

TABLE OF CONTENTS

略号及び定義一覧	3
1. まとめ	4
2. 単回投与毒性試験	5
3. 反復投与毒性試験	5
4. 遺伝毒性試験	5
4.1. 臨床製剤のベクター挿入部位解析.....	5
5. がん原性試験	13
5.1. 臨床製剤及び健康成人ドナー由来製剤の IL-2 依存的細胞増殖試験	13
6. 生殖発生毒性試験	16
7. 局所刺激性試験	16
8. その他の毒性試験	16
8.1. 抗ヒト BCMA 抗体のヒト組織交差反応性試験	16
8.2. 細胞マイクロアレイを用いた BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する抗 BCMA 抗体の標的及び標的外結合の評価	17
8.3. 細胞マイクロアレイを用いた BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する bb2121 細胞の標的及び標的外結合の評価.....	18
8.4. 新規添加剤の安全性評価	18
9. 考察及び結論	19
10. 参考文献	20

LIST OF TABLES

Table 1: bb2121 の毒性試験.....	4
----------------------------	---

LIST OF FIGURES

Figure 1: VCN とベクター固有の挿入部位の相関.....	6
Figure 2: 遺伝子のコーディング領域及びその近傍領域への挿入.....	7
Figure 3: 転写開始領域へのベクター挿入プロファイル.....	7
Figure 4: 製剤で検出された上位 10 ヶ所の挿入部位の累積頻度.....	8
Figure 5: 各検体のベクター再構成解析.....	8
Figure 6: クローン構成の PMD 解析.....	9
Figure 7: 最上位の共通挿入部位の挿入部位構成と VCN との比較.....	10
Figure 8: 挿入部位密度とゲノム特性の相関.....	11
Figure 9: がん関連遺伝子の TSS 周辺の挿入部位の相対寄与率.....	12
Figure 10: MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の増殖プロファイル.....	14
Figure 11: MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の CAR 発現率プロファイル.....	15
Figure 12: MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の CD4 : CD8 比プロファイル.....	15
Figure 13: MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の多様度指数.....	16

略号及び定義一覧

略号	定義
BCMA	B cell maturation antigen B 細胞成熟抗原
CAR	chimeric antigen receptor キメラ抗原受容体
CD	cluster of differentiation 分化抗原群
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
HTLV	human T-cell leukemia virus ヒト T 細胞白血病ウイルス
IL	interleukin インターロイキン
LVV	lentiviral vector レンチウイルスベクター
mAb	monoclonal antibody モノクローナル抗体
MM	multiple myeloma 多発性骨髄腫
MOI	multiplicity of infection 感染多重度
NOD	non-obese diabetic 非肥満糖尿病
NSG	non-obese diabetic severe combined immune deficiency gamma 非肥満糖尿病重症複合免疫不全症ガンマ
PDL	population doubling level 細胞集団の累積分裂回数
scFv	single-chain variable fragment 単鎖可変フラグメント
scid	severe combined immune deficiency 重症複合免疫不全症
TCR	T cell receptor T 細胞受容体
TSS	transcription start site 転写開始部位
TNFRSF	tumor necrosis factor receptor superfamily 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー
UTD	untransduced 非遺伝子導入
VCN	vector copy number ベクターコピー数
WT	wild type 野生型

