

TABLE OF CONTENTS

略号及び定義一覧	3
1. まとめ	4
1.1. 非臨床開発戦略	4
2. 単回投与毒性試験	7
3. 反復投与毒性試験	8
4. 遺伝毒性試験	9
4.1. 凍結保存 JCAR017 におけるレンチウイルス挿入部位のゲノムマッピング	9
5. がん原性試験	16
5.1. B 細胞が枯渇することに起因する発がん性	16
5.2. レンチウイルスを用いた T 細胞への遺伝子導入による造腫瘍リスク	16
5.2.1. 増殖性レンチウイルス出現の可能性を抑えるレンチウイルスベクターのデザイン及び リスク管理	16
5.3. JCAR017 の in vitro IL-2 依存的細胞増殖解析	17
6. 生殖発生毒性試験	19
7. 局所刺激性試験	20
8. その他の毒性試験	21
8.1. 抗 CD19 scFv (FMC63 由来) のヒト組織交差反応性試験	21
8.2. 新添加剤の安全性評価	22
9. 考察及び結論	24
9.1. 従来毒性試験及び薬物動態試験について	24
9.2. 増殖性レンチウイルスのリスク	24
9.3. 発がん性形質転換のリスク	24
9.4. 生殖発生毒性のリスク	24
9.5. 結論	24
10. 参考文献	25

LIST OF TABLES

Table 1: 非臨床開発に関連する規制当局及び ICH による主なガイダンス文書	4
Table 2: 交差反応性試験で評価したヒト組織の一覧	21
Table 3: DMSO の毒性試験成績	22

LIST OF FIGURES

Figure 1: ゲノムの GC 含量と比較した JCAR017 ベクター挿入プロファイル	10
Figure 2: DNase アクセシビリティ（開放型クロマチン）と比較した JCAR017 ベクター挿入 プロファイル	11
Figure 3: すべての患者検体のゲノム特性による相対的 JCAR017 ベクター挿入の増強／減 少	12
Figure 4: ゲノム上のウイルス挿入部位周囲で保存された塩基	13
Figure 5: 発現のみられた腫瘍抑制遺伝子と対照遺伝子での挿入率の比較	15

略号及び定義一覧

略号	定義
3UTR	3-prime untranslated (transcribed) region 3'非翻訳（転写）領域
5UTR	5-prime untranslated (transcribed) region 5'非翻訳（転写）領域
anti-ID	anti-idiotypic antibody 抗イディオタイプ抗体
CAR	chimeric antigen receptor キメラ抗原受容体
CAT	Committee for Advanced Therapies 先進治療委員会
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research 生物製品評価研究センター
CD	cluster of differentiation 分化抗原群
CDS	coding DNA sequence コード化 DNA 配列
CHMP	Committee for Human Medicinal Products 欧州医薬品委員会
CRS	cytokine release syndrome サイトカイン放出症候群
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine (proliferation state) 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（増殖状態）
EMA	European Medicines Agency 欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration 米国食品医薬品局
FMC63	CD19-scFv binder CD19-scFv バインダー CD19 結合部位の由来元である抗ヒト CD19 モノクローナル抗体
GC	guanine-cytosine グアニン-シトシン
GLP	good laboratory practice 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HIV	human immunodeficiency virus ヒト免疫不全ウイルス
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use 日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IL	Interleukin インターロイキン
LTR	long terminal repeat 長鎖末端反復配列
mAb	monoclonal antibody モノクローナル抗体
NHL	non-Hodgkin lymphoma 非ホジキンリンパ腫
PBMC	peripheral blood mononuclear cell 末梢血単核細胞
PCR	polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応
RCL	replication competent lentivirus 増殖性レンチウイルス
scFv	Single chain variable fragment 一本鎖可変領域フラグメント
SIN	self-inactivating 自己不活化
SPM	second primary malignancy 二次性悪性腫瘍
TES	transcription end site 転写終結部位
TSS	transcription start site 転写開始部位
VCN	vector copy number ベクターコピー数
VSV	vesicular stomatitis virus 水疱性口内炎ウイルス

1. まとめ

JCAR017は、製剤中に含まれる分化抗原群（CD）8陽性T細胞（細胞傷害性T細胞）及びCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）の細胞数の不均一性を低減させるため規定された細胞組成比を以て構成される、ヒトCD19を標的とする遺伝子改変自家T細胞製剤である。

JCAR017のキメラ抗原受容体（CAR）は、FMC63モノクローナル抗体（mAb）由来の一本鎖可変領域フラグメント（scFv）、IgG4ヒンジ領域、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB（CD137）共刺激ドメイン、及びCD3ゼータ（ ζ ）活性化ドメインで構成される。FMC63はヒトCD19に特異的であり、非臨床試験に使用する動物種（マウス、非ヒト霊長類など）由来のCD19には結合しない。

JCAR017はレンチウイルスにより遺伝子導入した自家T細胞に由来する細胞製剤であるとともに、進行がん患者の治療を目的とした抗悪性腫瘍薬であることから、JCAR017の非臨床開発プログラムは以下の規制ガイダンス（欧米及びICH）を考慮して実施した（Table 1）。

Table 1: 非臨床開発に関連する規制当局及びICHによる主なガイダンス文書

対象分野	表題	規制当局	発行年
ウイルスを使用した遺伝子導入	Gene Therapy Clinical Trials—Observing Subjects for Delayed Adverse Events	FDA CBER	2006
ウイルスを使用した遺伝子導入	Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors	FDA CBER	2006
ウイルスを使用した遺伝子導入	Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up (draft)	FDA CBER	2018
ウイルスを使用した遺伝子導入	Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products	FDA CBER	2015
ウイルスを使用した遺伝子導入/細胞療法	Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products	FDA CBER	2013
ウイルスを使用した遺伝子導入/細胞療法	Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products	FDA CBER	2015
一般・オンコロジー製品	Guideline on the strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products	EMA CHMP	2018
細胞療法	Guideline on quality, non-clinical, and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells	EMA CAT	2012
ウイルスを使用した遺伝子導入/細胞療法	Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced therapy medicinal products	EMA CAT	2013
遺伝子治療用製品の品質	Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products	EMA CAT	2018
一般・オンコロジー製品	抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（S9）	ICH	2009

CAT=先進治療委員会、CBER=生物製品評価研究センター、CHMP=欧州医薬品委員会、EMA=欧州医薬品庁、FDA=米国食品医薬品局、ICH=日米EU医薬品規制調和国際会議

1.1. 非臨床開発戦略

JCAR017は、ヒト由来の自家CAR T細胞であり、その特性により、動物を用いた非臨床試験は必然的に限定的なものとなる。また、JCAR017のCD19結合領域であるscFv（FMC63由来）は、ヒトCD19に高い親和性で結合することから（m2 : 2.6.2.2.3.1項、報告書 RPT-00124）、JCAR017はヒトCD19発現細胞に対して細胞傷害作用を示すが（m2 : 2.6.2.2.3項）、マウス及び非ヒト霊長類の野生型CD19発現細胞には結合せず、それらの細胞を傷害しなかった（m2 : 2.6.2.3.1項、報告書 RPT-

0279)。動物種間で交差反応性が認められないことに加え、自家 T 細胞製剤の性質より、標準的な毒性試験、すなわち単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性（Ames 試験、染色体異常試験）、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び局所刺激性試験は実施していない。したがって、実施された JCAR017 の非臨床 in vivo 試験は、CD19 陽性ヒト腫瘍に対する薬効を検討するために実施した免疫不全マウスモデルを用いた異種移植試験のみである（m2 : 2.6.2.2.4 項、報告書 RPT-0433）。この試験では、投与したヒト CAR T 細胞に対する拒絶反応を避けるため、免疫不全マウスを使用した。CD19 に対する動物種間交差反応性がないため、CD19 を標的とする CAR T 細胞製剤に関連してヒトで認められているサイトカイン放出症候群（CRS）や神経毒性などの腫瘍内標的又は腫瘍外毒性のモデル化には限界がある（Lee, 2019）。

CD19 結合特異性、JCAR017 の動物種間交差反応性及び組織交差反応性並びにゲノム挿入部位マッピング、CAR T 細胞のインターロイキン（IL）-2 依存的な増殖及び形質転換の可能性を評価することを目的に以下の解析及び非臨床試験を実施した。

