

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-3-95-104

## АУТОТРАНСПЛАНТАЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*А.Ю. Лупатов<sup>1</sup>, П.А. Каралкин<sup>2</sup>, А.А. Бойко<sup>3</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> МНИОИ имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

Аутотрансплантация клеток иммунной системы с целью вызвать реакцию иммунологического отторжения опухоли может оказаться востребованным инструментом в руках врачей. Несмотря на невысокую эффективность, продемонстрированную в прошлом, активное развитие биомедицинских клеточных технологий и генной инженерии привело к значительному улучшению результатов, получаемых при клинической апробации этого подхода. Наибольших успехов удалось добиться в области адоптивной иммунотерапии с использованием Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевым антигенам. В данном обзоре описывается клинический опыт применения различных вариантов антиген-специфической адоптивной иммунотерапии опухолей, включая использование опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов с перенаправленными трансгенными антигенраспознающими рецепторами, в том числе химерными. В статье также анализируются возможности и ограничения этих биомедицинских технологий.

*Ключевые слова:* Т-лимфоциты, клеточная трансплантация, адоптивная иммунотерапия, злокачественные новообразования, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, трансгенный антигенраспознающий рецептор, химерный антигенраспознающий рецептор.

## AUTOTRANSPLANTATION OF T-LYMPHOCYTES AS A TOOL FOR ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY OF ONCOLOGICAL DISEASES

*A.Yu. Lupatov<sup>1</sup>, P.A. Karalkin<sup>2</sup>, A.A. Boyko<sup>3</sup>, K.N. Yarygin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Chemistry Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> P. Hertsen Moscow Oncology Research Center-branch of National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Moscow, Russian Federation

Autotransplantation of immune cells to induce immunological rejection of tumors can be a useful approach in tumor treatment. Despite the low efficiency of this approach demonstrated in the past, the active development of cell technologies and genetic engineering has led to the significant improvement in clinical outcomes. A great success was achieved in adoptive immunotherapy with the T-lymphocytes specific to tumor antigens. This review describes the clinical experience in application of various antigen-specific adoptive immunotherapy methods including tumor-infiltrating T-lymphocytes, T-lymphocytes with redirected transgenic T-cell and chimeric antigen-recognizing receptors. The possibilities and limitations of these biomedical technologies are also analyzed in the article.

*Key words:* T-lymphocytes, cellular transplantation, adoptive immunotherapy, malignant tumors, tumor-infiltrating lymphocytes, transgenic antigen-recognition receptor, chimeric antigen-recognition receptor.

**Для корреспонденции:** Лупатов Алексей Юрьевич. Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, кор. 8. Тел. (916) 324-10-20. E-mail: alupatov@mail.ru

**For correspondence:** Lupatov Alexey Yuryevich. Address: 10-8, Pogodinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (916) 324-10-20. E-mail: alupatov@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последнего столетия онкологами предпринимались неоднократные попытки использовать защитные свойства иммунной системы для лечения злокачественных новообразований. Первые попытки иммунотерапии опухолей были связаны с неспецифической вакцинацией пациентов инфекционными возбудителями и преследовали цель стимуляции всех звеньев врожденного и приобретенного иммунитета [1, 2].

Распространенное в середине прошлого века заблуждение о том, что большинство опухолей человека имеет вирусную этиологию, проецировало внимание онкологов на область иммунологии, связанную с адаптивным иммунитетом, и прежде всего с Т-лимфоцитами, обладающими цитотоксической активностью. Это давало надежду получить эффективный иммунный ответ в отношении опухолевых клеток, ассоциированных, как тогда казалось, с еще не открытыми онкогенными вирусами. Последующее выяснение молекулярно-генетических механизмов канцерогенеза показало, что роль инфекционных факторов в канцерогенезе была сильно преувеличена, и хотя опухоли, индуцированные у животных некоторыми химическими канцерогенами, оказывались весьма иммуногенными [3, 4], интерес к иммунотерапии злокачественных новообразований заметно уменьшился по причине отсутствия понимания природы опухолевых антигенов.

Возрождение интереса к иммунотерапии опухолей было связано с развитием клеточной иммунологии. Важным явилось понимание того, что для развития цитотоксического клеточного иммунного ответа белки, синтезируемые в клетке, должны быть представлены лимфоцитам в виде пептидов молекулами главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС) класса I [5]. При этом презентация не зависит от того, являются эти белки чужеродными (вирусными) или это нормальные клеточные продукты. Более того, в ряде случаев в отношении аутологических антигенов может развиваться иммунный ответ, поскольку не все специфичные клоны Т-лимфоцитов элиминируются в процессе формирования центральной иммунологической толерантности. Аутореактивные Т-лимфоциты, имеющие невысокую аффинность, не погибают, а подавляются клетками, осуществляющими негативную иммунорегуляцию в результате работы механизма, получившего название «периферическая толерантность» [6]. В связи с этим aberrantные белки, образующиеся в результате накопления мутаций в опухолевой клетке, могут выступать в качестве опухолевых неоантигенов. Также в качестве ассоциированных с опухолью антигенов могут выступать неизмененные белки, экспрессирующиеся слишком

интенсивно или в нехарактерных для них клетках [7]. Как правило, небольшая вероятность формирования высокоиммуногенных эпитопов у неоантигенов и наличие толерантности к опухоль-ассоциированным антигенам делают невозможным развитие эффективных иммунологических реакций на опухоль без терапевтического вмешательства. В связи с этим опухоли обычно рассматривают как антигенные, но слабоиммуногенные патологические образования.

