

第15回バイオロジクスフォーラム  
2018-1-10 文京区シビックホール

# 規制の視点から

-CAR T 細胞療法の品質・安全性等につ  
いて

金沢工業大学  
日本薬科大学  
国立医薬品食品衛生研究所  
山口照英

# CAR T細胞療法製剤の開発

- FDA 2017年に2つの抗CD19 CARを発現する自己CTL細胞を承認
- Novartis社のCART製品KymriahがFDAから承認. 小児・若年r/r B-ALL適応. 2017年10月9日
- 米Kite Pharma社のCART製品であるYescarta (axicabtagene ciloleucel) がFDAから承認. 2種以上の全身療法でも有効性が得られなかった再発/難治性の<sup>+</sup>大細胞型B細胞性リンパ腫の成人患者. 2017年10月18日

# 抗原特異的CTLの遺伝子導入(1)

## -様々な導入法が存在

- Retrovirus
  - FDAの承認を受けたKite社のCARTや三重大学でのTCR-CTLの作製に利用
- Lentivirus
  - FDAの承認を受けたNovartis社のCART作製に用いられている
- Gene editing (CRISPR/CAS9やTALEN)
  - ゲノム編集によりTCRやHLAの細胞膜移行に必要な $\beta 2$  microglobulinのKOを同時行うことが可能 (Liu et al (2018) CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. Cell Research)
- Transposon
  - トランスポゾンを用いることによりplasmidを用いて高いTCR導入を実現 (Peng et al/ (2012) Efficient nonviral Sleeping Beauty transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity)

# 抗原特異的CTLの遺伝子導入(2)

## -想定されるリスク

- Retrovirus(は)lentivirus
  - CART作製では高い遺伝子導入効率を得られるが、挿入変異のリスクは最も高い
- ゲノム編集
  - 同時に複数の遺伝子改変が可能であるが、遺伝子を切るという特性から染色体の切断といった新たなリスクやオフターゲット効果などの評価が必ずしも合意の得られている手法が確立していない。
- Transposon
  - CART遺伝子が組込まれるリスクに加えて、トランスポザーゼ遺伝子そのものが染色体への組込まれるリスクがあり、その場合長期にわたる遺伝子変異のリスクがでてくる。

# CARTの高い奏効率と同時に重篤な副作用の出現も

CARTの治験では重篤な副作用が頻発している

POLITICS

## Two more cancer patients just died in a clinical trial. Should the FDA be blamed?

By REBECCA ROBBINS @rebeccadrobbins / NOVEMBER 23, 2016



- 2016-3-16 FDAはCAR T細胞療法の安全性確保のためにINDの新規データベースを提案
- 2016-7-7 FDAはJuno社のCARTの治験(JCAR015)に対してClinical-hold
- 2016-7-12 改正したJCAR015のClinical-holdをとかれる
- 2017-9-6 同種由来CD123をターゲットとするCAR T細胞療法の患者死亡を受けClinical-hold

BioTodayより

\*\*\*\*\*

## 死亡例発生によりCellectis社の出来合いCAR-T製品のPh1試験をFDAが差し止め 2017-09-06

- FDA 致死性サイトカイン放出（CRS）と毛細血管漏出症候群の発生により、Cellectis社の同種CAR-T製品UCART123の第1相試験の差し止め
- UCART123の対象疾患：芽球型形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）を対象にしたPh1試験と急性骨髄性白血病（AML）を対象にした両Ph1試験の差し止め
- 死亡例：BPDCN試験の際の被験者。
- UCART123：同種CTLによる移植片対宿主病（GVHD）は発症せず。
- 発症経緯：
  - 前処置；30mg/m<sup>2</sup>/day フルダラビン、4日間、1g/m<sup>2</sup>/day シクロホスファミド、3日間の投与。Day 0に、6.25 x 10<sup>5</sup> cells/kg UCART123を投与。Day5、Grade2のCRS、Grade3 Infection in Lung. 肺感染症は広域スペクトラム抗菌薬の静注開始後に速やかに改善した。
  - Day 8, Grade 5 CRS、Grade 4の毛細血管漏出症候群
  - Day 9, 死亡
- データ安全性監視委員会の勧告：投与用量を6.25x10<sup>4</sup>個/kgに減量。前処置をシクロホスファミド、3日間、計4gまでに変更