1. まとめ

bb2121 は、B 細胞成熟抗原（BCMA）を標的とするキメラ抗原受容体（CAR）をレンチウイルスベクター（LVV）を用いて遺伝子導入したヒト T 細胞（bb2121 細胞）を主成分とし、免疫調節薬、プロテアソーム阻害薬及び抗 CD38 抗体を含む 3 つ以上の前治療歴を有する成人多発性骨髄腫（MM）を対象に開発された遺伝子改変自家 T 細胞免疫療法製剤である。bb2121 細胞の細胞表面に発現する BCMA CAR は、抗ヒト BCMA マウス抗体由来の単鎖可変フラグメント（scFv）、ヒト CD8 α ヒンジ及び膜貫通ドメイン並びに 4-1BB（CD137）及び CD3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメインで構成される。bb2121 細胞が BCMA を発現する標的細胞に結合すると、CAR の CD3 ζ ドメイン及び 4-1BB ドメインの刺激によって細胞内シグナル伝達が惹起され、細胞自身が活性化する。抗原依存的活性化を受けた bb2121 細胞では細胞増殖やサイトカイン放出が亢進され、その結果、BCMA 発現細胞に対する傷害作用が発現する。bb2121 細胞は通常の免疫応答性を保持する動物には移植できないヒト自家 T 細胞であるため、一般的な薬理及び毒性試験の手法を用いた従来型の動物試験の実施は適切ではない。したがって、bb2121 細胞の薬理作用及び一般毒性を評価する in vivo 試験は、ヒト多発性骨髄腫又はリンパ腫細胞株を異種移植でき、さらに、ヒト CAR 発現 T 細胞投与に対して忍容性を示す動物モデルである NSG（非肥満糖尿病 [NOD] 重症複合免疫不全症 [scid] ガンマ）マウスを用いて検討した。これらの試験はモジュール 2.6.2 「薬理試験の概要文」2.2 項及びモジュール 2.6.3 「薬理試験概要表」2 項に示す。

ヒト細胞を用いた in vitro 試験を実施し、ベクター挿入部位解析及びインターロイキン（IL）-2 依存的増殖試験により bb2121 細胞の挿入突然変異誘発性及び形質転換のリスクについて評価した。BCMA の発現及び分布については、抗ヒト BCMA 抗体を用いたヒト組織交差反応性試験を、抗ヒト BCMA 抗体及び bb2121 細胞のヒト BCMA 特異性については、細胞マイクロアレイを用いた標的及び標的外タンパク質結合能試験をそれぞれ実施し、標的外毒性のリスクについて評価した（Table 1）。また、新規添加剤の安全性について、公表文献を基に評価した。

Table 1: bb2121 の毒性試験

Study Type	Report title	GLP Compliant	Study Number
In vitro Integration Site Analysis*	RPT-018619: Vector Insertion Site Analysis of Clinical ide-cel Drug Products Report	No	RPT-018619
In vitro Insertional Mutagenesis*	NVR-001448: IL-2 Independent Growth as a Gain of Function Assessment in Clinical and Normal Healthy Donor bb2121 Drug Product Report	No	RPT-018530
In vitro Tissue Cross-reactivity	A Tissue Cross-reactivity Study of Goat Polyclonal Anti-human BCMA Antibody Immunostaining of Normal Human Tissues	Yes	B4-097
In vitro Evaluation of Unintended (Off-target) Binding	Evaluation of Unintended (Off-target) Binding of Anti-BCMA Antibodies on Cellular Microarrays Expressing BCMA-related and Non-BCMA-related Human Proteins	No	B4-137
In vitro Evaluation of Unintended (Off-target) Binding**	Assessment of the binding profile of [REDACTED] using a human plasma membrane protein cell array	No	RP1343

BCMA = B 細胞成熟抗原、[REDACTED] は bb2121 のロット番号である。

*：試験で使用した bb2121 細胞は、「Clinical grade」の LVV を用いて「[REDACTED]」及び「[REDACTED]」で製造された。

**：試験で使用した bb2121 細胞は、「Clinical grade」の LVV を用いて「[REDACTED]」で製造された。

ベクター挿入部位解析の結果から、既に報告されている野生型（WT）ヒト免疫不全ウイルス（HIV）及び他の LVV と同様の挿入部位選好性（Lewinski, 2006; Schröder, 2002）が示唆された。遺伝子挿入、多クローン性及び選好性に遺伝子導入による懸念は認められなかった。また、IL-2 依存

的細胞増殖試験の結果から、bb2121 細胞の製造工程における遺伝子導入による T 細胞の悪性形質転換はないことが示された。

正常ヒト組織における BCMA の発現及び分布については、抗ヒト BCMA 抗体を用いたヒト組織交差反応性試験、抗ヒト BCMA 抗体及び bb2121 細胞のヒト BCMA 特異性については、細胞マイクロアレイを用いた標的及び標的外タンパク質結合能試験で評価した。これらの結果から標的外毒性のリスクは低いことが示された。