Неспособность иммунной системы самостоятельно развить адаптивный иммунный ответ на опухолевые антигены делает необходимым создание технологий, призванных стимулировать этот процесс в организме, либо реализовать его *ex vivo* с последующим введением эффекторов иммунитета пациенту. Активное развитие клеточных технологий, технологий генной инженерии, включая редактирование генома, способствует решению этой проблемы [8–10].

Для целей иммунотерапии обычно используют аутологичные клетки, которые могут быть размножены, подвергнуты дифференцировке, генетической модификации или праймированы *ex vivo*. Использование аутологичных клеток прежде всего обусловлено наличием генетической рестрикции, которая выражается в необходимости совпадения по определенным аллелям МНС для реализации функциональной активности [11]. Клеточная трансплантация может иметь своей целью как активную иммунизацию (клеточные вакцины), так и пассивную (адоптивную) иммунотерапию.

В качестве клеточной вакцины могут быть использованы инактивированные опухолевые клетки с заблокированной пролиферативной активностью [12]. С целью повышения эффективности противоопухолевого иммунитета такие клетки трансфицируют генами различных цитокинов и иммуномодуляторов [13–14]. Для активной иммунизации часто используют трансплантацию антигенпрезентирующих клеток (АПК), «загруженных» опухолевыми антигенами *ex vivo*. Используемые в качестве АПК дендритные клетки или их соматические гибриды с опухолевыми клетками (дендритомы) способны после трансплантации мигрировать и представлять опухолевые антигены в контексте МНС I и II классов Т-лимфоцитам, находящимся в Т-зависимых зонах периферических органов лимфатической системы [15].

В отличие от иммунизации адоптивная иммунотерапия предполагает трансплантацию уже готовых эффекторных клеток, полученных *ex vivo* и способных разрушать опухолевые клетки-мишени. При использовании для трансплантации Т-лимфоцитов происходит антиген-специфическое распознавание опухолевых клеток. Именно это направление клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований в последние годы получило существенное развитие. Далее мы подробно рассмотрим современный опыт

клинического применения различных вариантов антиген-специфической адоптивной иммунотерапии опухолей, оценим их возможности и ограничения.

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Известно, что присутствие в опухолевой ткани инфильтрирующих лимфоцитов (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), и прежде всего лимфоцитов с фенотипом CD8<sup>+</sup>, является благоприятным прогностическим признаком для целого ряда новообразований, включая рак молочной железы, меланому, опухоли кишечника [16–18]. В связи с этим существует возможность использовать изолированные из опухоли и размноженные *ex vivo* TILs в целях адоптивной иммунотерапии. В работах Розенберга и соавторов было установлено, что клеточный пул, локализованный в строме меланомы, содержит большое количество лимфоцитов, способных специфически лизировать аутологичные опухолевые клетки *in vitro*. После наращивания *ex vivo* в присутствии высоких доз интерлейкина-2 (ИЛ-2) и трансплантации пациенту эти клетки были способны вызывать эффективную регрессию опухоли [19]. Проведение перед процедурой трансплантации клеток лимфодеплеционной химиотерапии позволило значительно увеличить долю опухоль-специфических лимфоцитов в организме, усилить противоопухолевый ответ и достичь объективного клинического ответа более чем в 60% случаев. Положительный эффект также выражался в длительной ремиссии, превышающей 5-летний порог, и низком уровне рецидивов [20–23].

На фоне доказанной эффективности трансплантации TILs при лечении метастатической меланомы результаты лечения других опухолей не так очевидны.

Несмотря на то что TILs успешно выделяют из различных солидных опухолей [24–26], убедительных доказательств положительных результатов лечения еще недостаточно. Это связано с тем, что клинические данные в основном получают в результате небольших пилотных исследований или, как в случае с первичной гепатоцеллюлярной карциномой, в результате клинических исследований I фазы, направленных на оценку безопасности иммунотерапии [27].

Дальнейшее развитие метода адоптивной терапии с использованием TILs пошло по пути выявления и экспансии клонов Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевым антигенам (рис. 1). Так, группа авторов провела селекцию TILs по реактивности против белков Е6 и Е7 вируса папилломы человека, известного в качестве патогенетического фактора развития рака шейки матки. Реактивность Т-клеток к этим белкам наблюдалась у шести из восьми пациенток. У двух позитивных по этому признаку пациенток после TILs-терапии был зафиксирован полный регресс опухоли, который продолжался на момент анализа 18 и 11 месяцев. Частичный регресс наблюдался еще у одной пациентки. При этом положительного эффекта у двух пациенток, которым вводились лимфоциты нереактивные, в отношении Е6 и Е7 отмечено не было [28].