- 異種間 CD19 のシーケンスアラインメントによる固有エピトープの確認：ヒト CD19 に対する FMC63 の抗体結合（マウス及び非ヒト霊長類の CD19 に対する非結合性）の特異性を明らかにするため、FMC63 結合相互作用の重要なエピトープとして特定された細胞外ドメインを含む、ヒト、マウス及び非ヒト霊長類の CD19 全長及び細胞外配列間でアミノ酸配列を比較した（m2 : 2.6.2.3.1 項、報告書 RPT-0332）。
- 異種間結合性・細胞傷害活性：JCAR017 細胞における結合性及び細胞傷害活性の種特異性を評価するため、ヒト、マウス及び非ヒト霊長類の野生型 CD19 発現細胞に対する特異的結合性及び細胞傷害活性を評価する試験を実施した（m2 : 2.6.2.3.2 項、報告書 RPT-0279）。
- 抗 CD19 scFv（FMC63 由来）結合特異性：JCAR017 の CD19 への特異的結合及び他の細胞外タンパク質への非結合を確認するため、細胞膜のプロテオミックスアレイを用いて細胞表面タンパク結合特異性を評価した（m2 : 2.6.2.3.3 項、報告書 RPT-0365）。
- 細胞及び組織の CD19 発現マッピング：正常な細胞及び組織におけるヒト CD19 の分布を明らかにするため、利用可能な遺伝子発現データベースを用いてヒト細胞及び組織における発現を評価するとともに、公表論文の知見による裏付けを行った（m2 : 2.6.2.3.4、報告書 RPT-0333）。
- 抗 CD19 scFv（FMC63 由来）ヒト組織交差反応性評価：患者における JCAR017 の組織結合性及び分布を予測するため、正常ヒト組織パネルを用いて、FMC63 の組織交差反応性試験（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 [GLP] 適合）を実施した（8.1 項、報告書 RPT-0479）。
- ウイルスベクターのゲノム挿入マッピング：レンチウイルスにより遺伝子を導入したヒト T 細胞の遺伝子挿入部位パターン及び変異原性形質転換の可能性を評価するため、さまざまなベクターコピー数（VCN）レベルにわたり JCAR017 のベクター挿入部位パターンの全ゲノム解析を実施した（4 項、報告書 RPT-00452）。
- CAR T の IL-2 依存的増殖：JCAR017 細胞からサイトカイン非依存的形質クローンが派生した場合には、遺伝子導入の結果として白血病細胞が生じる可能性が示唆される。CAR T の IL-2 に依存しない増殖及び形質転換の可能性を評価するため、細胞生存率、増殖及び免疫表現型解析に関する in vitro 試験（GLP 適合）を実施した（5.3 項、報告書 8398350）。

JCAR017 はレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入した T 細胞加工製品である。T 細胞への遺伝子導入にレンチウイルスベクターを使用した場合の患者における長期的な安全性はこれまでのところ報告されていないが (Milone, 2018)、5 項 (がん原性) では、レンチウイルス及びレンチウイルスベクターの理論上の安全性の懸念について考察し、リスクの軽減に結び付くベクターデザインについて記載した。

JCAR017 の製造工程及び製品に関連する不純物の特性は、m3 : 3.2.S.3.2 項に記載した。

抗 CD19 scFv (FMC63 由来) のヒト組織交差反応性試験 (報告書 RPT-0479) 及び IL-2 依存的増殖試験 (報告書 8398350) の 2 つの毒性試験は、非臨床試験に関する米国食品医薬品局 (FDA) の GLP 規範 (21CFR Part58) に準拠して実施した。

2. 単回投与毒性試験

JCAR017 はヒト細胞製品であり、ヒト以外の動物種では、CD19 に対する交差反応性が認められないことから、単回投与毒性試験は実施しなかった。

3. 反復投与毒性試験

JCAR017はヒト細胞製品であり、ヒト以外の動物種では、CD19に対する交差反応性が認められないことから、反復投与毒性試験は実施しなかった。

4. 遺伝毒性試験

JCAR017 はヒト細胞製品であるため、通常の遺伝毒性試験（Ames 試験、染色体異常試験など）は実施していない。「Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products」

（FDA, 2013）のガイダンスに従って、遺伝子導入した患者の T 細胞における JCAR017 のゲノム挿入部位の網羅的評価を実施した。

4.1. 凍結保存 JCAR017 におけるレンチウイルス挿入部位のゲノムマッピング

[報告書番号 RPT-00452、添付資料 4.2.3.3.1.1、参考資料]

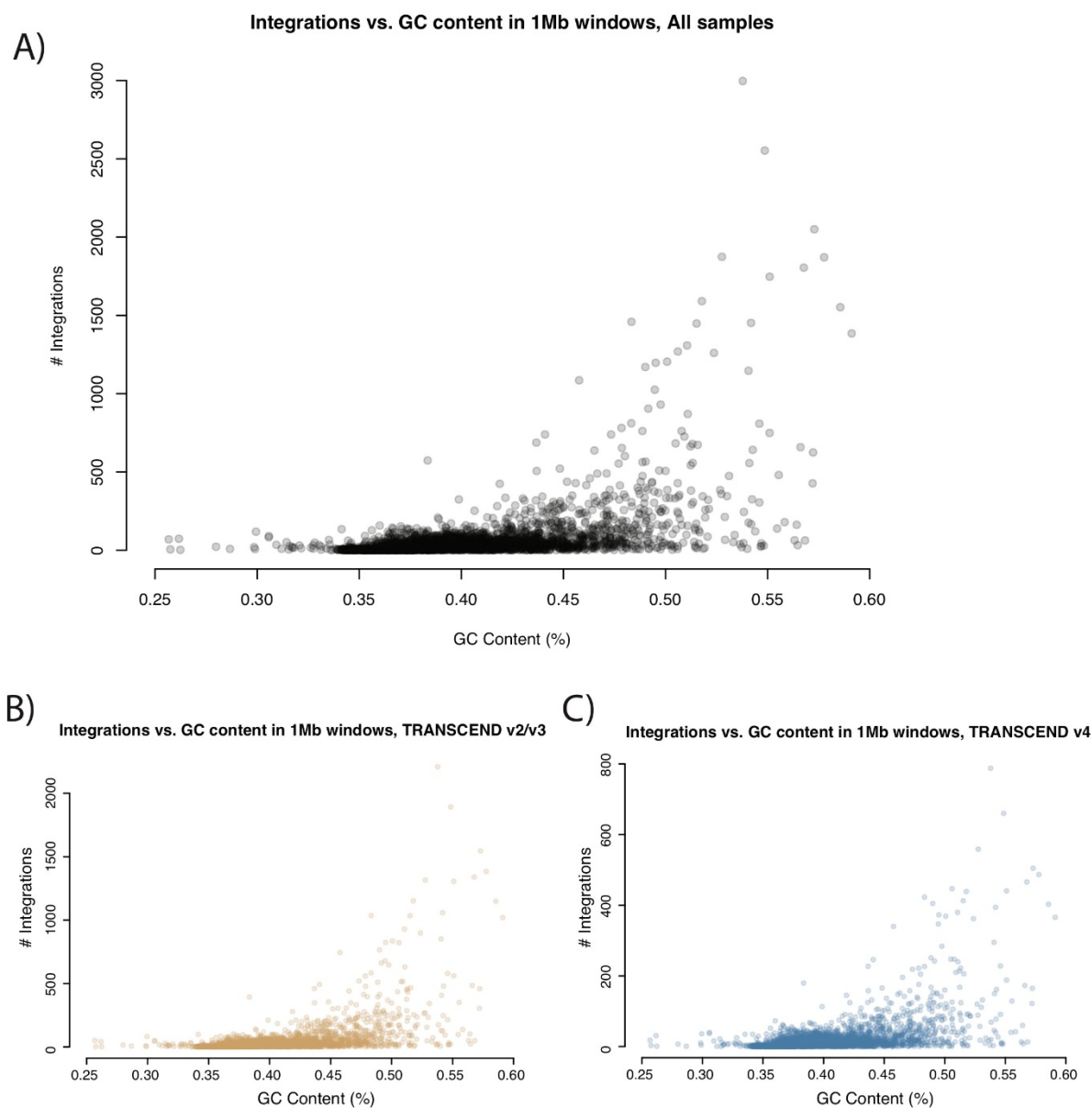
レンチウイルスによる遺伝子導入に由来する毒性のリスクを明らかにするため、本遺伝子導入細胞製品の全ゲノムにおけるウイルス DNA 挿入の特性を次世代シーケンシングにより解析した（報告書 [RPT-00452](#)）。本法では、塩基対（bp）レベルの分解能で挿入事象をマッピングするために、Tn5 トランスポザラーゼと長鎖末端反復配列（LTR）特異的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を組み合わせた手法を用いた。

本シーケンシング法により、患者 34 例から採取して作製した JCAR017 で、信頼度の高い挿入が 207,889 件（サンプルあたり平均 3,849 件）確認された。陰性対照としては、健康人 1 例から得た遺伝子非導入の末梢血単核細胞（PBMC）を使用した。シーケンシングライブラリは、臨床試験用製造工程（v2.0 及び v3.0）及び製造販売承認後用製造工程（v4.0）を用いて製造した製品から作製した。19 ロットの v2.0 又は v3.0 製品のうち 18 製品及び PBMC 陰性対照から 2 つのシーケンシングライブラリ（オリジナルの複製）を作製した。残りの v3.0 製品及び 15 製品の v4.0 製品について 1 つのシーケンシングライブラリを作製し、計 54 個のシーケンシングライブラリを作製した。

ウイルスベクターのコピー数は、CAR 陽性細胞 1 個あたり 1.7~7.4 コピーの範囲であった。すなわち、34 個の患者サンプル全体での JCAR017 の挿入（合計及び TRANSCEND-NHL-001

[[NCT02631044](#) ; [017001 試験](#)] v2.0 及び v3.0 [v2.0/v3.0] 対 v4.0) を、グアニン-シトシン（GC）含量（[Figure 1](#)）、開放型クロマチンの状態（[Figure 2](#)）、遺伝子の特徴（[Figure 3](#)）及び野生型 HIV-1 について報告があるパンドローム配列（[Figure 4](#)）によって解析した。挿入パターンは、患者の細胞を用いて v2.0/v3.0 及び v4.0 の工程で製造した製品のロット間で差がなかった。腫瘍抑制性の報告がある遺伝子について挿入率を解析した結果、潜在的に高い形質転換リスクに関連する遺伝子座への選択的な挿入は示されなかった（[Figure 5](#)）。