これらの非臨床試験の結果から、免疫調節薬、プロテアソーム阻害薬及び抗 CD38 抗体を含む 3 つ以上の前治療歴を有する成人 MM 患者の治療における bb2121 細胞の安全性が支持される。

2. 単回投与毒性試験

bb2121 の単回投与毒性試験は実施していない。bb2121 細胞は免疫応答性を保持する動物には移植できないヒト自家 T 細胞であるため、一般的な毒性試験の手法を用いた従来型の動物試験の実施は適切ではない。bb2121 細胞を用いて実施したすべての *in vivo* 非臨床試験は、薬理活性及び用量反応性を評価するための単回静脈内投与試験である。薬理試験では、MM 細胞株である RPMI-8226 細胞及び全身性バーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞を NSG マウスに皮下移植した 2 種類のモデルを用いた。これらの試験では、bb2121 細胞による抗腫瘍効果並びに細胞動態、薬力学及び生体内分布に加え、一般毒性（動物の観察、体重及び一般状態の記録）を評価した。これらの試験については、モジュール 2.6.2 「薬理試験の概要文」 2.2 項及びモジュール 2.6.4 「薬物動態の概要文」 8.1 項に示す。

3. 反復投与毒性試験

bb2121 の反復投与毒性試験は実施していない。

4. 遺伝毒性試験

bb2121 はヒト自家細胞製剤であるため、標準的な遺伝毒性試験（Ames 試験、染色体異常試験など）は実施していない。しかしながら、挿入変異誘発のリスクを評価するためにベクター挿入部位解析を実施した。

4.1. 臨床製剤のベクター挿入部位解析

[報告書番号 RPT-018619、添付資料 4.2.3.3.1.1、参考資料]

抗 BCMA CAR をコードする遺伝子を搭載する LVV（抗 BCMA CAR LVV）を用いたヒト T 細胞への遺伝子導入による遺伝毒性のリスクについて、臨床製剤の CAR T 細胞のゲノムに導入する抗 BCMA CAR 遺伝子のベクター挿入部位解析により評価した。ヒト細胞への遺伝子導入時の LVV の使用は、理論的には正常な遺伝子の機能不全や悪性形質転換につながるがん遺伝子の活性化を引き起こす可能性が考えられる。この影響の機序としては、導入遺伝子のがん遺伝子へ挿入され、これらの遺伝子の発現又は機能に異常をきたし、その結果悪性形質転換に至ることが考えられる（Biffi, 2011）。

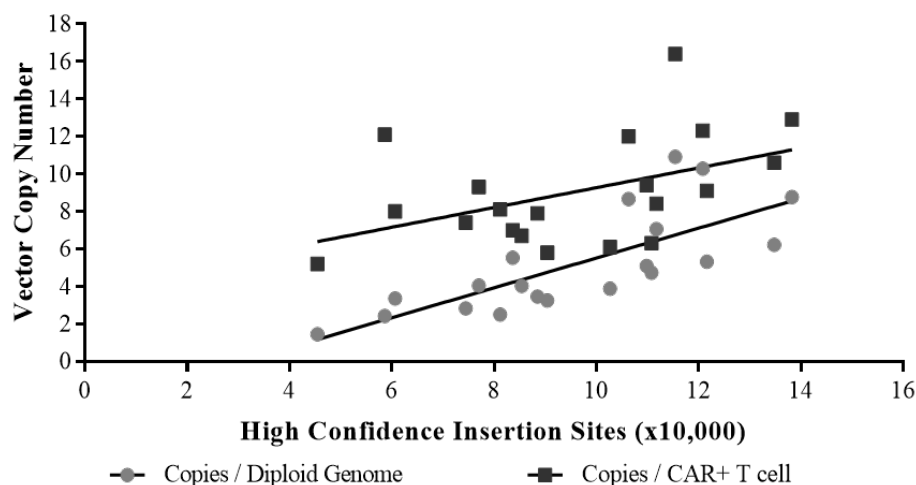
臨床試験で製造した 20 ロットの製剤は、それぞれの細胞表面 CAR 発現（CAR 発現 T 細胞率 [%]）及びベクターコピー数（VCN、二倍体ゲノム当たりのコピー数 [コピー数/二倍体ゲノム数] 及び CAR 発現 T 細胞当たりのコピー数 [コピー数/CAR 発現 T 細胞数]）といった特性及びこれまでの製造実績に基づき選択した。本試験で用いたすべての製剤は、BB2121-MM-001 又は CRB-401 の臨床試験に参加した患者に投与された。