Селекция антиген-специфических клонов позволяет еще больше персонализировать подход к лечению и использовать в качестве мишени неоантигены, уникальные для каждой конкретной опухоли. Так, в опухоли больной, диссеминированной холангиокарциномой, путем секвенирования были выявлены 26 опухоль-специфических мутаций. Среди лимфоцитов, выделенных из опухоли, с помощью молекулярных методов были обнаружены CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, распознающие один из опухолевых неоантигенов. Введение TILs, обогащенных до 25%

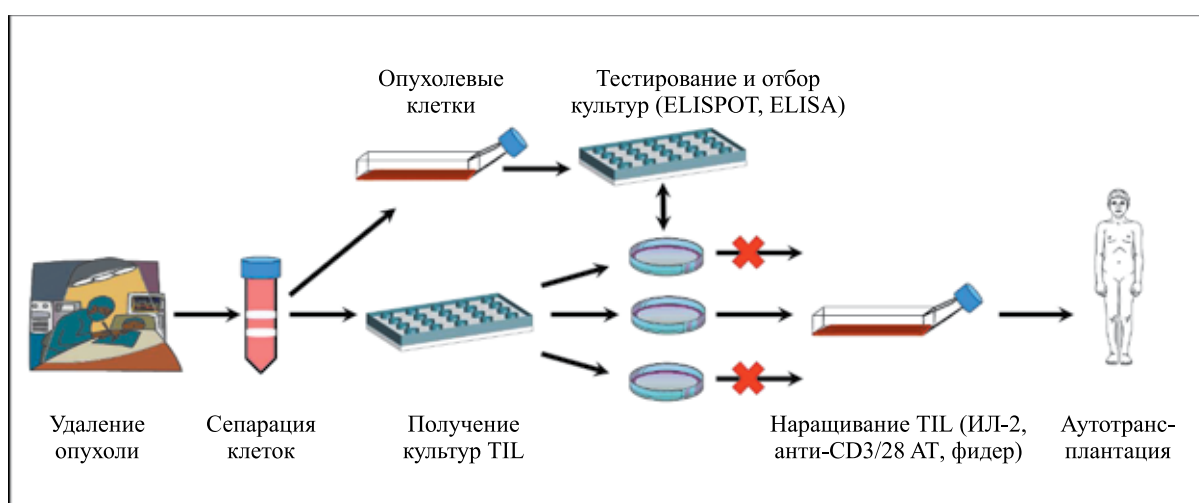


Рис. 1. Использование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) для терапии онкологических заболеваний

Fig. 1. The tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) application for the treatment of cancer

этими клетками, привело к регрессу и длительной стабилизации опухолевого процесса. Повторное введение обогащенных уже до 95% специфичных Т-лимфоцитов при прогрессировании заболевания вновь позволило добиться выраженного регресса. Интересно, что ранее пациентка уже получала лечение TILs без их предварительного обогащения, и это не оказывало существенного эффекта [29].

Несмотря на перспективность применения TILs в клинике, этот подход имеет целый ряд ограничений, препятствующих его более широкому внедрению. Прежде всего иммунотерапия с использованием TILs требует хирургического вмешательства для удаления опухолевой ткани и выделения из нее TILs. Количество опухолевого материала, получаемое при биопсии, как правило, оказывается недостаточным. Кроме того, технология выделения и культивирования TILs довольно сложна, не всегда успешна и требует высокой квалификации персонала. По этой причине в настоящее время лишь несколько медицинских центров в мире используют этот подход. Ограничением является и то, что антиген-специфические TILs далеко не всегда присутствуют в опухолевой ткани пациентов и их количество может снижаться по мере прогрессии опухоли [30].

TILs-терапия предполагает наращивание *ex vivo* эффекторных клеток, уже преобладающих у пациента. Это делает невозможным использование данной технологии в случае отсутствия достаточной иммунологической реакции пациента на опухоль, которое может быть связано с особенностями антиген-

ного состава опухоли или генетическими особенностями самого пациента. Преодолеть это ограничение можно в том случае, если не только экспансия, но и формирование антигенной специфичности Т-лимфоцитов будет осуществляться *ex vivo*. Такую возможность создают современные методы генетической инженерии.

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ТРАНСГЕННЫМ АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩИМ РЕЦЕПТОРОМ

Основная идея, заложенная в использование Т-лимфоцитов с трансгенным Т-клеточным антигенраспознающим рецептором (TCR) для адоптивной иммунотерапии, заключается в том, чтобы перенаправить антигенную специфичность эффекторной клетки в направлении опухолевых антигенов. Для этого выделенные из пациента Т-лимфоциты трансдуцируют к-ДНК, кодирующей требуемый TCR. Источником к-ДНК могут являться трансгенные (гуманизированные) животные, несущие необходимую HLA аллель и TCR человека. Такие животные могут быть проиммунизированы опухолевым антигеном, и их Т-лимфоциты использованы для клонирования требуемого TCR (рис. 2). Альтернативно к-ДНК можно клонировать из опухоль-реактивных Т-лимфоцитов самого пациента либо другого больного, несущего соответствующую HLA аллель. Очевидно, что во втором случае речь не может идти о получении