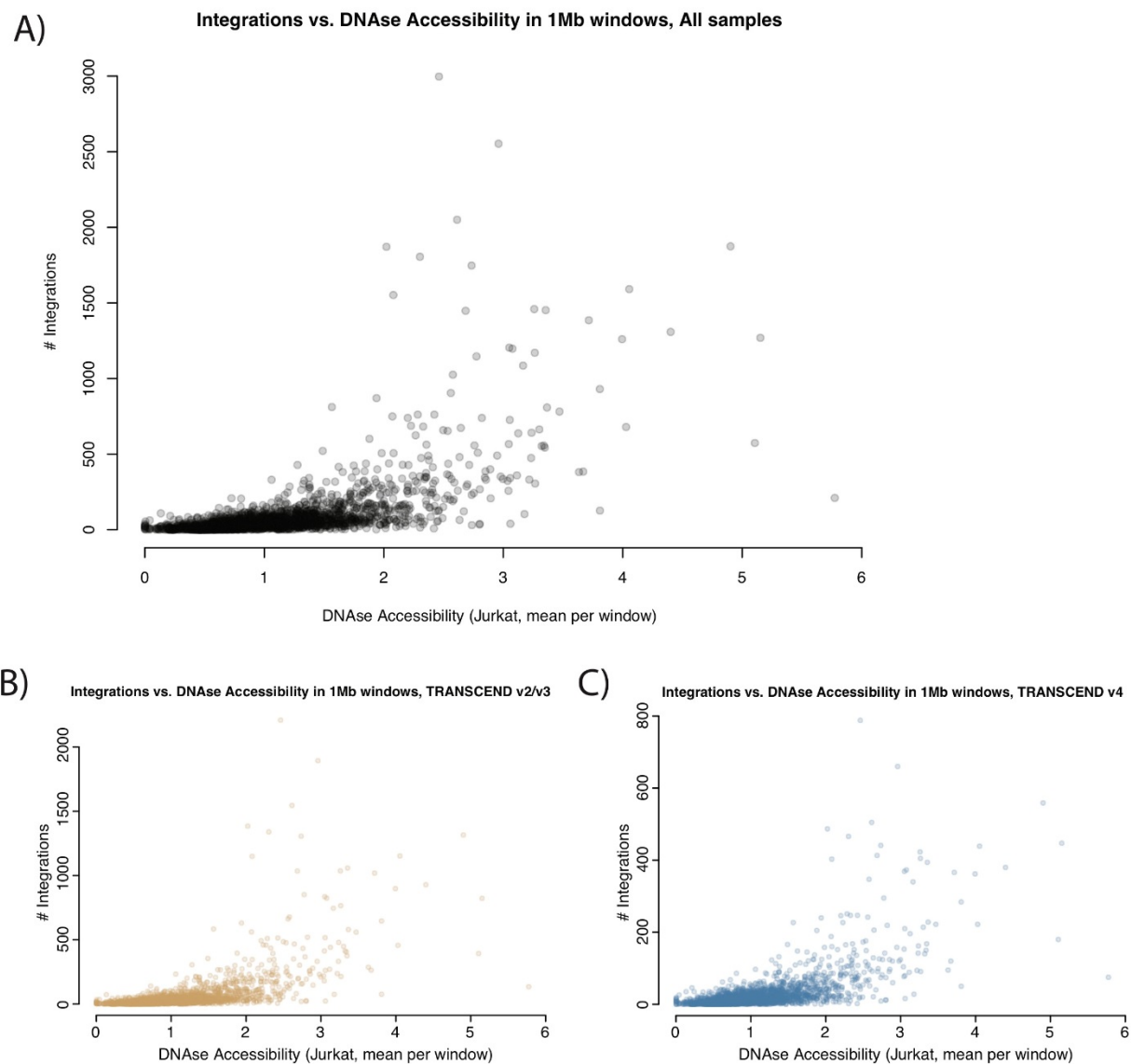
これらのデータにより、JCAR017 の製造に使用されたレンチウイルスベクターは、これまでに報告されている野生型レンチウイルスと同様のゲノム挿入プロファイル（すなわち、挿入領域の選択性、活性化クロマチンマークを含む領域、活性転写領域、及び高い GC 含量を有する領域）を示し、構成体特異的リスク並びにがん原遺伝子、がん関連共通挿入部位及び増殖制御に関連する領域への影響の増加を示す結果はみられなかった（[Brady, 2009](#) ; [Cattoglio, 2010](#)）。

Figure 1: ゲノムの GC 含量と比較した JCAR017 ベクター挿入プロファイル

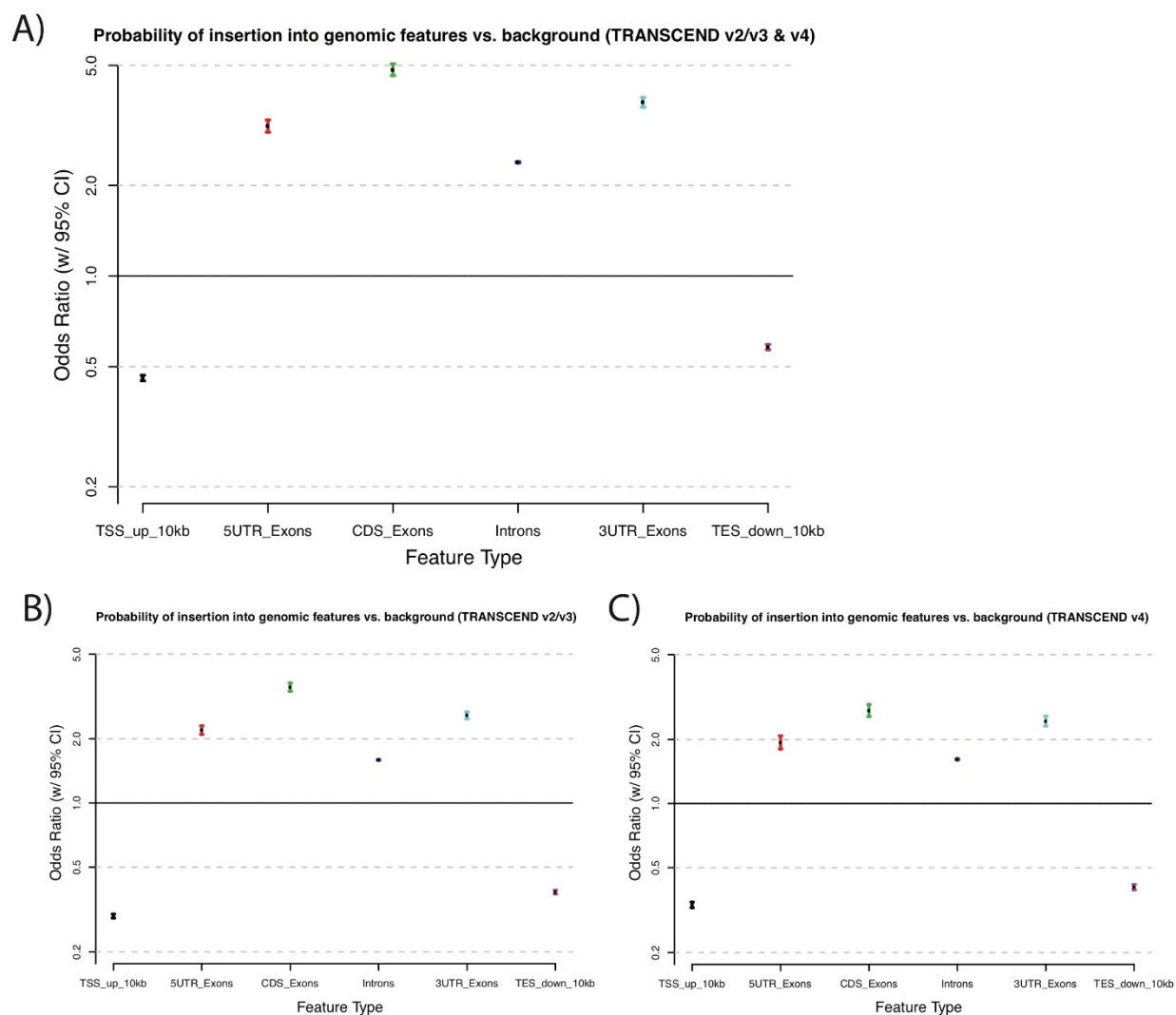
(A) 全検体でのすべてのサンプルより重複しない1メガベース領域ごとに検出した挿入数とGC含量の比較。各点はヒトゲノムの全長1メガベース領域を表す。(B) 及び (C) は TRANSCEND (NCT02631044; 017001 試験) 工程 v2.0/v3.0 及び v4.0 サンプルについてそれぞれの同様の分析結果。

出典：報告書 [RPT-00452](#)

Figure 2: DNase アクセシビリティ（開放型クロマチン）と比較した JCAR017 ベクター挿入プロファイル



(A) 全検体ですべてのサンプルより重複しない 1 メガベース領域ごとに検出したウイルス挿入数と T 細胞 DNase の平均アクセシビリティの比較。各点はヒトゲノムの全長 1 メガベースウィンドウを表す。(B) 及び (C) は、TRANSCEND (NCT02631044; 017001 試験) 工程 v2.0/v3.0 及び v4.0 サンプルについてそれぞれの同様の分析結果。出典：報告書 [RPT-00452](#)