bb2121 細胞を回収し、DNA 単離後にベクター挿入部位及び隣接配列を解析した。標準的な Shearing-Extension Primer Tag Selection/Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction (S-EPTS/LM-PCR) 及びディープシーケンシングにより、挿入された LVV の隣接配列を決定した。すなわち、T 細胞から単離したゲノム DNA について、剪断、精製、ビオチン化プライマーによる伸長、磁気ビーズによる回収、リンカーライゲーション実施後に配列決定した。ゲノム上の特定部位にマッピングされたすべての配列に対する検出されたすべての挿入部位の相対配列数を算出した。各検体について 10 ヲ所の主要な挿入部位（シーケンスリードが最も多い挿入部位）を解析した。

合計 31,689,625 のシーケンスリードが得られ、bb2121 の CAR T 細胞集団内の非反復挿入部位として合計 200 万ヶ所を超えるベクター固有の挿入部位が得られた。評価に用いたすべての製剤（シーケンスリードの 10% のランダムサブセット）は臨床製造実績の VCN の典型的な範囲内であった。

信頼度の高い挿入部位数及び VCN の間で高い相関が認められた（Figure 1）。

Figure 1: VCN とベクター固有の挿入部位の相関



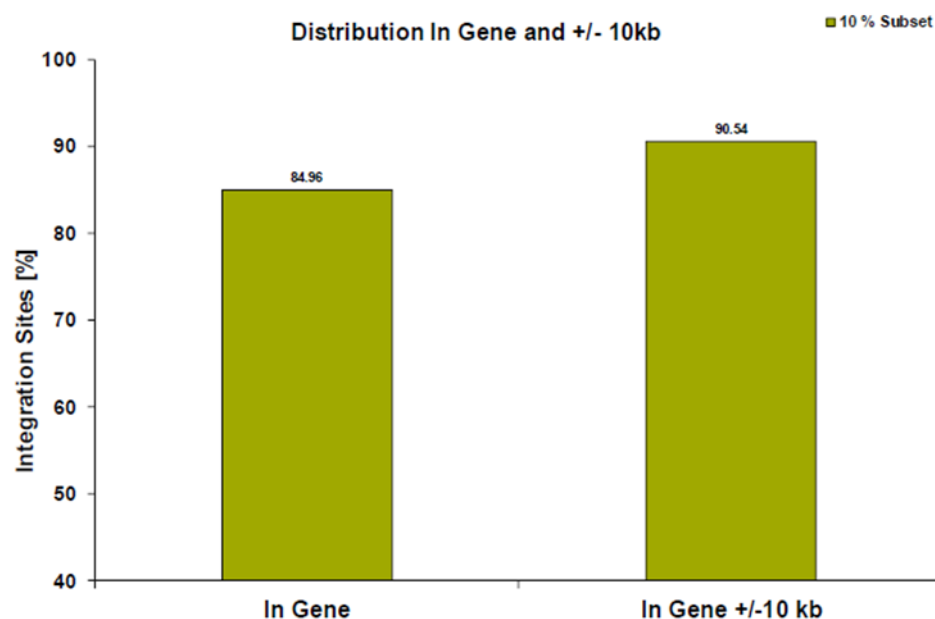
CAR = キメラ抗原受容体、VCN = ベクターコピー数

相関係数を示す Spearman の ρ (ロー) 値は 0.8256 (コピー数/二倍体ゲノム数) 及び 0.4797 (コピー数/CAR 発現 T 細胞数) であった。