投与量の設定が最もCRSや致死性脳症の発症に関与する？

## Cellectis社：Clinical-holdを解くために治験プロトコールの改定をFDAと合意

- 投与量を  $6.25 \times 10^4$  UCART123 cells/kgとする
- リンパ球の低減化するためのcyclophosphamideの3日間の投与量を  $750 \text{ mg/m}^2/\text{day}$  とし、一日の最高用量を  $1.33 \text{ g}$ とする;
- 患者登録条件として、UCART123投与時に制御不能な感染症を発症していないこと、臓器不全などの認められないことを適格性条件とすること;
- 新たな3例の登録では65歳以下の患者とすること;
- acute myeloid leukemia (AML) and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN)の新規患者登録は28日経過してから新たな患者登録を行うこと

# ウイルスベクターの考慮事項

- ウイルスベクターの力価の評価
- ウイルスベクターとしての規格試験
- 増殖性ウイルス試験 (RCR/RCL)
- ベクター作製用細胞バンクの特性解析と試験

# T-細胞の考慮事項

- 製造でのT細胞の分離・製造 (選択方法、抗体)
- 細胞サブセットの機能解析 (CD4/CD8/CD34/CD65)
- T細胞の増幅方法 (サイトカイン、血清 (ヒト or FBS))
- 製造に用いる生物由来原料

# CARTの安全性の考慮事項

- 最終製品への製造工程由来不純物の残存（増殖因子や細胞選択用ビーズ）
- 細胞へのウイルスベクターの導入コピー数（FDA: 5コピー/細胞以下（根拠？））
- オフターゲット（毛細血管漏出症）とオンターゲット反応（抗体産生の低下）
- 無菌試験（培養法と迅速法の組合せ）

# 力価に関する評価

- 生理作用と密接に関連する力価の設定（目的とするT細胞の用量？）
- 力価試験
  - 力価はMode-of-Actionを反映したものであること
  - 生物活性に密接に関連するT細胞の機能（殺細胞効果やサイトカイン産生能）
  - 力価を指標に安定性評価

# YESCARTA (Kite)のFDAの審査

## YESCARTAの規格試験設定根拠

性状	外観目視	無色、淡黄色、オレンジ
確認試験	svFv重鎖・CD28配列の検出	
投与量	生細胞／抗CD19CAR発現細胞	抗CD19 CAR T細胞、 最大投与量 $2 \times 10^8$ cells
力価	生細胞数、抗CD19CAR発現	
純度	Gentamicin、	
	Endotoxin	
微生物試験	Mycoplasma	
	無菌試験	陰性
レトロウイルス試験	RCR (2つの方法)	陰性

# YESCARTAの規格試験設定根拠

- Dose
  - 投与量は抗CD19 CAR陽性T細胞の生細胞数.
  - 適切な投与量が可能な濃度になるように製造調製を行う
  - 最大投与量は $2 \times 10^8$ 抗CD19 CAR T細胞に設定
  - 計算された細胞数を68mlにしてバックに封入
- 力価
  - CD19 CAR発現の設定根拠: Phase1/2に用いられたlotのデータ及びZUMA-1試験に用いたlotのデータ
- 安定性
  - $-150^{\circ}\text{C}$ 以下、12月間の安定性評価

# YESCARTAの非臨床試験

- 薬理試験
- 抗マウスCD-19 CAR T-細胞を用いて同系マウスリンフォーマモデルでの試験
- 安全性薬理試験:実施せず
- 生体内分布(PK):実施せず. ただ同系マウスを用いた論文が出されており、CD8+/CD4+ CAR T細胞の脾臓への集積が8日目までみとめられる(被検組織が脾臓に限定されておりヒトへの外挿性は?)
- 毒性試験:製品を用いた毒性試験は実施していないが、同系マウスを用いた坦がんモデルでの検討で209日までのデータが得られている. その結果では明らかな毒性は認められないが、B細胞の低下が確認されており、製剤を用いた臨床データと合致
- 遺伝毒性:実施せず
- がん原性/造腫瘍性試験:申請者が引用しているマウスでの変異やクローナル増殖性の公表文献からリスクを評価. ガンマレトロウイルスによるマウスのがん化は造血幹細胞においてのみ認められていること. T細胞でのベクターによる造腫瘍性のリスクは認められない. 臨床的にもがん化はWAS、CGD、X-SCIDにおいてのみ認められている.