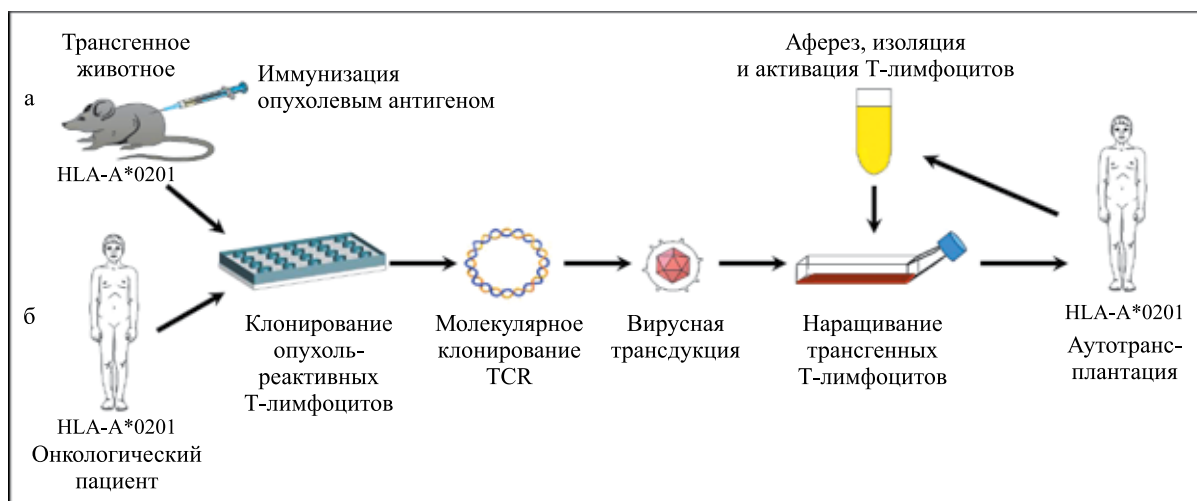


Рис. 2. Получение и использование трансгенных Т-лимфоцитов с перенаправленными антигенраспознающими рецепторами (TCR) для терапии онкологических заболеваний. Для получения к-ДНК TCR, специфичного к опухолевому антигену, могут быть использованы Т-лимфоциты трансгенного животного, экспрессирующего подходящий вариант HLA (а). В качестве альтернативы TCR может быть клонирован из Т-лимфоцитов самого пациента (б)

Fig. 2. Design and application of transgenic T-lymphocytes with redirected antigen-recognizing receptors (TCR) for the therapy of malignant tumors.

Т-лимфоцитов, направленных против опухолевых неоантигенов, образующихся в конкретной опухоли.

Первое клиническое исследование по трансплантации антиген-специфических Т-лимфоцитов с трансгенным TCR было проведено на пациентах с метастазирующей меланомой и направлено против антигена MART1 [31]. В нем удалось достичь объективного клинического ответа у двух пациентов из 15 (13%). В дальнейшем в результате отбора TCR с максимальной авидностью удалось достичь частичного регресса опухоли у 6 из 20 пациентов (30%) [32]. Для лечения метастазирующей колоректальной аденокарциномы, резистентной к другим способам терапии, у пациентов, серопозитивных по HLA-A\*0201, были использованы соответствующие трансгенные мыши. Животные были проиммунизированы раковым эмбриональным антигеном (РЭА), и их антиген-специфичные Т-лимфоциты использованы для клонирования TCR. Вирусная трансдукция TCR в Т-лимфоциты пациента и последующая трансплантация клеток на фоне лимфодеплеционной химиотерапии позволили добиться значительного положительного эффекта у двух из трех пациентов, который выражался в уменьшении метастазов в легких на 17 и 49%. При этом у всех пациентов содержание РЭА в сыворотке крови снизилось на 74–99% [33].

На фоне положительных результатов адаптивной иммунотерапии Т-лимфоцитами с трансгенным TCR оказалось, что этот вид лечения обладает серьезным недостатком, поскольку именно он наиболее часто провоцирует риск развития аутоиммунных реакций. Одной из причин является то, что на поверхности трансгенного Т-лимфоцита могут появляться TCR, в состав димера которых входит как цепь, кодируемая трансгеном, так и цепь, принадлежащая эндогенному рецептору. При этом может формироваться новая антигенраспознающая структура с непредсказуемой специфичностью. Для решения этой проблемы предпринимаются попытки использовать систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 с целью инактивации эндогенного TCR и оптимизации экспрессии трансгенных  $\alpha$ - и  $\gamma$ -рецепторов [34].

Аутоиммунная токсичность может быть результатом того, что большинство опухоль-ассоциированных антигенов представлены и на поверхности нормальных клеток. Иммунотерапия специфичными к РЭА лимфоцитами, как правило, провоцирует серьезные аутоиммунные колиты у пациентов с метастатическим колоректальным раком на фоне объективной регрессии метастазов [33]. Специфическая клеточная иммунотерапия меланомы, направленная против MART-1, часто вызывает реакцию на нормальные меланоциты и развитие витилиго [35].

Описан случай развития побочного эффекта с фатальным исходом после адаптивной терапии Т-лимфоцитами с трансгенным TCR, специфичным

к MART-1. После трансплантации клеток у пациента наблюдался массивный выброс цитокинов (цитокиновый шторм) на фоне Т-клеточно-опосредованной воспалительной реакции. Через 6 дней после клеточной трансплантации возникли эпилептические судороги и кровоизлияние в мозг, а еще через три дня наступил фатальный исход в результате множественной органной недостаточности [36]. Этот случай свидетельствует о том, что по мере своего развития адаптивная иммунотерапия превращается не только в более эффективный, но и в более сложный инструмент, требующий четкого определения терапевтических доз, противопоказаний и выработки стандартных протоколов лечения. Существовавший на ранних стадиях развития клеточной иммунотерапии принцип «чем больше, тем лучше» уже не работает. В дальнейшем, скорее всего, все большее внимание будет уделяться опухоль-специфическим антигенам и таким опухоль-ассоциированным антигенам, как тестикулярные антигены, экспрессия которых фактически отсутствует в других тканях [37]. Примером тому служит исследование, в котором для лечения метастазирующей меланомы и синовиальной саркомы использовали Т-лимфоциты с трансгенным TCR, специфичным к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1. Это позволило достичь объективного ответа в более чем 50% случаев без развития признаков аутоиммунной токсичности [38].