出典：報告書 RPT-018619

84%以上の挿入部位は遺伝子のコーディング領域に位置し（Figure 2）、転写開始部位（TSS）の上流への挿入頻度は 2.24%と低頻度であった（Figure 3）。この LVV の挿入プロファイルは、LVV がプロモーター及び TSS のような遺伝子制御領域よりも遺伝子のコーディング領域へ挿入されやすく、遺伝子制御不全の可能性が低いことを示唆した（Lewinski, 2006; Schröder, 2002）。

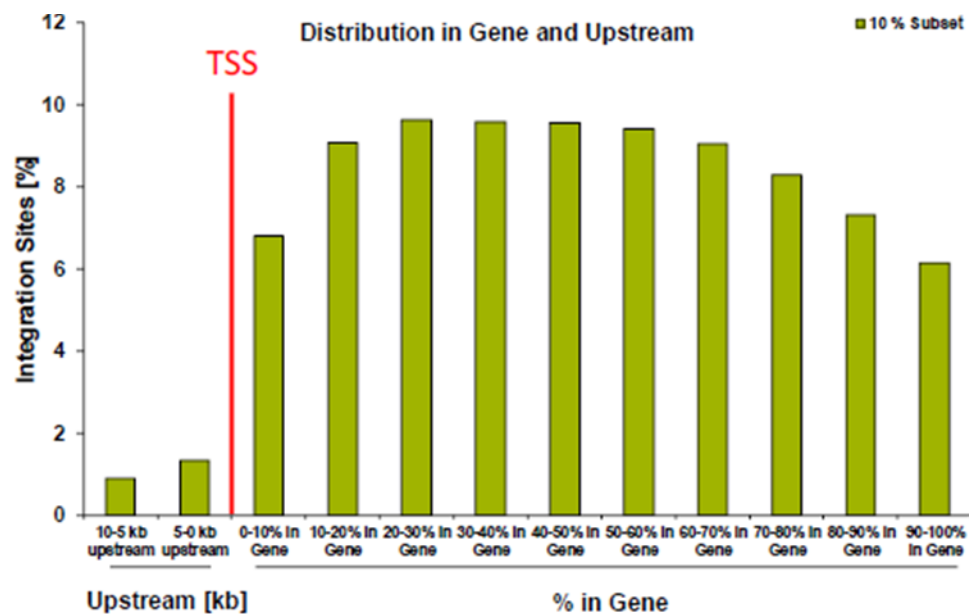
Figure 2: 遺伝子のコーディング領域及びその近傍領域への挿入



kb = キロベース

出典: 報告書 RPT-018619

Figure 3: 転写開始領域へのベクター挿入プロファイル

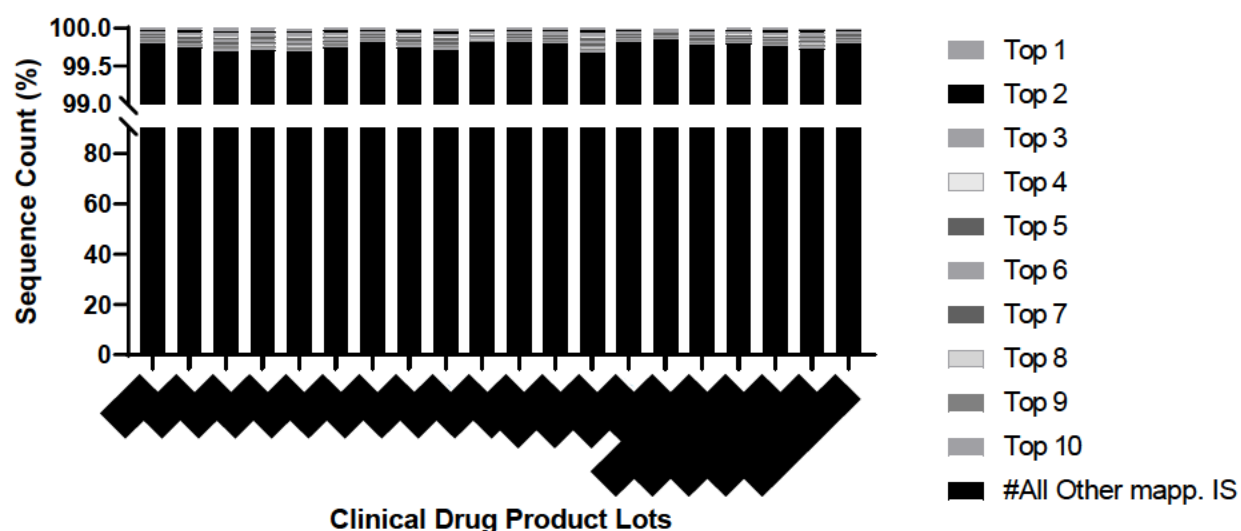


kb = キロベース

出典: 報告書 RPT-018619

すべての製剤ロットの統合 S-EPTS/LM-PCR 解析には、すべてのシーケンスリードのうち 10% のサブセットを用いた。すべての検体を通じて、同定された上位 10 ヶ所の信頼度の高い挿入部位は、各検体のベクター固有の挿入部位の総数の 0.35% 未満であり、各検体の主要な 10 ヶ所のベクター挿入部位では、個々のアンプリコン内で反復していないことから、高度な多クローン性のベクター挿入の指標であり、顕著に高頻度のベクター挿入はないことが示された (Figure 4)。