Figure 3: すべての患者検体のゲノム特性による相対的 JCAR017 ベクター挿入の増強／減少

3UTR=3' 非翻訳（転写）領域; 5UTR=5' 非翻訳（転写）領域; CDS=コード化 DNA 配列; down=下流; TES=転写終結部位; TSS=転写開始部位; up=上流。

(A) すべてのサンプルと背景値（同サイズのランダムに生成された挿入部位に関する 1000 個のデータセット）との比較から得られたデータを用いて示したゲノム特性による挿入確率を示すオッズ比。挿入確率を均一と仮定すると、実線を上回ると確率が増加し、実線を下回ると確率が減少する。色つき誤差バーは 95%信頼区間を示す。

(B) 及び (C) は、TRANSCEND (NCT02631044; 017001 試験) 工程 v2.0/v3.0 及び v4.0 サンプルそれぞれ同様の分析結果。

出典：報告書 [RPT-00452](#)

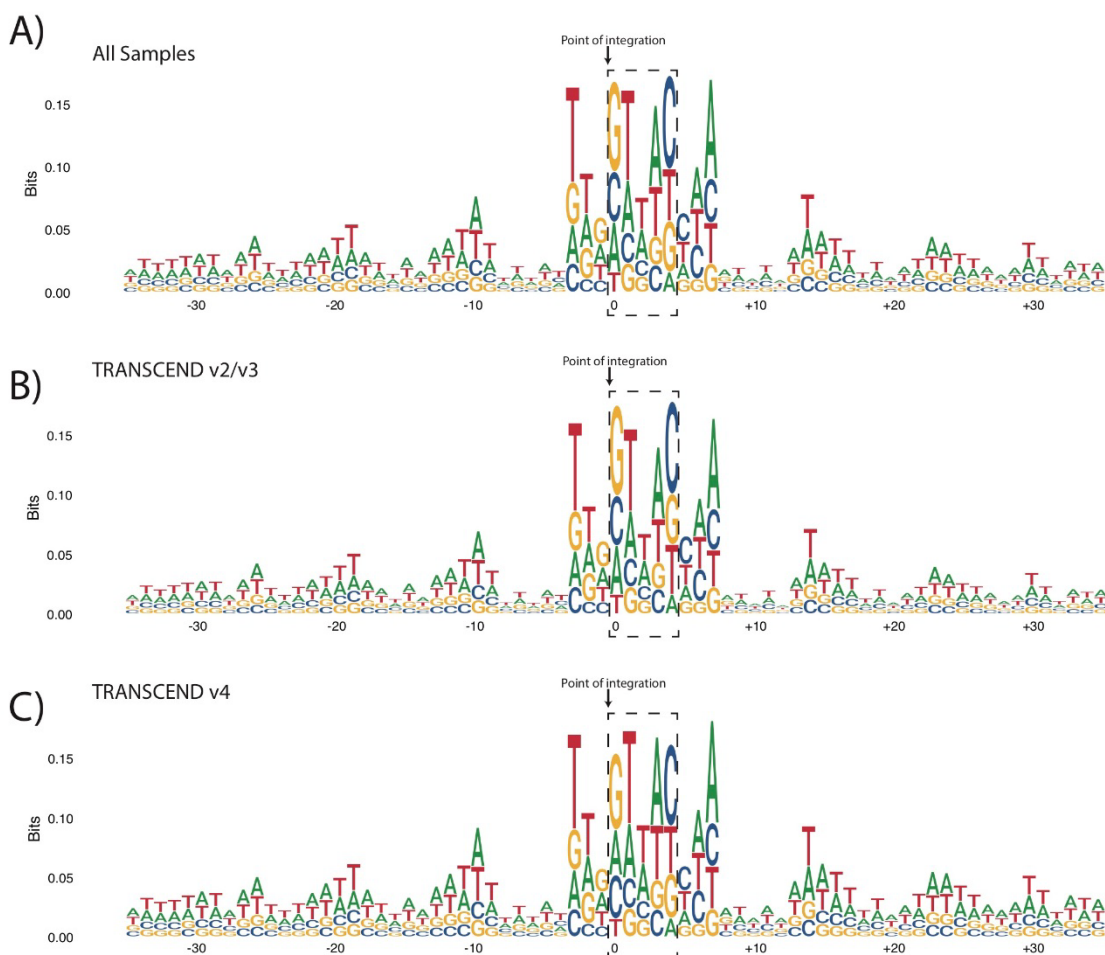
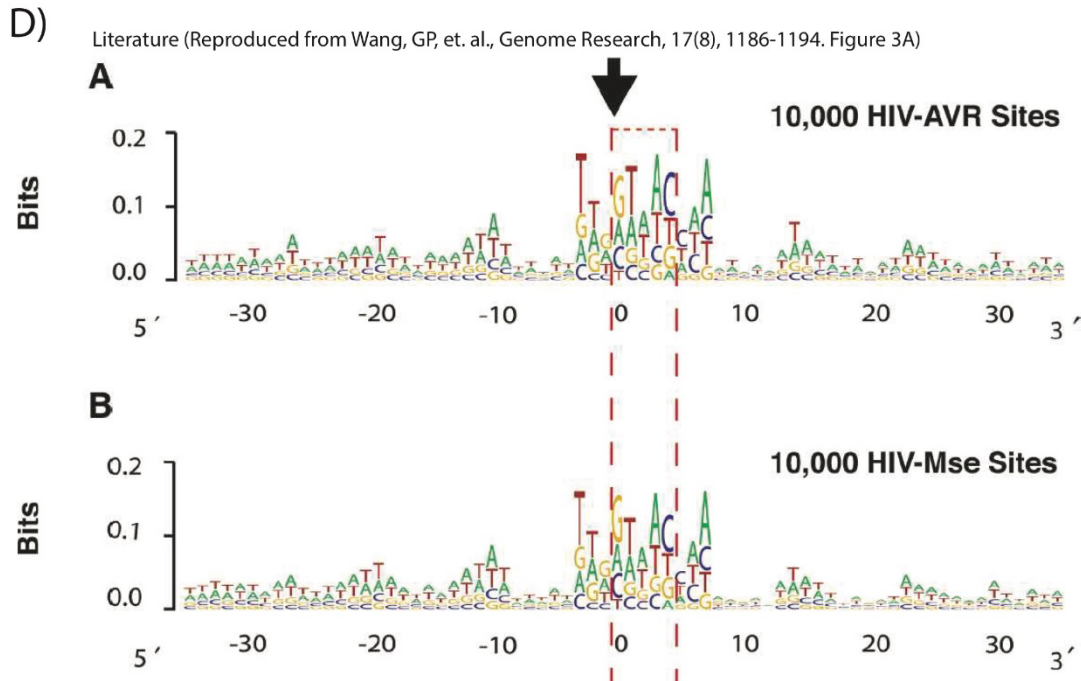
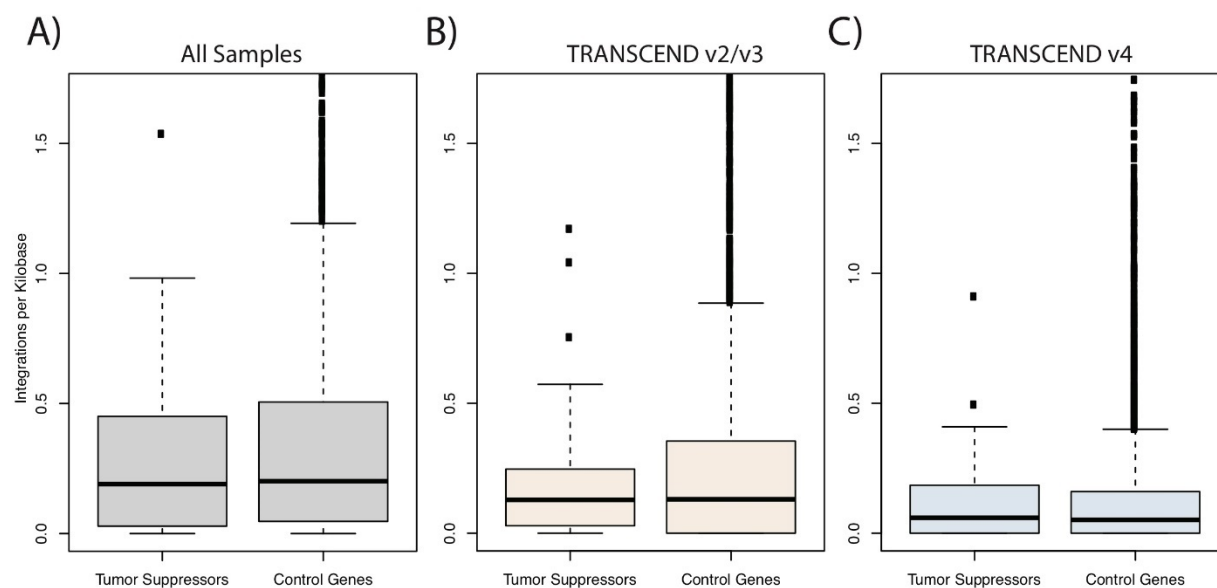
Figure 4: ゲノム上のウイルス挿入部位周囲で保存された塩基

Figure 4: ゲノム上のウイルス挿入部位周囲で保存された塩基（続き）

ゲノム上のウイルス挿入部位周囲で保存された塩基。標的 DNA 配列におけるレンチウイルスの挿入点を矢印で示す。Y 軸は各標的塩基位置の情報内容を表す（完全保存の場合のスコアは 2 ビット）。文字の高さは塩基保存の程度を表す。パネル (A) は全サンプルでの保存された配列を示す。(B) 及び (C) は、TRANSCEND

