособность (>80%);
- контаминация фидерной культурой, оцениваемая по наличию в конечном клеточном продукте транскриптов химерного онкогена BCR-ABL1 (да/нет);
- отсутствие признаков злокачественной трансформации конечного клеточного продукта, оцениваемое по росту уровней экспрессии генов c-Myc и hTERT (да/нет).

Ранее было показано, что использование разработанной нами фидерной культуры для стимуляции экспансии EK-клеток позволяет получить клеточный продукт с содержанием целевой популяции (CD3-C56+ лимфоциты) на уровне более 90% и жизнеспособностью клеток более 80% [18, 22].

В ходе данного исследования не было выявлено ни одного случая микробной контаминации, в том числе микоплазмой, конечного клеточного продукта (n=27),

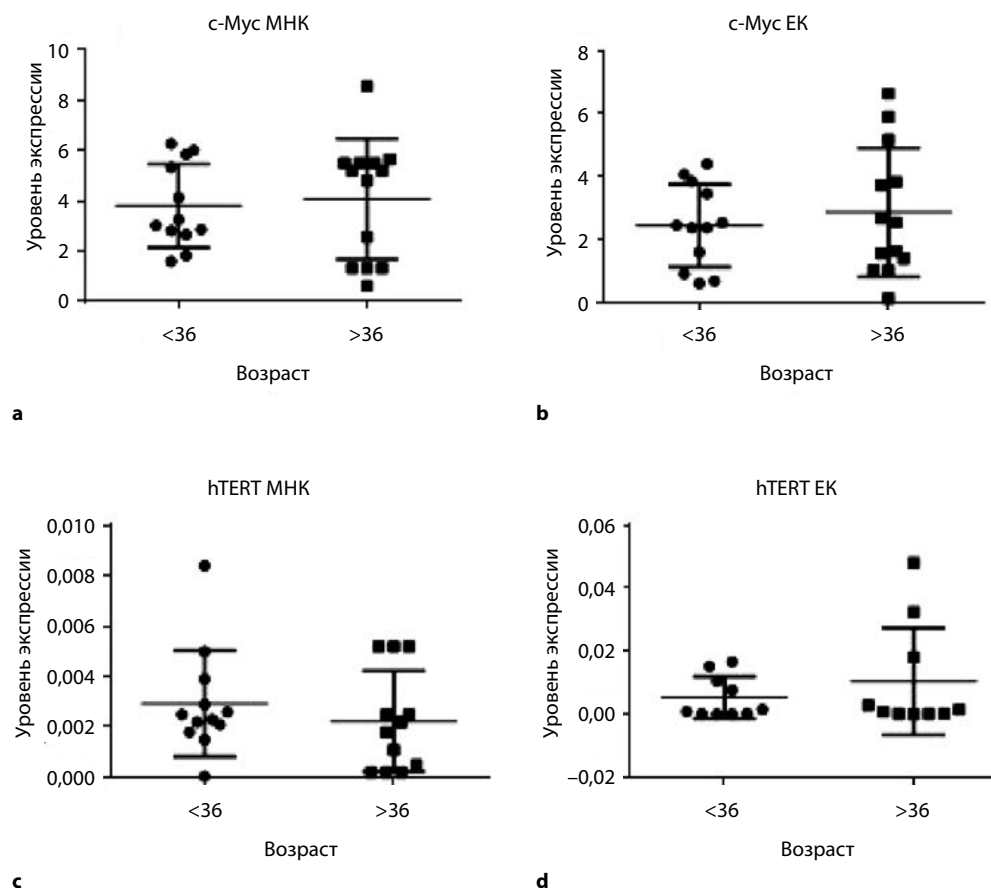


Рис. 3. Зависимость уровней экспрессии c-Myc и hTERT от возраста доноров
Fig. 3. Dependence of c-Myc and hTERT expression levels on the age of donors

что свидетельствует о полном соответствии разработанного нами технологического процесса требованиям работы в стерильных условиях.

Также ни в одном из полученных БМКП ЕК-клеток не обнаруживались транскрипты BCR-ABL1 и, как следствие, не было зафиксировано ни одного факта контаминации конечного продукта фидерной культурой на основе клеточной линии К-562.