# Kymriahの出荷規格試験法

試験	試験法、規格	試験対象
外観	無色ないしは淡黄色(cell-clump)	バック封入前
確認試験	qPCRによるCARの発現	ハーベスト後
生T細胞率	(viable CD3+CD45+ cells/total WBC)	最終製品
CARの導入効率	qPCRにより導入効率	
生細胞率		最終製品
残存粒子	顕微鏡観察(抗CD3/CD28 beads)	
生CD19陽性細胞とB細胞	Flow-cytometry (CD19+CD45+ cells)	最終製品
全細胞数	mlあたりの数値を記載	最終製品
投与量	0.2-5.0x10 <sup>6</sup> T-cells/kg (<50kg) 0.1-2.5x10 <sup>6</sup> T-cells/kg (>50kg)	
CARの発現率(力価)	Flow-cytometry (抗idiotype antibody)	最終製品
IFN- $\gamma$ 産生能	CD19発現細胞への応答	
エンドトキシン		最終製品
無菌試験	陰性	バック封入前
マイコプラズマ	陰性	
VSV-G DNA	qPCR	

# Kymriahの規格試験法の設定

- CAR陽性細胞の比率と臨床効果との間には相関関係は認められていない.
- 臨床投与量は遺伝子導入されたT細胞量による
- IFN- $\gamma$  産生能はCAR導入T細胞あたりの培養上清の量. CD19陽性細胞に応答してIFN- $\gamma$  産生能とCRS発症との相関性は認められず、IFN- $\gamma$  産生能は製法の恒常性評価の一環としての位置づけ
- 製造においてCD3/CD28-coated beadsを用いていることから、beadsの残存性を工程由来不純物として試験

# 自己由来CAR T細胞からユニバーサル(同種)CAR T細胞

- 自己由来CAR T細胞では十分な増幅が得られず製品の製造ができないリスクがある



- 同種由来のユニバーサルCAR T細胞を用いた治療への期待: 既に有効性を示唆する結果も得られている
- ユニバーサルCAR T細胞の実用化では内在性TCRのノックアウトの必要性
- 特異的、効率的なTCRのノックアウトにゲノム編集技術に期待が集まっている

# CAR T療法の有効性とTCR

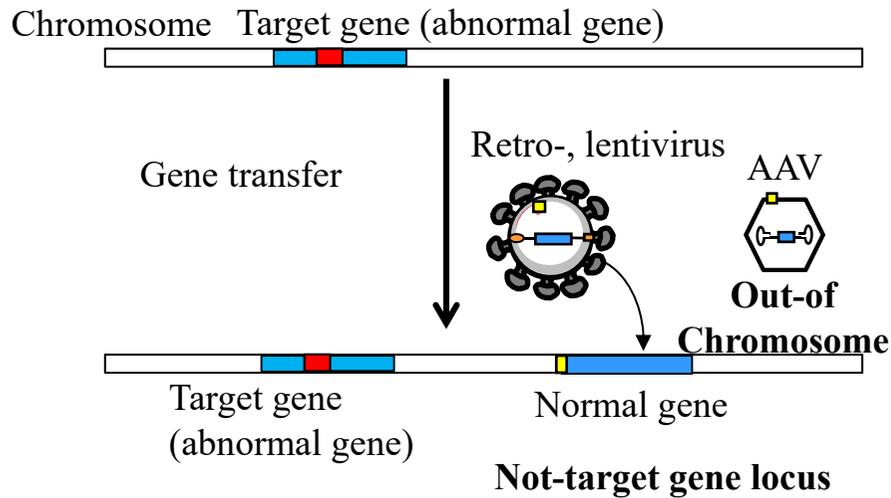
- マウスを用いて同種ALLモデルでのCAR Tによる治療効果の検討. CD8<sup>+</sup>CART細胞はTCRが活性化するとアポトーシスを起こし効果が消滅するが、CD4<sup>+</sup>CART細胞はそのようなことは無い
  - Yong et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. Science Translational Medicine 22 Nov 2017:9, Issue 417, eaag1209
- 細胞療法の最適化としてCD4<sup>+</sup>CART細胞の選択を行うデザインも考えられる
- **CART細胞のTCRをKOすることによる有効性確保**