([NCT02631044](#); [017001 試験](#)) v2.0/v3.0 及び v4.0 サンプルそれぞれの保存された配列分析結果。(D) は、Jurkat T 細胞を HIV ベースのベクターと共にインキュベートした後、宿主ウイルス接合部からの DNA フラグメントを AVR 又は MseI 制限酵素カクテル（それぞれサブパネル A 及び B）のいずれかで切断後にライゲーション媒介（性）PCR を用いて調製した Wang らにより提示されたデータ ([Wang, 2007](#)) を再現したものである。

出典：報告書 [RPT-00452](#)

Figure 5: 発現のみられた腫瘍抑制遺伝子と対照遺伝子での挿入率の比較

(A) 全サンプル、(B) TRANSCEND (NCT02631044; 017001 試験) v2.0/v3.0 サンプル、及び (C) TRANSCEND (NCT02631044; 017001 試験) v4.0 サンプルでの T 細胞で発現する対照遺伝子と比較した腫瘍抑制遺伝子におけるキロベースあたりの挿入を示す。

出典：報告書 [RPT-00452](#)

5. がん原性試験

「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」（ICH S9、2009；Table 1）に準拠し、標準的ながん原性試験は実施していない。

JCAR017 のがん原性の評価は、リンパ球枯渇化学療法による患者へのリスク、B 細胞枯渇、CAR T の薬理作用、並びにレンチウイルス遺伝子導入による発がん、IL-2 非依存的 CAR T 増殖及び形質転換の可能性を考慮して実施した。

5.1. B 細胞が枯渇することに起因する発がん性

JCAR017 は、正常 B 細胞を含む CD19 発現細胞に対する作用機序により慢性的に B 細胞を枯渇させることから（標的毒性）、CD20 を標的とするモノクローナル抗体の臨床使用経験より、B 細胞性腫瘍の治療を受けている患者における慢性 B 細胞枯渇に起因する二次発がんのリスクが予測される

（Rituxan[®], 2018）。二次性悪性腫瘍（SPM）発現のリスクを評価するため、公表されている比較対照試験（未治療又は再発又は進行した B 細胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）患者を対象とし、リツキシマブ投与のみで無作為化された化学療法とリツキシマブとの併用又は非併用群試験）を用いて系統的文献調査及びメタ解析を実施した（Fleury, 2016）。本研究では 9 つの治験（4,621 例の患者）を解析対象とした。追跡調査期間中央値の 73 ヶ月の時点で、リツキシマブ併用群では SPM が 169/2,312 例に認められたのに対し、リツキシマブ非併用群では SPM が 165/2,309 例に認められた

（オッズ比=0.88、95%信頼区間 0.66~1.19）。女性の割合、組織学的サブタイプ、一次治療又は維持療法としてのリツキシマブの使用はこのリスクに影響を及ぼさず、リツキシマブ維持療法試験における長期投与による累積曝露は SPM のリスク増加に寄与しなかった（P=0.86）。これらのデータから、当該試験で用いた用量及び投与スケジュールでのリツキシマブ投与に関連した試験の追跡調査期間全体での B 細胞枯渇は、化学療法剤単独投与と比較して、がんのリスク増加と関連しないことが示唆された。

5.2. レンチウイルスを用いた T 細胞への遺伝子導入による造腫瘍リスク

JCAR017 の製造では、T 細胞表面上に CD19 を標的とした CAR を安定的に発現させるためにレンチウイルスベクターによりヒト T 細胞に形質導入する。レンチウイルスベクターによる遺伝子挿入が細胞増殖を制御する重要な遺伝子に影響を及ぼすため、理論上、造腫瘍リスクがある。増殖性レンチウイルス（RCL）が存在すると、ex vivo でレンチウイルスベクターによる遺伝子の挿入及び挿入を行った際に造腫瘍リスクが高まる可能性がある。

4 項に、JCAR017 ベクターの挿入領域を示すデータを提示しており、これは野生型レンチウイルスのランダムな挿入パターンと一致する。構成体特異的な特有のリスクを示す証拠はなく、がん原遺伝子に関連する領域、がん関連共通挿入部位又は増殖調節に関連する領域に挿入が集中する傾向も認められていない。製品製造中の RCL 出現リスクの評価、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療、及びヒト集団において HIV-1 による遺伝子挿入と造腫瘍リスクに関する既報文献のレビューを以下に提示する。

5.2.1. 増殖性レンチウイルス出現の可能性を抑えるレンチウイルスベクターのデザイン及びリスク管理

RCL 出現リスクは、複数のデザイン段階及び患者の安全性を保证する試験方法によって管理されている。JCAR017 の製造工程で T 細胞への形質導入に使用するレンチウイルスベクターは第 3 世代の複製不能自己不活性化（SIN）ベクター（）であり、RCL 出現リスクを最小限に抑えるため、レンチウイルスゲノムの大半を除去し、ベクタープラスミド及び 3 つのパッケージングプラスミドから作製されている。不必要なウイルス補助因子及び末端反復配列からエンハンサー／プロモ

ーター配列を除去し、水疱性口内炎ウイルス（VSV）糖質タンパク G のエンベロープでシュードタイプ化されている（m3：3.2.S.1.3 項、[Dull, 1998](#)）。RCL の出現には複数の組換えが必要であり、その可能性は非常に低い。こうした組換えがたとえ起きたとしても、生じる組換え体にはウイルス複製に必要な機能的配列がない。これまでに、第 3 世代レンチウイルスベクター及び関連する製品に関して RCL が出現したという報告はない（[Cornetta, 2018](#)）。

理論上、細胞製品への RCL 混入が考えられるのは、RCL が混入したレンチウイルスベクターを患者 T 細胞の形質導入に用いる場合のみである。この場合、細胞増殖中に RCL が増殖し続ける可能性がある。このため、FDA ガイドラインに準拠したベクターを製造しており、マスターセルバンク、培養終了時細胞及びバルクレンチウイルスベクターに RCL の混入がないことを保証している。JCAR017 製品の製造に使用されたレンチウイルスベクターのロットについて RCL の混入が否定されている（m3：3.2.S.4.4 項）。

FDA Guidance for Industry, Gene Therapy Clinical Trials—Observing Subjects for Delayed Adverse Events, (FDA 2006) ([Table 1](#)) に準拠するため、また JCAR017 を投与した患者の情報を得るため、長期追跡計画を策定して患者を追跡調査している（[NCT03435796](#)）。これまでに、製剤中（m3：3.2.P.5.6 項）又は患者血清中（[NCT03435796](#)）に RCL は検出されておらず、RCL 生成の可能性は非常に低い。

5.3. JCAR017 の in vitro IL-2 依存的細胞増殖解析

[報告書番号 8398350、添付資料 4.2.3.4.3.1、評価資料]

IL-2 は、正常 T 細胞の増殖及び分化に必須のサイトカインであり、T 細胞の長期培養の維持に必要である。IL-2 非存在下では非形質転換 T 細胞は急速に細胞死する。CAR T 細胞で IL-2 非依存性を示す遺伝子導入クローンがみられると、形質転換する可能性及び製造工程で白血病細胞が生じるリスクがあることが示唆される。JCAR017 細胞の IL-2 依存的増殖及び形質転換の可能性を評価するため、IL-2 の非存在下又は存在下での in vitro 長期培養試験（GLP 適合）を実施した（報告書 [8398350](#)）。

組換えヒト IL-2 の存在下又は非存在下で、JCAR017（10 ロット）及び偽処置 T 細胞（ウイルスによる形質転換なし）を培養した（開始濃度 1.6×10^6 cells/mL： 50×10^6 cells/well 及び 25×10^6 cells/well に相当）。すべての群において、培養 1～61 日目まで 4 日毎に、増殖率、生存率及び免疫表現型を評価した。細胞数及び生存率は標準色素（ヨウ化プロピジウム及びアクリジンオレンジ）を用いて測定した。細胞型は、特異的な既知の表面抗原 [CD3 陽性（総 T 細胞；細胞の純度）、CD4 陽性（ヘルパー T 細胞）、CD8 陽性（細胞傷害性 T 細胞）及び抗イディオタイプ抗体（抗 ID 抗体；CAR 陽性）] に対する免疫反応性に基づき同定した。増殖率は 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU）により評価した。

IL-2 存在下の JCAR017 細胞において、細胞数（cells/well）は培養 1 及び 5 日目にはほとんど変化せず、その後、培養 13 日目から一貫して減少した。これに対して、偽処置細胞（IL-2 非存在下又は IL-2 存在下）及び JCAR017 細胞（IL-2 非存在下）は細胞集団が急速に減少した。培養 61 日目には、すべての JCAR017 細胞（IL-2 非存在下又は IL-2 存在下）の細胞数は、総細胞数の減少（ $1.4 \sim 5.1 \times 10^5$ cells/well）を示した 2 検体を除き、検出限界未満となった。

すべての細胞の解凍時の生存率は 88%を超えており、細胞培養に供した JCAR017 細胞の生存率はすべて 90%を上回った。IL-2 存在下の JCAR017 細胞では、培養 5 日目の生存率が 70%を超えて維持された後、培養 9 日目から一貫して低下した。IL-2 非存在下の JCAR017 細胞及び偽処置細胞では、生存率が急速に低下し、培養 5 日目の生存率は 46%～58%であり、培養 13～17 日目に最低値に達した。