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩИМ РЕЦЕПТОРОМ

Весьма перспективным подходом оказалось создание химерных антигенраспознающих рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR), нацеленных на опухолевые антигены. Такие рецепторы включают в себя антигенраспознающий участок, заимствованный у антител, специфичных к опухолевому антигену, и внутриклеточные домены, необходимые для активации Т-лимфоцитов и осуществления их эффекторной функции [39]. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, как правило, клонируют из культуры гибридов, продуцирующих моноклональные антитела к опухолевому антигену. Оба участка связывают через линкер между собой и с трансмембранным доменом. Поскольку обычный TCR не имеет цитоплазматических доменов, несущих сигнальную функцию, и привлекает для этой цели ко-рецептор CD3, в цитоплазматическую последовательность CAR включают сигнальный домен этого ко-рецептора. Кроме того, в CAR последнего поколения к цитоплазматическому участку обычно присоединяют сигнальные домены ко-стимулирующих молекул (CD28, 4-1BB, OX40), активация ко-

торых необходима для запуска эффекторных механизмов и предотвращения апоптоза Т-лимфоцитов. Полученную генетическую конструкцию трансдуцируют *ex vivo* в Т-лимфоциты пациента, которые затем используют для адоптивной иммунотерапии (рис. 3).

Структурные особенности CAR определяют особенности функционирования трансгенных Т-лимфоцитов. Важно, что CAR может распознавать антигены на поверхности клеток независимо от МНС, включая антигены ганглиозидной и углеводной природы, обычно распознаваемые антителами. С другой стороны, отсутствие HLA-рестрикции, и следовательно, процессинга и презентации антигена, делает невозможным использование внутриклеточных опухолевых антигенов в качестве мишени для иммунотерапии CAR-лимфоцитами. Опухолевый антиген должен самостоятельно экспрессироваться на клеточной поверхности. Такая особенность исключает большинство опухоль-специфических антигенов, включая неоантигены, из списка возможных мишеней для CAR-лимфоцитов. Перспективными мишенями становятся дифференцировочные антигены, экспрессирующиеся на поверхности клеток опухоли. В связи с этим неудивительно, что основные успехи CAR-терапии были достигнуты при лечении онкогематологических заболеваний [40].

Дифференцировочный маркер В-лимфоцитов – CD19 оказался удачной мишенью для CAR-терапии благодаря тому, что организм может существовать без CD19-позитивных клеток и имеются способы заместительной терапии их дефицита. Одними из первых в 2010 г. были опубликованы данные о частичном клиническом ответе у пациента с В-клеточной лимфомой после проведения CAR-терапии, направленной на CD19 [41]. В 2014 году в США было

официально разрешено применение персонафицированной CAR-терапии на основе генетического перенацеливания Т-лимфоцитов на CD19 (CTL019). К настоящему моменту имеются результаты лечения более 100 пациентов с различными заболеваниями в почти 30 клинических исследованиях. В некоторых из них удавалось достичь ремиссии более чем у 50% пациентов с опухолями, резистентными к другим видам терапии [42]. Систематический обзор клинических исследований фазы I, включающий шесть исследований с участием 50 пациентов, позволил сделать выводы об эффективности лечения CAR-терапией, которая составила 48%, при этом 24% пациентов имели полную ремиссию заболевания [43]. Была продемонстрирована эффективность данного подхода у пациентов с В-клеточной лимфомой, при которой достигался объективный клинический ответ у 6 из 8 пациентов [44]. Более поздние исследования показали впечатляющие результаты при лечении хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). В обоих случаях полная ремиссия возникла у большинства лечившихся, причем в последнем случае такой результат был достигнут у 14 из 16 пациентов [45]. Интересно отметить, что пациенты с ОЛЛ были более склонны реагировать на CAR-терапию, чем пациенты с ХЛЛ [46, 47].

Антиген CD19 исчезает на плазматических клетках, поэтому для лечения множественной миеломы (ММ) было предложено использовать другую мишень. Клиническое применение CAR-лимфоцитов, нацеленных на ВСМА (антиген зрелых В-клеток), несмотря на побочные эффекты, приводило к достижению частичной или полной ремиссии [48]. В качестве мишени также предлагается использовать маркеры

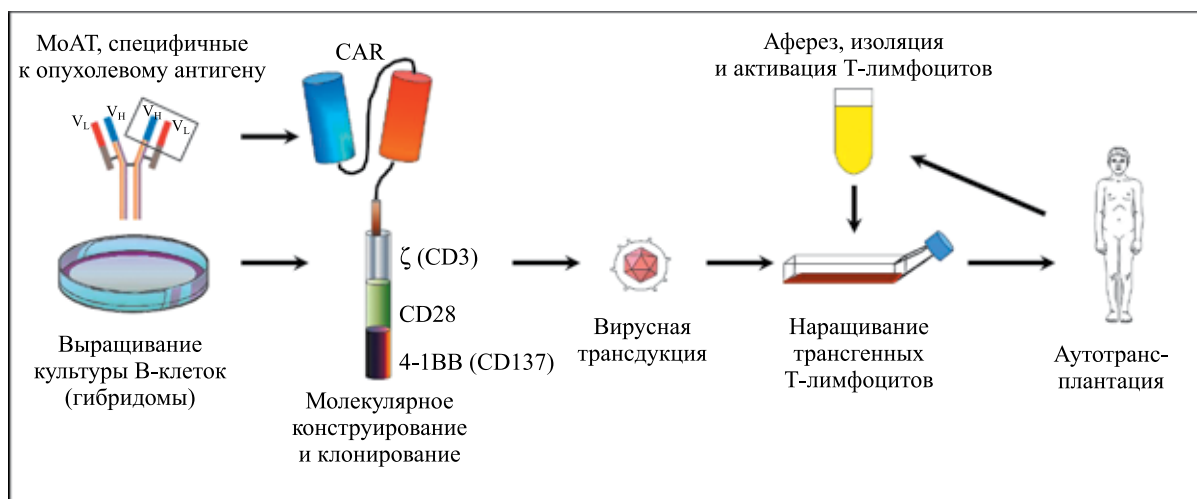


Рис. 3. Конструирование химерных антигенраспознающих рецепторов (CAR) и их использование в адоптивной терапии онкологических заболеваний

Fig. 3. Design of the chimeric antigen-recognition receptors (CAR) and their application for the adoptive therapy of malignant tumors

миеломных стволовых клеток: CD138, CD38, CD319 (SLAMF7) [49].