Figure 4: 製剤で検出された上位 10 ヶ所の挿入部位の累積頻度

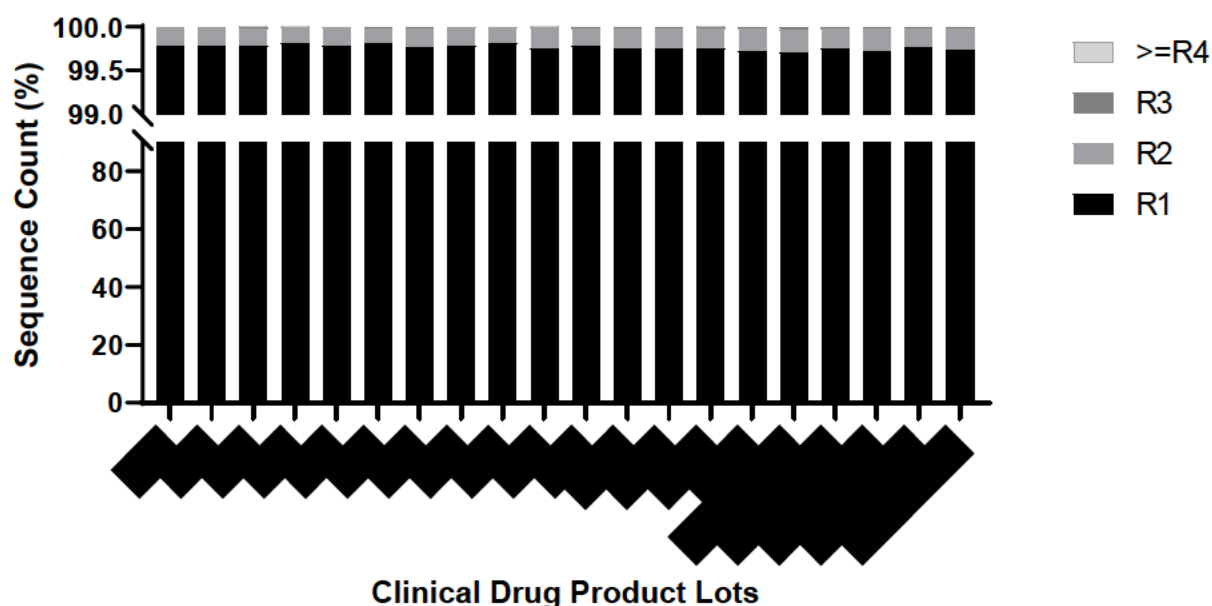


IS = 挿入部位、mapp. = マッピングされた、# = 数

出典：報告書 RPT-018619

本解析により、bb2121 細胞のゲノム上のいずれか 1 つの部位に存在するベクター断片数を評価し、挿入された LVV の構造完全性を確認した。いずれのベクター配列が含まれるマッピングされたシーケンスリードにおいても、1 つのベクター配列が高頻度（R1 が 99.7% 以上）に出現することから明らかのように、すべての検体で LVV は一貫して 1 つの遺伝子座に単一コピーとして T 細胞のゲノムに挿入されている（Figure 5）。残りの 0.3% 未満の挿入部位は、リード配列に少なくとも 2 つのベクター配列を含んでいた。これらの結果から、1) LVV が T 細胞のゲノムに挿入された際にコンカテマー及びホットスポットを形成しないこと、2) ベクターが 99.7% 以上の挿入部位で単一の中断されていない連続配列として存在することが示された。