CD3 陽性細胞集団の割合によって示される純度は試験を通して高く、1 検体を除くすべての検体で CD3 陽性細胞の割合が 92%を超えていた。EdU 陽性細胞の割合の増加が培養 9 日目に認められ、細胞傷害性 T 細胞はヘルパー T 細胞よりもわずかに増加した。試験期間を通して CAR 陽性 (ID 陽性) 細胞の割合は一貫していた。培養 1 日目の JCAR017 細胞では、1 検体を除きヘルパー T 細胞及び細胞傷害性 T 細胞の約 75%~85%が ID 陽性であった。これらの細胞の値は培養 9 日目及び 61 日目の IL-2 存在下の JCAR017 細胞では同程度であり、IL-2 非存在下の細胞での割合はやや低かった。

以上より、JCAR017 細胞 (IL-2 非存在下) 及び偽処置細胞は、60 日間を通して細胞生存率の一貫した低下を示し、IL-2 非存在下培地の場合には、その低下の程度が大きかった。このデータは、予測されたように JCAR017 及び非形質転換 T 細胞の反応並びに *in vitro* 環境下で維持されるには IL-2 に依存することを反映したものであった。重要なことに、本試験では IL-2 非依存性増殖細胞は検出されなかった。JCAR017 細胞及び偽処置細胞の免疫表現型検査では、解凍時の高い純度及び特異性が示され、培養 61 日目の免疫表現型検査を実施するために十分量であった 1 検体では、純度及び特異性は培養 1 日目に認められた値と同程度であった。

6. 生殖発生毒性試験

JCAR017 の安全性評価のための適切な動物モデルがないことから、JCAR017 の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験、及び幼若動物の発生に関する試験は実施していない。なお、JCAR017 治療に伴う生殖発生へのリスクとして、JCAR017 投与前の患者の前処置であるシクロホスファミド及びフルダラビンなどのリンパ球枯渇化学療法による既知の胎児毒性及び催奇形性作用の可能性が考えられる (Leucadia™, 2014 ; Mirkes, 1985)。

7. 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施していない。

8. その他の毒性試験

8.1. 抗 CD19 scFv (FMC63 由来) のヒト組織交差反応性試験

[報告書番号 RPT-0479、添付資料 4.2.3.7.7.1、評価資料]

JCAR017 の組織交差反応性を評価するため、FMC63 を含む複数の CD19 を標的とする scFv-Fc 融合タンパク質（被験物質）を用いた GLP 適合試験を実施した（報告書 RPT-0479）。また、陰性対照物質として、被験物質と異なる抗原特異性を有する Fc 融合タンパク質（Fc 対照）を設定した。その他の試験対照は、被験物質又は Fc 対照物質を除外して作製した（試験対照）。陰性及び陽性対照細胞株として CD19 陰性細胞（親細胞は K562 細胞）及び CD19 を発現するよう改変した K562 細胞を用いて染色性を評価した。

本試験では、以下の組織の凍結切片を用いて、被験物質の 2 濃度（1 及び 5 µg/mL）での染色パターンを評価した（各組織あたりドナー 3 例；Table 2）。

Table 2: 交差反応性試験で評価したヒト組織の一覧

副腎	心臓	唾液腺
膀胱	腎臓（糸球体、尿細管）	皮膚
血球 ^a	肝臓	脊髄
血管（内皮） ^b	肺	脾臓
骨髄	リンパ節	横紋筋（骨格筋）
脳－小脳	卵巣	精巣
脳－大脳（大脳皮質）	膵臓	胸腺
乳腺	上皮小体	甲状腺
結腸（大腸）	末梢神経	扁桃
眼	下垂体	尿管
卵管	胎盤	子宮頸部
消化管 ^c	前立腺	子宮内膜

^a 末梢血塗抹標本により評価。

^b 検査可能なすべての組織について評価。

^c 食道、小腸及び胃（粘膜下の平滑筋を含む）を含む。
（報告書 RPT-0479）

本試験では、FMC63 による細胞膜の染色が、リンパ組織（脾臓、扁桃及び結腸の腸管関連リンパ組織）中の単核球に認められ、膀胱、腎臓、尿管、及び子宮内膜では単核球又は血管内の単核球に認められた。また、細胞膜の染色は、肝臓（肝細胞）（強度：軽度～高度、頻度：まれ）、食道（扁平上皮）（強度：軽度～高度、頻度：ごくまれ～まれ）、扁桃（扁平上皮）（強度：陰性～中等度、頻度：ごくまれ～散発的）、子宮頸部（扁平上皮）（強度：陰性～中等度、頻度：ごくまれ～まれ）にも認められた。さらに、細胞膜の染色が白血球又は正常組織（胸腺、唾液腺、前立腺の細胞外分泌液など）に認められたが、細胞内抗原は JCAR017 に作用できないと予測されるため、毒性学的意義はないと考えられた。

以上より、FMC63 scFv による染色像は、他の 2 種の抗 CD19 scFv による染色像と概ね一致しており（単核球が存在する組織における単核球の染色）、ヒト組織における既知の CD19 の発現と一致していた。しかし、JCAR017 投与患者においてこれらの標的器官における毒性が認められず、また、細胞膜のプロテオミックスアレイ試験において FMC63 scFv との特異的結合が認められなかったことから、上記の組織で認められた軽度な染色は JCAR017 投与患者におけるリスクとして無視できると考えられる。

8.2. 新添加剤の安全性評価

JCAR017には、添加剤としてジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide, DMSO）及びヒト血清アルブミン（human serum albumin, HSA）が配合されている。JCAR017の臨床適用経路は静脈内投与であることから、これらの添加剤の静脈内投与における安全性について、公表文献を基に評価した。

DMSO（RPT-001585）

これまでにDMSOの静脈内投与による単回・反復投与試験／一般毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験等が実施されており Table 3 に示す試験成績が得られている。DMSOのマウス及びラットを用いた単回静脈内投与毒性試験（用量：2.5、5.0 及び 10 g/kg）では、高用量投与により死亡が認められ、死亡例は振戦、筋弛緩、呼吸困難及び痙攣を呈し、投与 24 時間後までに死亡した。LD₅₀ 値は、マウスで 5.75 g/kg、ラットで 5.36 g/kg であった（Willson et al., 1965）。雄アカゲザルを用いた 9 日間反復静脈内投与毒性試験では、DMSO を 2 及び 3 g/kg/日の用量で 9 日間静脈内投与し、投与期間終了後 4 ヶ月間観察した。尿量増加及び褐色尿がみられたが、観察期間終了時検査では腎臓の肉眼的変化及び病理組織学的変化は認められなかった。無毒性量は 3 g/kg/日超と考えられた（de la Torre et al., 1981）。

In vitro 遺伝毒性試験では、過去に実施された 23 試験中 19 試験が陰性、3 試験が不確か、1 試験が陽性と報告されている（Hakura et al., 1993, Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988, Nakamura et al., 1990, DeMarini et al., 1991）。*In vivo* 遺伝毒性試験において、小核試験（5 mL/kg）では陰性の結果が報告されている（McFee et al., 1989）。DNA 単鎖切断試験では腎臓で陽性反応が認められたが（≥5860 mg/kg）、非生理的用量投与による腎毒性の二次的変化と推察されており、結果は不確かと報告されている（Walles and Erixon, 1984）。以上のことから、DMSOの遺伝毒性のリスクは低いことが示唆される。

ゴールデンハムスターを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験では、50～5500 mg/kg の用量で妊娠 8 日に単回静脈内投与し、妊娠 11 日に剖検した。その結果、2500 mg/kg 以下の用量では胚致死性又は催奇形性は認められなかった（Ferm, 1966）。

JCAR017の成人における一日最大用量 mL（m3:3.2.P.1 項を参照）から算出した DMSO の一日最大使用量は約 g であり、ヒト体重を 60 kg とした場合の用量は約 mg/kg となる。この用量は、DMSO の雄アカゲザルを用いた 9 日間反復静脈内投与毒性試験における無毒性量 3 g/kg/日超及びゴールデンハムスターを用いた静脈内投与による胚・胎児発生試験において胚致死性又は催奇形性が認められなかった 2500 mg/kg に比較して低く、また DMSO に遺伝毒性が認められていないことを考慮すると、本剤に添加されている DMSO について安全性上の懸念はないものと考えられた。

また、DMSO は臨床において、造血幹細胞等の移植の際に凍結保護剤として汎用されている。DMSO を用いて凍結保存した細胞の輸注時にみられる有害事象として、吐き気、嘔吐、心機能異常、アナフィラキシー様反応、急性腎不全、血圧低下又は上昇が報告されており、吐き気及び嘔吐は用量依存性が認められている（Bakken 2006, Zambelli et al., 1998）。これらの有害事象を回避する目的で、1 g/kg/日を超えない量の投与が推奨されている（Regan et al., 2010）。本品の最大投与量はこの基準を下回ることからも、本品の添加剤としての DMSO の使用に安全性上の懸念はないものと考えられた。

Table 3: DMSO の毒性試験成績

試験の種類	動物種	投与経路	試験成績	参考文献
単回投与毒性	マウス	i.v.	LD ₅₀ : 5.75 g/kg	Willson et al., 1965
	ラット	i.v.	LD ₅₀ : 5.36 g/kg	Willson et al., 1965
反復投与毒性				