Предпринимаются попытки использовать CAR-лимфоциты и для терапии солидных новообразований. К наиболее перспективным антигенам относят: ганглиозид GD2, мезотелин (MSLN), рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2), РЭА, муциновый антиген MUC1, молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpcAM) [50–51]. Была проведена оценка безопасности и эффективности CAR-терапии у пациентов с HER2-положительными саркомами [52] и глиобластомами [53] в рамках клинических исследований фазы I / II. В обоих случаях были получены обнадеживающие результаты, которые выражались в увеличении медианы выживаемости, частичной регрессии опухоли и стабилизации заболевания у значительной части пациентов. Выраженная противоопухолевая активность наблюдалась при проведении GD2-специфической CAR-терапии для лечения нейробластомы. Было продемонстрировано, что длительная персистенция небольшого количества CAR-лимфоцитов дает клинический ответ, в том числе полный регресс опухоли у 16% пациентов [54]. Был проведен анализ доклинических и ранних клинических исследований, оценивающих мезотелин-направленную CAR-терапию при лечении некоторых солидных опухолей, который показал перспективность данного подхода [55, 56]. Поскольку этот антиген отчасти присутствует на нормальных тканях и это может вызывать побочные реакции [57], были использованы Т-лимфоциты с транзитной экспрессией CAR. Показано, что такой подход обладает меньшей токсичностью по сравнению с использованием Т-клеток с длительной неконтролируемой экспрессией CAR [58].

Имеются данные об использовании CAR-терапии при лечении рака простаты, колоректального рака, рака пищевода, желудка, гепатоцеллюлярной карциномы. Однако результатов, полученных при клинических исследованиях, еще недостаточно, чтобы делать выводы об эффективности CAR-терапии при солидных новообразованиях и возможности ее внедрения в клиническую практику [56]. Тем не менее уже можно предположить, что эффективность CAR-терапии солидных опухолей будет ниже, чем гематологических новообразований. По-видимому, это связано с меньшей доступностью для эффекторных клеток опухолевых антигенов в солидной ткани, а также с большей сложностью выбора мембранного поверхностного антигена в качестве мишени.

Как и в случае трансплантации Т-лимфоцитов с перенаправленными трансгенными TCR, для CAR-терапии характерны серьезные осложнения, в основном связанные с кросс-реактивностью [46]. Например, терапия метастазирующей опухоли почки, направленная на CAIX (carbonic anhydrase-9) анти-

ген, индуцировала гепатотоксичность вследствие развития аутоиммунной реакции на антиген протоковых эпителиальных клеток печени [59]. Известен случай, когда ERBB2-специфическая CAR-терапия индуцировала респираторный дистресс-синдром в процессе лечения пациентов с опухолью кишечника. Это сопровождалось мощным цитокиновым выбросом из ERBB2-позитивных клеток эпителия легких с последующим летальным исходом [60]. Таким образом, цитокиновый шторм остается одним из самых опасных осложнений, хотя он может купироваться с помощью таргетной антицитокиновой терапии и высоких доз стероидов [61]. Поскольку высокая эффективность лечения часто коррелирует с большой вероятностью осложнений, разработка способов их предотвращения приобретает чрезвычайно важное значение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что за последние годы технологии адоптивной иммунотерапии онкологических заболеваний получили небывалое развитие: от терапии лимфокин-активированными киллерными клетками (ЛАК-клетки), так и не доказавшими свою эффективность в клинических исследованиях [62], до использования Т-лимфоцитов с искусственно сконструированными антигенраспознающими рецепторами, которые в некоторых случаях способны вызывать полный регресс заболевания. Дальнейшее развитие адоптивной иммунотерапии, как и других биомедицинских технологий, будет идти по пути увеличения ее эффективности и безопасности. Поиск новых опухоль-специфических антигенов, не вызывающих перекрестных иммунологических реакций, будет проходить с использованием протеомного профилирования нормальной и опухолевой ткани, в котором будут задействованы масс-спектрометрия высокого разрешения и биоинформатический анализ, способный предсказывать новые антигенные эпитопы. Особое внимание будет уделяться персонализации подходов к лечению, и следовательно, анализу неоантигенов, возникающих в каждой конкретной опухоли [63]. Использование методов редактирования генома не только упростит формирование необходимых антигенраспознающих рецепторов, но и позволит улучшить свойства эффекторных клеток. Примером такого подхода могут служить модельные эксперименты по инактивации рецептора PD-1, инициирующего апоптоз лимфоцитов при контакте с опухолевой клеткой, несущей соответствующий лиганд [64].