ゲノム編集を利用した複数遺伝子の同時改変

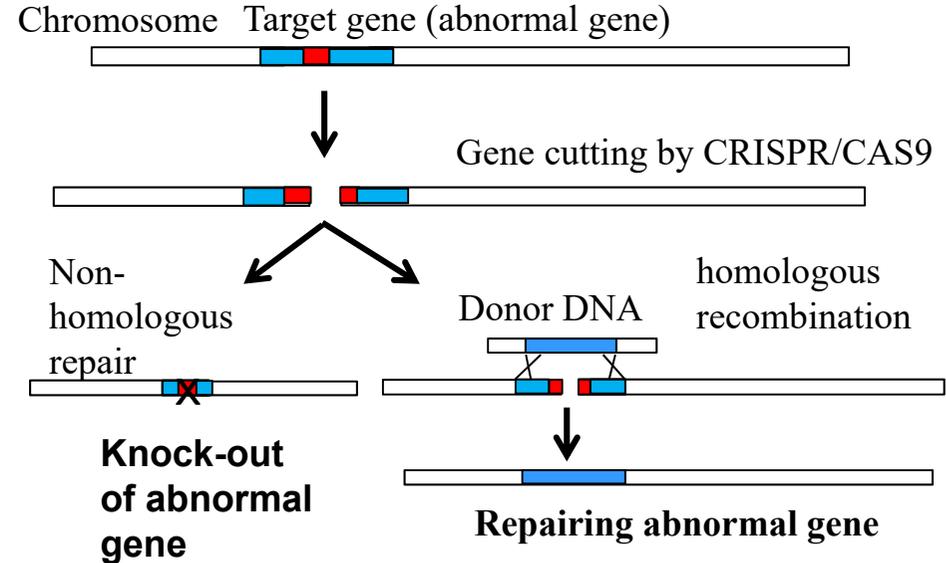
# 究極の遺伝子治療としてのゲノム編集への期待

## Traditional gene therapy



- Gene addition or complement
- No change of abnormal gene
- Difficult to control the insertion  
→ Risk of tumor
- Difficult to control the expression of gene

## Gene therapy using gene-editing



- Repair the abnormal gene or knock-out  
(for congenital gene disease)
- 異常遺伝子の変異を修復 (究極の遺伝子治療)
- がん化を生じない安全な部位への遺伝子導入
- 遺伝子の発現調節も可能

従来の遺伝子治療では実現できない治療が可能  
染色体切断に伴う副作用の可能性

# 「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」の問題点

## 第一章 総則

### 第二 用語の定義

— この指針において「**遺伝子治療等**」とは、疾病の治療や予防を目的として**遺伝子又は遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること**をいう。