試験の種類	動物種	投与経路	試験成績	参考文献
9 日間	アカゲザル	i.v.	NOAEL: >3 g/kg/日	de la Torre et al., 1981
遺伝毒性				
In vitro	NA	NA	23 試験中 - 不確か 3 試験 - 陽性 1 試験 - 陰性 19 試験	Hakura et al., 1993; Wangenheim et al., 1988; Nakamura et al., 1990; De Marini et al., 1991
小核試験	マウス	i.p.	陰性	McFee et al., 1989
DNA 単鎖切断	マウス	i.p.	不明瞭 (≥5860 mg/kg、陽性反応は腎毒性の二次的変化である可能性)	Walles and Erixon, 1984
生殖発生毒性				
胚・胎児発生	ゴールデンハムスター	i.v.	2500 mg/kg 以下の用量では胚致死性又は催奇形性は認められなかった。	Ferm, 1966

i.v. = 静脈内、i.p. = 腹腔内、NA = 該当せず、NOAEL = 無毒性量

HSA (RPT-001911)

HSA は、非臨床毒性試験の供試動物には異種蛋白となるため、毒性を正確に評価することができないことから、ヒトにおける情報を基に安全性を評価した。HSA はヒト生体内物質であり、循環血液中には 37~56 g/L が存在している (Wallach, 1992)。体重 60 kg のヒトの循環血液量は 4.2 L と考えられている (Feldschuh and Enson, 1977)。JCAR017 の成人における一日最大用量 mL

(m3:3.2.P.1 項を参照) から算出した HSA の一日最大使用量は約 g であり、循環血中の HSA 量は約 g/L となり、本剤投与による影響は生理学的変動の範囲内であることが推察される。したがって、本品の添加剤としての HSA の使用に安全性上の懸念はないものと考えられた。

以上、本剤の添加剤として使用する DMSO 及び HSA の安全性について評価した結果、いずれについても本品投与の条件下において安全性上の懸念はないものと判断した。

9. 考察及び結論

JCAR017 の非臨床安全性評価は、遺伝子治療製品、細胞治療製品及び抗悪性腫瘍薬の非臨床評価を網羅する規制ガイダンスに従って計画した。

9.1. 従来の毒性試験及び薬物動態試験について

JCAR017 は異種間交差反応性がないヒト T 細胞由来製剤である特性上、免疫能を有する動物を用いた従来の毒性試験及び薬物動態試験の実施は妥当ではなく、有用性は乏しいと考えられる。したがって、*in vivo* 非臨床試験である一般毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は実施しなかった。

9.2. 増殖性レンチウイルスのリスク

JCAR017 は、第 3 世代の非増殖性 SIN レンチウイルスベクター () を用いて製造される。このベクターによるレンチウイルスの水平感染及び垂直感染のリスクは、遺伝子治療用製品の取扱い者、投与者、医療従事者、親族その他のヒトにおいて極めて低いと考えられる。さらに、RCL の遺伝子導入による発がんリスクは、ベクターの設計及びリスク管理によって最小化されており、このことは JCAR017 の次世代シーケンシングを用いた挿入部位解析試験により確認されている (4.1 項；報告書 RPT-00452)。

9.3. 発がん性形質転換のリスク

レンチウイルスベクターによるヒト T 細胞への遺伝子導入は、野生型レンチウイルスでの報告と同様のゲノム挿入を示した。構成体特異的なリスク並びにがん原遺伝子、がんに関連した共通の遺伝子導入部位、及び増殖制御に関連する領域への影響の増加がみられないことから (4 項)、患者の T 細胞にウイルスを遺伝子挿入する際の VCN の範囲で遺伝子挿入による発がんのリスクは低いことが示唆される。これらのデータは、JCAR017 細胞の長期培養では、IL-2 が必須で IL-2 非依存型の形質転換能はないことを示す *in vitro* 試験によりさらに裏付けられた (5.3 項)。

9.4. 生殖発生毒性のリスク

JCAR017 の安全性評価のための適切な動物モデルがないことから、JCAR017 の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験及び幼若動物の発生に関する試験は実施していない。なお、JCAR017 治療に伴う生殖発生毒性のリスクとして、CAR T 投与前の患者の前処置であるシクロホスファミド及びフルダラビンなどのリンパ球枯渇化学療法による胎児毒性及び催奇形性作用が知られている (Leucadia™, 2014 ; Mirkes, 1985) (6 項)。

9.5. 結論

JCAR017 の非臨床安全性を評価する非臨床毒性試験として、結合特異性、異種間交差反応性及び遺伝子挿入した患者由来 T 細胞におけるゲノム挿入スペクトルを検討した。*in vivo* の非臨床試験である一般毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、及び生殖発生毒性試験は、JCAR017 に異種間交差反応性がないことから実施しなかった。

実施した非臨床安全性試験の結果、遺伝子挿入した患者由来 T 細胞における結合特異性及びゲノム挿入スペクトルから、JCAR017 を再発又は難治性の B 細胞リンパ腫成人患者の治療に用いる際の安全性上の懸念は示されなかった。また、本剤の添加剤として使用する DMSO 及び HSA は、本品投与の条件下において安全性上の懸念はないものと判断した。

10. 参考文献

- Bakken AM. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Curent Stem Cell Research & Therapy*. 2006;1(1):47-54.
- Brady T, Agosto LM, Malani N, Berry CC, O'Doherty U, Bushman F. HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *AIDS*. 2009; 23(12):1461-71.
- Cattoglio C, Maruggi G, Bartholomae C, Malani N, Pellin D, Cocchiarella F, et al. High-definition mapping of retroviral integration sites defines the fate of allogeneic T cells after donor lymphocyte infusion. *PLoS One*. 2010;5(12):e15688.
- Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, Jensen M, Forman S, Binder-Scholl G, et al. Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products. *Mol Ther*. 2018; 26(1):280-8.
- de la Torre JC, Surgeon JW, Ernest T, Wollmann R. Subacute toxicity of intravenous dimethyl sulfoxide in rhesus monkeys. *J Toxicol Environ Health*. 1981;7(1):49-57.
- DeMarini DM, Lawrence BK, Brooks HG, Houk VS. Compatibility of organic solvents with the Microscreen prophage-induction assay: solvent-mutagen interactions. *Mutat Res*. 1991;263(2):107-13.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998;72(11):8463-71.
- EMA. Guideline on quality, non-clinical, and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. November 2012.
- EMA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. March 2018.
- EMA. Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced therapy medicinal products. February 2013.
- EMA. Guideline on the strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products. February 2018.
- Feldschuh J, Enson Y. Prediction of the normal blood volume. Relation of blood volume to body habitus. *Circulation*. 1977;56(4 Pt 1):605-12.
- Ferm VH. Congenital malformations induced by dimethyl sulphoxide in the golden hamster. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(1):49-54.
- FDA. Guidance for Industry: Considerations for the Design of Early-Phase Clinical Trials of Cellular and Gene Therapy Products. June 2015.
- FDA. Guidance for Industry: Design and Analysis of Shedding Studies for Virus or Bacteria-Based Gene Therapy and Oncolytic Products. August 2015.
- FDA. Guidance for Industry: Gene Therapy Clinical Trials—Observing Subjects for Delayed Adverse Events. November 2006.
- FDA. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. November 2013.
- FDA. Guidance for Industry: Supplemental Guidance on Testing for Replication Competent Retrovirus in Retroviral Vector Based Gene Therapy Products During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors. November 2006.
- FDA. Guidance for Industry: Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up (draft). July 2018.

Fleury I, Chevret S, Pfreundschuh M, Salles G, Coiffier B, van Oers MH, Gisselbrecht C, et al. Rituximab and risk of second primary malignancies in patients with non-Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2016;27(3):390-7.

Hakura A, Mochida H, Yamatsu K. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains. *Mutat Res*. 1993;303(3):127-33.

ICH Harmonised Tripartite Guideline S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. Current Step 4 version dated 29 October 2009.

Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASBMT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625-38.

Leucadia™ (Fludarabine Phosphate for Injection, USP), Carlsbad, CA 92011 Leucadia Pharmaceuticals, 2014. Accessed May 2019.

McFee AF, Jauhar PP, Lowe KW, MacGregor JT, Wehr CM. Assays of three carcinogen/non-carcinogen chemical pairs for in vivo induction of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei. *Environ Mol Mutagen*. 1989;14(4):207-20.

Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*. 2018;32(7):1529-41.

Mirkes PE. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1985;5(2):75-88.

Nakamura S, Oda Y, Ugawa M. Induction of umu gene expression in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Mutat Res*. 1990;229(1):11-5.

NCT02631044; Study 017001. Study Evaluating the Safety and Pharmacokinetics of JCAR017 in B-cell Non-Hodgkin Lymphoma (TRANSCEND-NHL-001); ClinicalTrials.gov.

NCT03435796; Study GC-LTFU-001. Long-Term Follow-up Protocol for Subjects Treated With Gene-Modified T Cells; ClinicalTrials.gov.

Regan DM, Wofford JD, Wall DA. Comparison of cord blood thawing methods on cell recovery, potency, and infusion. *Transfusion*. 2010;50(12):2670-5.

Rituxan®, 2018 (Rituximab), South San Francisco, CA, USA; Genentech. Accessed May 2019.

RPT-001585; Cryostor CS10-Specification Justification Report.

RPT-001911; Human Serum Albumin and HEPES Toxicology Monograph.

Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988; 240(4856):1169-76.

Wallach J. Interpretation of diagnostic tests: a synopsis of laboratory medicine. 5th ed. Boston (MA): Little, Brown and Co.;1992.