Figure 5: 各検体のベクター再構成解析

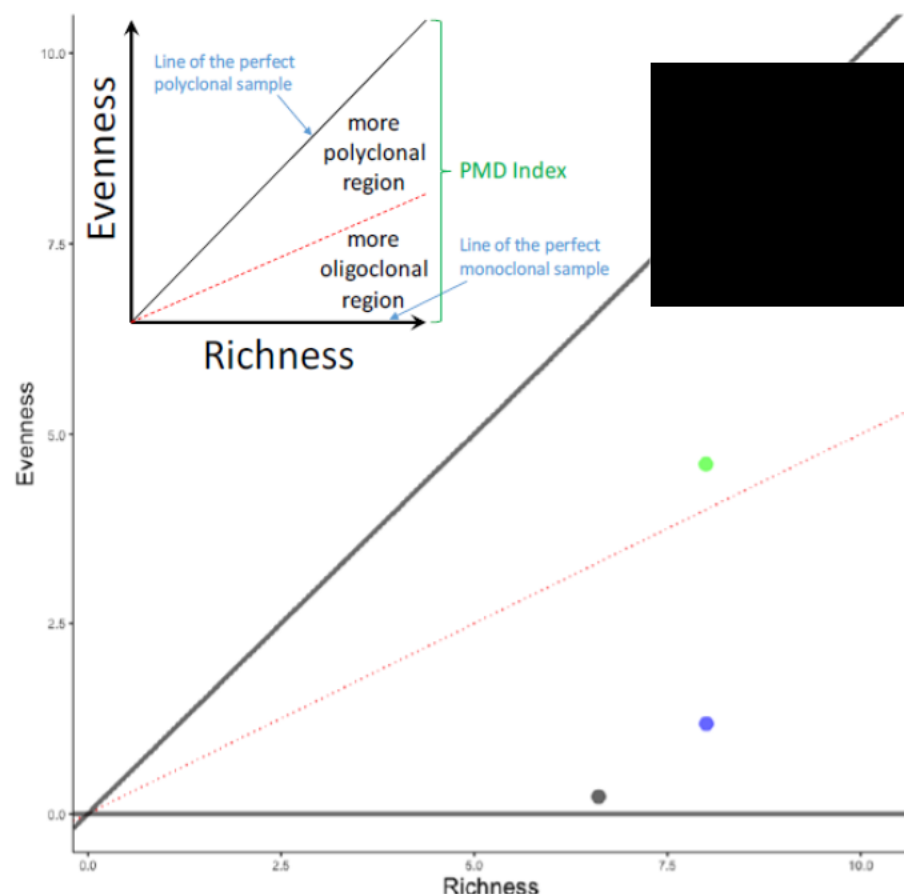


出典：報告書 RPT-018619

Polyclonal-Monoclonal Distance (PMD) 解析は、10%の検体サブセットを用い、抗 BCMA CAR LVV により遺伝子導入したすべての検体で実施した。X 軸上の単クローン性（豊富さ）と Y 軸上の多クローン性（均等度）で示される多様性の 2 つの相反する成分を用い、クローン性について解析した。PMD 解析に基づき、高度な多クローン性挿入プロファイルがすべての検体で認められた

(Figure 6)。すべての製剤ロットはグラフの右上の領域に位置し、これは高度な多クローン性を示唆している。この結果は、bb2121 細胞の製造工程における ex vivo で T 細胞増殖中にベクター挿入に起因した発がんによるクローン選択は認められなかったことを裏付けるものであった。