Уровень экспрессии протоонкогена c-Myc достоверно снижился в процессе экспансии ЕК-клеток *ex vivo*. Достоверных различий в уровнях экспрессии гена hTERT в исходном материале и конечном клеточном продукте выявлено не было.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспансия ЕК-клеток с использованием генно-инженерной фидерной культуры при условии соблюдения разработанной технологии позволяет получить БМКП



ЕК-клеток, соответствующий установленным требованиям безопасности: с высоким содержанием целевой популяции клеток, отсутствием примеси фидерных клеток, микробной контаминации, признаков злокачественной трансформации.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chen BJ., Wu YL., Tanaka Y. et al. (2014) Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics. *International Journal of Biological Sciences*, vol. 10, no 10, pp. 1084–1096.
2. Miller D.M., Thomas D.S., Islam A. et al. (2013) c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res*, vol. 18, no 20, pp. 5546–5553.
3. Zirong Li., Calcar S.V., Chunxu Qu. et al. (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 100, no 14 pp. 8164–8169.
4. Dang C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 1–11.
5. Dean W.F., Zetterberg A., Zhu J. et al. (2000) Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, pp. 10544–10548.
6. Pelengaris S., Khan M., Evan G. et al. (2002) c-Myc: more than just a matter of life and death. *REVIEWS*, pp. 764–776.
7. Gardner L.B., Lee L.A., Dang C.V. et al. (2002) c-Myc Protooncogene. *Encyclopedia of Cancer*, pp. 555–561.
8. Zhang Y., Toh L., Lau P. et al. (2012) Human Telomerase Reverse Transcriptase (*hTERT*) Is a Novel Target of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Human Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no 39, pp. 32494–32511.
9. Kim N.W., Piatyszek M. A., Prowseet K. R. et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, vol. 266, pp. 2011–2015.
10. Pestana A., Vinagre J., Sobrinho-Simões M. Et al. (2017) *TERT* biology and function in cancer: beyond immortalization. *The Society for Endocrinology*, pp. 129–146
11. Dratwa M., Wysoczańska B., Łacina P. et al. (2020) *TERT*—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Frontiers in Immunology*, vol.11, pp. 1–16.
12. Elbadawy M., Usui T., Yamawaki H. et al. (2019) Emerging Roles of c-Myc in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no 9, pp. 1–16.
13. Neshat M.S., Raitano A.B, Wang H.G. et al. (2000) The Survival Function of the Bcr-Abl Oncogene Is Mediated by Bad-Dependent and -Independent Pathways: Roles for Phosphatidylinositol 3-Kinase and Raf. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 1179–1186.
14. Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N. et al. (2020) Expansion and Activation of Human Natural Killer Cells ex vivo in the Presence of Transgenic Feeder Cells. *Cell and Tissue Biology*, vol. 14, pp. 365–371.
15. Wade Chun-Wai Suen, Wayne Yuk-Wai Lee, Kam-Tong Leung (2018) Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials. *Cancer Investigation*, vol. 36, no 8, pp. 431–457.
16. Liu S., Galat V., Galat Y., Lee Y.K.A. et al. (2021) NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 14(1), p. 7.
17. Dean A Lee. (2019) Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunological Reviews*, vol. 290(1), pp. 85–99.
18. Vashkevich K., Migas A., Savich Yu., Zhernasechanka H., Lasiukov Ya., Shman T. (2021) Influence of Cryopreservation Procedure on Activation and Cytotoxicity of Expanded NK Cells Obtained for Adoptive Immunotherapy. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, vol. 10, no 4, pp. 441–449. (In Russian)
19. Uphoff, Drexler. (2002) Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 38, pp. 79–85.
20. Gabert J., Beillard E. et al. (2003) Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*, vol. 17, no 12, pp. 2318–2357.
21. Guideline on human cell-based medicinal products. European Medicines Agency; 2008. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf
22. Aleinikova O.V., Naumovich M.G., Barovskaya Y.A. et al. (2019) Natural killer cells in immunotherapy of hematological malignancies in children. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*, no 4, pp. 377–385. (In Russian)