Wallis SAS, Erixon K. Single-strand breaks in DNA of various organs of mice induced by methyl methanesulfonate and dimethylsulfoxide determined by the alkaline unwinding technique. *Carcinogenesis*. 1984;5(3):319-23.

Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD. HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res*. 2007; 17(8):1186-94.

Wangenheim J, Bolcsfoldi G. Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis*. 1988;3(3):193-205.

Willson JE, Brown DE, Timmens EK. A toxicologic study of dimethyl sulfoxide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1965;7:104-12.

Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anti Cancer Res*. 1998;18(6B):4705-8.

TABLE OF CONTENTS

1.	毒性試験の概要	2
2.	トキシコキネティクス試験	3
3.	トキシコキネティクスデータ	4
4.	毒性試験用原薬	5
5.	単回投与毒性試験	6
6.	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	7
7.	反復投与毒性試験：重要な試験	8
8.	遺伝毒性試験：IN VITRO 試験	9
9.	遺伝毒性試験：IN VIVO 試験（骨髄小核試験）	10
10.	がん原性試験	11
11.	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	13
12.	生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	14
13.	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験	15
14.	生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	16
15.	局所刺激性試験	17
16.	その他の毒性試験	18

1. 毒性試験の概要

Toxicology Overview				Investigational Product: JCAR017 (lisocabtagene maraleucel)			
Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Report No. (Legacy No.)
Single-Dose Toxicity							
None							
Repeat-Dose Toxicity							
None							
Genotoxicity							
Vector genomic insertion assessment	Human (Homo sapiens)	N/A	N/A	N/A	No		RPT-00452
Carcinogenicity							
60-Day In Vitro CAR T Cell Proliferation Study	Human (Homo sapiens)	In vitro: incubation	N/A	N/A	Yes		8398350
Reproductive and Developmental Toxicity							
None							
Local Tolerance							
None							
Other Toxicity Studies							
FMC63 tissue cross-reactivity	Human (Homo sapiens)	In vitro: incubation	N/A	1 and 5 µg/mL	Yes		RPT-0479

FMC63 = CD19-scFv binder found in JCAR017

2. トキシコキネティクス試験

Due to the nature of the JCAR017 as a human cell therapy, traditional toxicokinetic studies are not applicable.

3. トキシコキネティクスデータ

Due to the nature of the JCAR017 as a human cell therapy, traditional toxicokinetic studies are not applicable.

4. 毒性試験用原薬

Because JCAR017 is a cellular product, traditional toxicological drug substance assessments were not performed.

5. 単回投与毒性試験

Due to the absence of JCAR017 cross-reactivity towards CD19 from non-human species, no single dose toxicity studies were conducted.

6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Due to the absence of JCAR017 cross-reactivity towards CD19 from non-human species, no repeat dose toxicity studies were conducted.

7. 反復投与毒性試験：重要な試験

Due to the absence of JCAR017 cross-reactivity towards CD19 from non-human species, no repeat dose toxicity studies were conducted.

8. 遺伝毒性試験：In Vitro 試験

Because JCAR017 is a cellular product, traditional genotoxicity studies (e.g., Ames assay, clastogenicity assessments) as indicated under “Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use” (ICH S2(R1), November 2011) have not been conducted. Consistent with guidance under “Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products” (CBER, November 2013), an exhaustive assessment for genomic insertion sites, across a range of vector copy number (VCN), for JCAR017 in transduced patient T cells has been conducted.

Genotoxicity Studies					Investigational Product: JCAR017 (lisocabtagene maraleucel)	
Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. (Legacy No.)
Human (Homo sapiens)	N/A	N/A	N/A	N/A	The genome-wide analysis of lentiviral vector integration across a range of vector copy number indicates a genomic integration profile similar to wildtype lentiviruses and shows no indications of specific risk conferred by the lentiviral integration process.	RPT-00452

9. 遺伝毒性試験 : In Vivo 試験 (骨髄小核試験)

Due to the absence of JCAR017 cross-reactivity towards CD19 from non-human species, no in vivo bone marrow micronucleus studies were conducted.

10. がん原性試験

Due to the nature of the therapy as a human cellular product, traditional nonclinical models for informing carcinogenicity risk were not applicable.

Carcinogenicity Study					Investigational Product: JCAR017 (lisocabtagene maraleucel)	
Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. (Legacy No.)
Human/17097	In vitro: incubation	60 days	N/A	2 (JCAR017 and mock)	For JCAR017, a decline was noted in cell count and viability over the course of the study in IL-2+ and IL-2- cells. Cell counts fell below resuspension concentration^a on Days 53 (IL-2+) and 29 (IL-2-). On Day 61, cell counts were below the LLOQ^b for IL-2- cells. For JCAR017, a high degree of purity (CD3+ cells) was noted on Days 1, 9, and 61. On Days 9 and 61, the relative percentages of ID+ cells were comparable (IL-2+) or marginally lower (IL-2-) than Day 1 values. For mock samples, a decline was noted in cell count and viability over the course of the study in IL-2+ and IL-2- cells. Cell counts fell below resuspension concentration^a on Days 33 (IL-2+) and 21 (IL-2-). On Day 61, cell counts were below the LLOQ^b for IL-2+ and IL-2- cells. For mock samples, a high degree of purity (CD3+ cells) was noted on Days 1 and 9. Less than 0.5% of cells were ID+ on Days 1 and 9. No outgrowth was noted in JCAR017/17097 or mock samples.	8398350
Human/17217	In vitro: incubation	60 days	N/A	1	A decline was noted in cell count and viability over the course of the study in IL-2+ and IL-2- cells. Cell counts fell below resuspension concentration^a on Days 45 (IL-2+) and 17 (IL-2-). On Day 61, most cell counts were below the LLOQ^b for IL-2+ and IL-2- cells. A high degree of purity (CD3+ cells) was noted on Days 1 and 9. On Day 9, the relative percentages of ID+ cells were comparable (IL-2+) or marginally lower (IL-2-) than Day 1 values. No outgrowth was noted in JCAR017/17217 samples.	8398350 (continued)

Carcinogenicity Study					Investigational Product: JCAR017 (lisocabtagene maraleucel)	
Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. (Legacy No.)
Human/17289	In vitro: incubation	60 days	N/A	1	A decline was noted in cell count and viability over the course of the study in IL-2+ and IL-2- cells. Cell counts fell below resuspension concentration^a on Days 41 (IL-2+) and 21 (IL-2-). On Day 61, cell counts were below the LLOQ^b for IL-2+ and IL-2- cells. A high degree of purity (CD3+ cells) was noted on Days 1 and 9. On Day 9, the relative percentages of ID+ cells were comparable (IL-2+) or marginally lower (IL-2-) than Day 1 values. No outgrowth was noted in JCAR017/17289 samples.	
Human/17384	In vitro: incubation	60 days	N/A	1	A decline was noted in cell count and viability over the course of the study in IL-2+ and IL-2- cells. Cell counts fell below resuspension concentration^a on Days 41 (IL-2+) and 17 (IL-2-). On Day 61, cell counts were below the LLOQ^b for IL-2- cells. A high degree of purity (CD3+ cells) was noted on Days 1 and 9. On Day 9, the relative percentages of ID+ cells were comparable (IL-2+) or marginally lower (IL-2-) than Day 1 values. No outgrowth was noted in JCAR017/17384 samples.	8398350 (continued)

CD = cluster of differentiation; ID+ = identity; IL-2 = interleukin-2; LLOQ = lower limit of quantitation; N/A = not applicable

^a Resuspension concentration (approximately 4.8×10^5 cells/mL) ^bLLOQ = 1.0×10^5 cells /mL

11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Due to the absence of a relevant animal model for assessing the safety of JCAR017, no studies have been conducted to assess potential effects of this product on fertility, embryonic development, prenatal and postnatal development, or juvenile development.

12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Due to the absence of a relevant animal model for assessing the safety of JCAR017, no studies have been conducted to assess potential effects of this product on fertility and early embryonic development to implantation.

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Due to the absence of a relevant animal model for assessing the safety of JCAR017, no studies have been conducted to assess potential effects of this product on embryofetal development.

14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Due to the absence of a relevant animal model for assessing the safety of JCAR017, no studies have been conducted to assess potential effects of this product on pre- and postnatal-development, including maternal function.

15. 局所刺激性試験

Due to the absence of a relevant animal model for assessing the safety of JCAR017, no local tolerance studies were conducted.

16. その他の毒性試験

Other Toxicity Studies					Investigational Product: JCAR017 (lisocabtagene maraleucel)	
Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. (Legacy No.)
Human (Homo sapiens)	In vitro: incubation	N/A	1 and 5 µg/mL	N/A	Plasma membrane staining was observed for FMC63 on mononuclear leukocytes in lymphoid tissues including spleen, tonsil and gut-associated lymphoid tissue (GALT; colon); and mononuclear leukocytes as foci or intravascularly in bladder, kidney, ureter, and uterus (endometrium). Staining was found for liver (hepatocytes; noted as weak to strong intensity, rare frequency), esophagus (squamous epithelium; noted as weak to strong intensity, very rare to rare frequency), tonsil (squamous epithelium; negative to moderate intensity, very rare to occasional frequency), and uterus (cervical squamous epithelium; negative to moderate intensity, very rare to rare frequency). Additional intracellular staining observed in leukocytes or normal tissues was observed (e.g., thymus, salivary glands, extracellular secretory material in the prostate), but as intracellular antigens would not be expected to be accessible to JCAR017, these are not summarized further.	RPT-0479

GALT = gut-associated lymphoid tissue; N/A = not applicable