Хорошие результаты могут быть получены при сочетании различных способов клеточной иммунотерапии. Так, совместное использование адоптивной терапии с вакциной на основе дендритных

клеток улучшает результаты лечения пациентов с метастатической меланомой [65]. В настоящее время проводится множество исследований, посвященных комбинациям адоптивной терапии с другими иммунотерапевтическими подходами, в первую очередь ингибиторами иммунных контрольных точек, химиопрепаратами и противоопухолевыми вакцинами различных типов. Ожидается, что сочетание таких подходов сможет в значительной степени повысить эффективность клеточной иммунотерапии рака.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-29-07246 и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., тема 0518-2018-0005.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J. Urol.* 2008; 179 (1): 53–56. DOI: 10.1016/j.juro.2007.08.122.
- Morano WF, Aggarwal A, Love P, Richard SD, Esquivel J, Bowne WB. Intraperitoneal immunotherapy: historical perspectives and modern therapy. *Cancer Gene Ther.* 2016; 23 (11): 373–381. DOI: 10.1038/cgt.2016.49.
- Basombrio MA, Prehn RT. Studies on the basis of diversity and time of appearance of chemically-induced tumors. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 1972; 35: 117–124.
- Лупатов АЮ, Брондз БД. Образование специфических противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов в монокультуре. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1992; 2: 184–186. Lupatov AYu, Bronz BD. Formation of specific anti-tumor cytotoxic T-lymphocytes in monoculture. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1992; 113 (2): 184–186. [In Russ, English abstract].
- Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T-cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 1979; 27: 51–177.
- Arnold B. Levels of peripheral T-cell tolerance. *Transpl. Immunol.* 2002; 10 (2–3): 109–114.
- Торяева ИИ. Опухолевые антигены. *Цитология.* 2008; 50 (3): 189–209. Туруяева ИИ. Tumor antigens. *Tsitologiya.* 2008; 50 (3): 189–209. [In Russ, English abstract].
- Neves H, Kwok HF. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clin.* 2015; 3: 280–288. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.04.001.
- Zych AO, Bajor M, Zagodzón R. Application of genome editing techniques in immunology. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2018. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00005-018-0504-z.
- Zhang Y, Mu W, Wang H. Gene editing in T-cell therapy. *J. Genet. Genomics.* 2017; 44 (9): 415–422. DOI: 10.1016/j.jgg.2017.09.002.
- La Gruta NL, Gras S, Daley SR, Thomas PG, Rossjohn J. Understanding the drivers of MHC restriction of T-cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 2018. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/s41577-018-0007-5.
- Berinstein NL. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine.* 2007; 25 Suppl. 2: B72–88. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.06.043.
- Yu TW, Chueh HY, Tsai CC, Lin CT, Qiu JT. Novel GM-CSF-based vaccines: one small step in GM-CSF gene optimization, one giant leap for human vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12 (12): 3020–3028. DOI: 10.1080/21645515.2016.1221551.
- Cai W, Kerner ZJ, Hong H, Sun J. Targeted cancer therapy with Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Biochem. Insights.* 2008; 2008: 15–21.
- Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2 (11): 1023–1033. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0161.
- Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2016; 11 (4): e0152500. DOI: 10.1371/journal.pone.0152500.
- Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT et al. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer research.* 2012; 72: 1070–1080. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3218.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313: 1960–1964. DOI: 10.1126/science.1129139.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 1988; 319 (25): 1676–1680.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17 (13): 4550–4557. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16 (9): 2646–2655. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0041.
- Radvanyi LG, Bernatchez C, Zhang M, Fox PS, Miller P, Chacon J et al. Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18 (24): 6758–6770. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1177.
- Goff SL, Dudley ME, Citrin DE, Somerville RP, Wunderlich JR, Danforth DN et al. Randomized, prospective evaluation comparing intensity of lymphodepletion befo-