指針Q&A 9: 核酸医薬(合成オリゴDNA/RNA)の導入は対象外

10: mRNAの導入は対象外

- ウイルスベクターやプラスミドを用いるゲノム編集
- 外来遺伝子を導入するゲノム編集

遺伝子治療

- ゲノム編集用酵素をタンパク質やmRNAで導入
- ガイドRNAにオリゴRNA、塩基の書換えにオリゴDNAを用いたゲノム編集

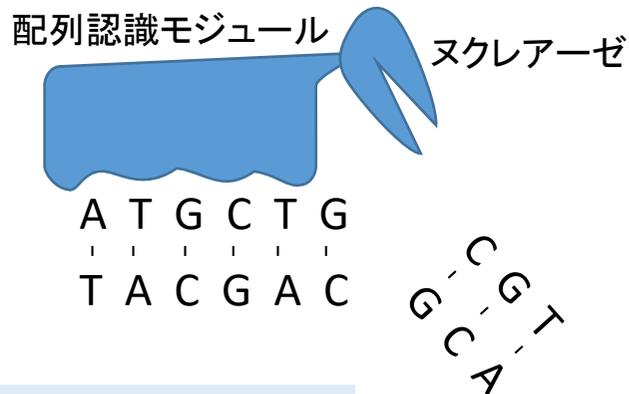
現行指針・Q&A  
では対象外



指針に基づく審査が  
行われない

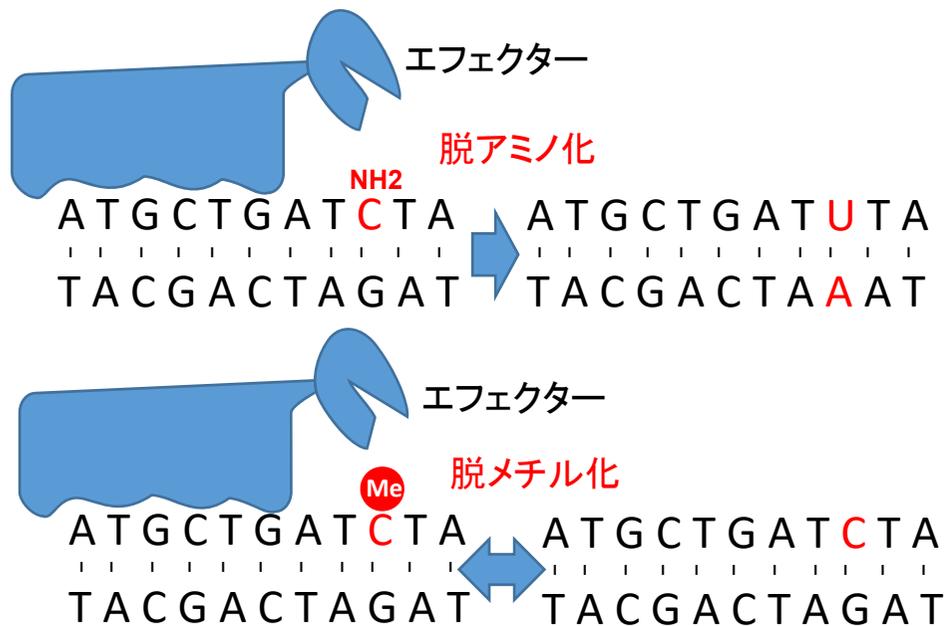
# ゲノム編集の遺伝子治療としての定義及び遺伝子治療の範囲

## ゲノム編集による遺伝子切断



DNA二本鎖切断 → 欠失/挿入  
相同組換え

## 切断しないゲノム編集



脱アミノ化  
(デアミナーゼ) → 点変異

リコンビナーゼ → 組換え

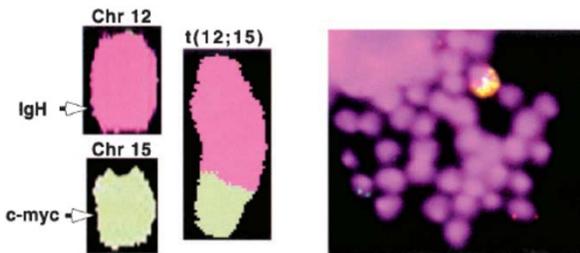
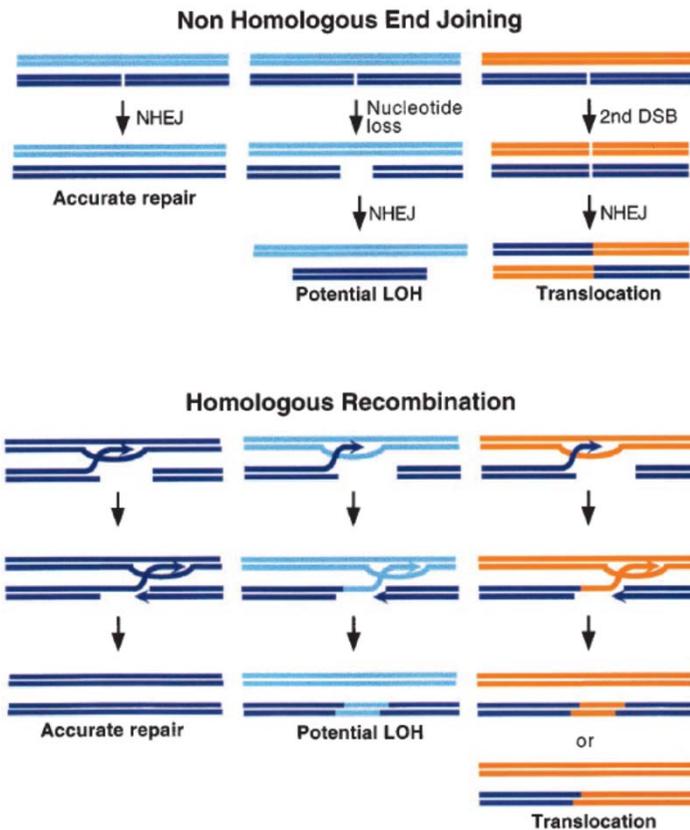
DNAメチル化/  
脱メチル化