- re adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34 (20): 2389–2397. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.7220.
24. Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D et al. Tumor infiltrating T-lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity *in situ*. *Ann. Surg.* 2006; 244 (6): 986–992; discussion 992-3. DOI: 10.1097/01.sla.0000247058.43243.7b.
  25. Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, Gilham DE. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2015; 112 (9): 1510–1518. DOI: 10.1038/bjc.2015.96.
  26. Poschke I, Faryna M, Bergmann F, Flossdorf M, Laurenstein C, Hermes J et al. Identification of a tumor-reactive T-cell repertoire in the immune infiltrate of patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncimmunology.* 2016; 5 (12): e1240859. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1240859.
  27. Jiang SS, Tang Y, Zhang YJ, Weng DS, Zhou ZG, Pan K et al. A phase I clinical trial utilizing autologous tumor-infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6 (38): 41339–41349. DOI: 10.18632/oncotarget.5463.
  28. Stevanović S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T-cells. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33 (14): 1543–1550. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.9093.
  29. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T-cells in a patient with epithelial cancer. *Science.* 2014; 344 (6184): 641–645. DOI: 10.1126/science.1251102.
  30. Ghanadan A, Ehsani A-H, Farahmand A-M, Mirzae M. Tumor infiltrating lymphocytes in different stages of malignant melanoma and correlation with tumor stage and other prognostic factors: a retrospective multicenter study. *Middle East Journal of Cancer.* 2017; 8 (4): 207–212.
  31. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 2006; 314 (5796): 126–129. DOI: 10.1126/science.1129003.
  32. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009; 114 (3): 535–546. DOI: 10.1182/blood-2009-03-211714.
  33. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan DA, Feldman SA et al. T-cells targeting carcino-embryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.* 2011; 19 (3): 620–626. DOI: 10.1038/mt.2010.272.
  34. Legut M, Dolton G, Mian AA, Ottmann OG, Sewell AK. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T-cells. *Blood.* 2018; 131 (3): 311–322. DOI: 10.1182/blood-2017-05-787598.
  35. Yee C, Thompson JA, Roche P, Byrd DR, Lee PP, Piepkorn M et al. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med.* 2000; 192 (11): 1637–1644.
  36. van den Berg JH, Gomez-Eerland R, van de Wiel B, Hulshoff L, van den Broek D, Bins A et al. Case report of a fatal serious adverse event upon administration of T-cells transduced with a MART-1-specific T-cell receptor. *Mol. Ther.* 2015; 23 (9): 1541–1550. DOI: 10.1038/mt.2015.60.
  37. Михайлова ИИ, Ковалевский ДА, Бибилашвили ПШ. Раково-тестикулярные антигены как потенциальные мишени для вакцинотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал.* 2010; 4 (9): 17–26. Mikhaylova IN, Kovalevsky DA, Beabelashvili RSh. Cancer/testis antigens as potential targets for vaccination of tumours. [In Russ, English abstract].
  38. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29 (7): 917–924. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.2537.
  39. Spear TT, Nagato K, Nishimura MI. Strategies to genetically engineer T-cells for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016; 65 (6): 631–649. DOI: 10.1007/s00262-016-1842-5.
  40. Павлова АА, Масчан МА, Пономарев ВВ. Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы. *Онкогематология.* 2017; 12 (1): 17–32. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32. Pavlova AA, Maschan MA, Ponomarev VB. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T-lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors. *Oncohematology.* 2017; 12 (1): 17–32. [In Russ, English abstract].
  41. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T-cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 2010; 116 (20): 4099–4102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931.
  42. Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol. Rev.* 2015; 263 (1): 68–89. DOI: 10.1111/imr.12243.
  43. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Zheng L, Du Y et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trials. *Eur. J. Haematol.* 2016; 96 (4): 389–396. DOI: 10.1111/ejh.12602.
  44. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T-cells. *Blood.* 2012; 119 (12): 2709–2720. DOI: 10.1182/blood-2011-10-384388.
  45. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z

- CAR T-cell therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6 (224): 224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
46. Lorentzen CL, Straten PT. CD19-Chimeric antigen receptor T-cells for treatment of chronic lymphocytic leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82 (4): 307–319. DOI: 10.1111/sji.12331.
47. Zhang T, Cao L, Xie J, Shi N, Zhang Z, Luo Z et al. Efficacy of CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells for treatment of B-cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2015; 6 (32): 33961–33971. DOI: 10.18632/oncotarget.5582.
48. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stronck DF, Rose JJ et al. T-cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016; 128 (13): 1688–1700. DOI: 10.1182/blood-2016-04-711903.
49. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood.* 2017; 130 (24): 2594–2602. DOI: 10.1182/blood-2017-06-793869.
50. Gill S, Maus MV, Porter DL. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: 25 years in the making. *Blood Rev.* 2016; 30 (3): 157–167. DOI: 10.1016/j.blre.2015.10.003.
51. Zhang Q, Zhang Z, Peng M, Fu S, Xue Z, Zhang R. CAR-T-cell therapy in gastrointestinal tumors and hepatic carcinoma: From bench to bedside. *Oncimmunology.* 2016; 5 (12): e1251539. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1251539.
52. Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) – specific chimeric antigen receptor-modified T-cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33 (15): 1688–1696. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.0225.
53. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielamowicz K, Kalra M, Landi D et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T-cells for progressive glioblastoma: A phase I dose-escalation trial. *JAMA Oncol.* 2017; 3 (8): 1094–1101. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0184.
54. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T-cells in patients with neuroblastoma. *Blood.* 2011; 118 (23): 6050–6056. DOI: 10.1182/blood-2011-05-354449.
55. O'Hara M, Stashwick C, Haas AR, Tanyi JL. Mesothelin as a target for chimeric antigen receptor-modified T-cells as anticancer therapy. *Immunotherapy.* 2016; 8 (4): 449–460. DOI: 10.2217/imt.16.4.
56. Yazdanifar M, Zhou R, Mukherjee P. Emerging immunotherapeutics in adenocarcinomas: A focus on CAR-T-cells. *Curr. Trends. Immunol.* 2016; 17: 95–115.
57. Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol. Cancer Ther.* 2012; 11 (3): 517–525. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0454.
58. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T-cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2 (2): 112–120. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0170.
59. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzaker P, van Krimpen B, Groot C et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T-cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol. Ther.* 2013; 21 (4): 904–912. DOI: 10.1038/mt.2013.17.
60. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T-cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* 2010; 18 (4): 843–851. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
61. Oluwole OO, Davila ML. At the bedside: clinical review of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for B-cell malignancies. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 100 (6): 1265–1272.
62. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol. Immunol.* 2013; 10 (3): 230–252. DOI: 10.1038/cmi.2013.10.
63. Polyakova A, Kuznetsova K, Moshkovskii S. Proteogenomics meets cancer immunology: mass spectrometric discovery and analysis of neoantigens. *Expert Review of Proteomics.* 2015; 12 (5): 533–541. DOI: 10.1586/14789450.
64. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, Marson A. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T-cells. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8.
65. Chodon T, Comin-Anduix B, Chmielowski B, Koya RC, Wu Z, Auerbach M et al. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20 (9): 2457–2465. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3017.

Статья поступила в редакцию 9.06.2018 г.  
The article was submitted to the journal on 9.06.2018