転写制御因子  
ヒストン修飾

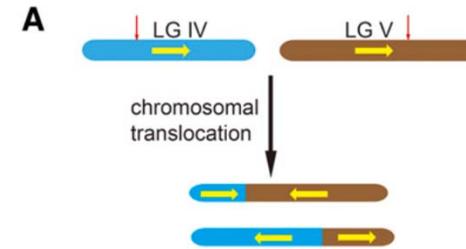
遺伝子変化  
に該当

遺伝子発現制御

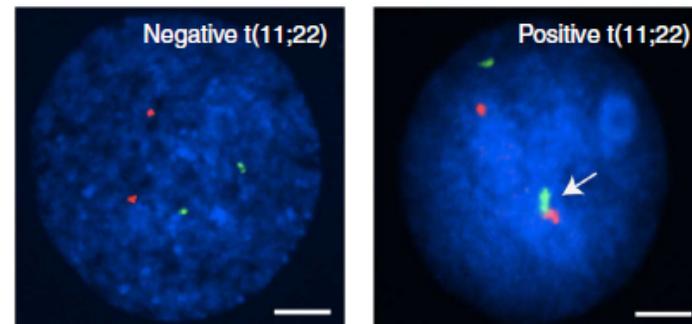
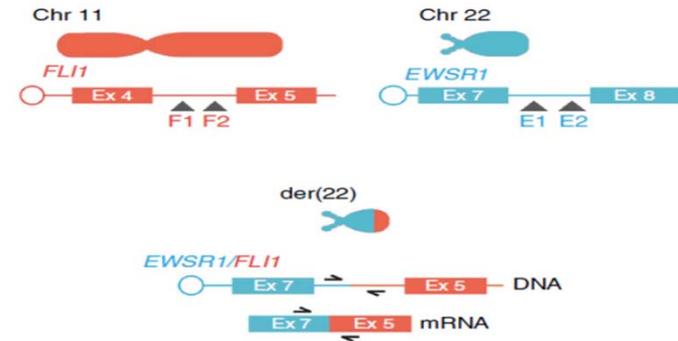
# ゲノム編集の安全性評価: 染色体転座リスク



Ferguson & Frederick :DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene* 20: 5572 (2001)



Chen et al: Targeted Chromosomal Translocations and Essential Gene Knockout Using CRISPR/Cas9 Technology in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 2017



Torres et al: Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nature Communications* 2014

# CARTやTCR-CTL遺伝子治療における挿入変異やがん化の評価

- リスクは0ではない
- T細胞を用いた治療においてがん化が認められたケースはない(分化した細胞故に腫瘍化する前に細胞が死滅?)
- 対象疾患を考えたときに造腫瘍性に関する試験を求める必要性は低い
- 但し、モニタリングは必要
- 用いる技術(ベクター)によりリスクは変わる
  - ゲノム編集ではオフターゲット効果のみならず転座のリスクもありえる

# がん抗原T細胞療法

- 有効性やMOAに関連する力価の設定
- 投与量の設定は有効性のみならず安全性確保の観点
- 生物由来原料や感染性試験
- レトロウイルスやレンチウイルスによる挿入変異のリスク⇒造血幹細胞に比較して低い
- CAR導入にどのようなベクターを用いるかにより品質や安全性評価が異なる

ご静聴ありがとうございました

ご質問があれば