Figure 6: クローン構成の PMD 解析



PMD = Polyclonal-Monoclonal Distance

データポイントは高度な優性クローン（黒）、少クローン性検体（青）及び多クローン性検体（緑）を対照検体として示した。

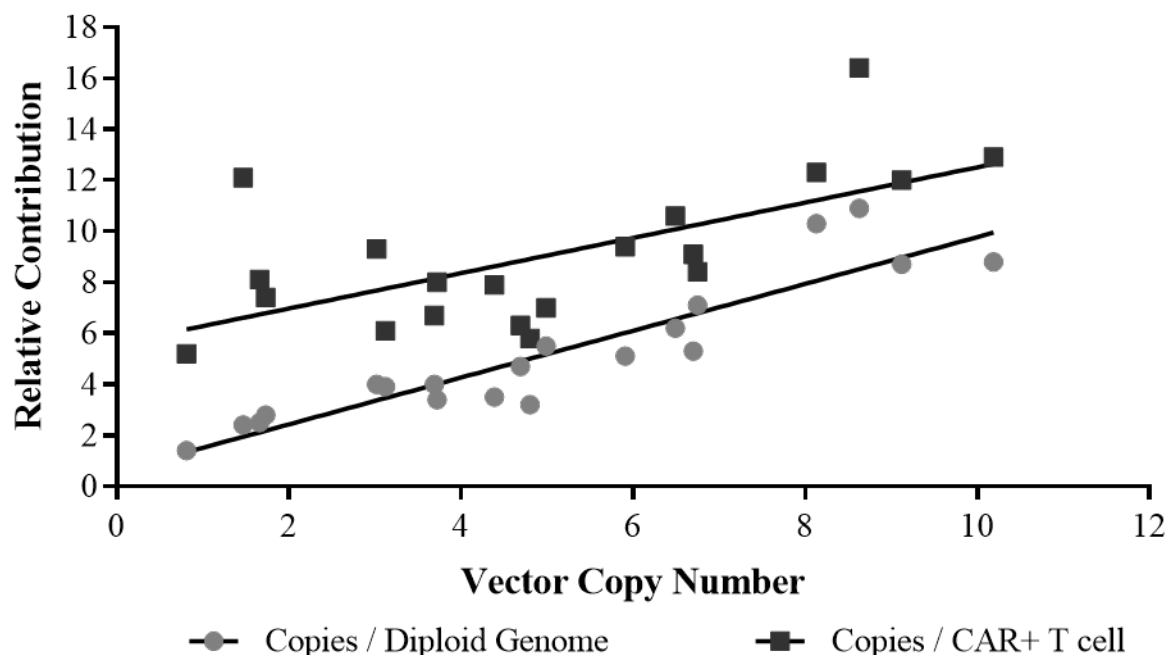
出典：報告書 RPT-018619

10%のサブセットを用いた T 細胞検体から取得した挿入部位データから、上位 10 ヶ所の 3,649 の共通挿入部位（生物学的に意味のある挿入部位クラスター）が検出された。共通挿入部位解析から共通挿入部位の多様な構成が確認され、この結果は挿入部位解析の結果と一致している。

同定された共通挿入部位の上位 10 ヶ所のうち、既に臨床で報告されている遺伝子治療におけるクローン増殖や悪性形質転換のような有害事象と関連したものはなく、典型的なレンチウイルス挿入遺伝子座（最上位の共通挿入部位には LVV の標的となることが多い PACS1 遺伝子座など）が検出されている。

各検体の挿入部位リード数の総リード数における相対的寄与を比較するために、最上位の共通挿入部位における検体当たりの各挿入部位リード数及び総リード数を算出した。検体当たりのリード数の相対的寄与度は、VCN/二倍体ゲノム数及び VCN/CAR 発現 T 細胞数と高い相関が認められた (Figure 7)。

Figure 7: 最上位の共通挿入部位の挿入部位構成と VCN との比較



CAR = キメラ抗原受容体

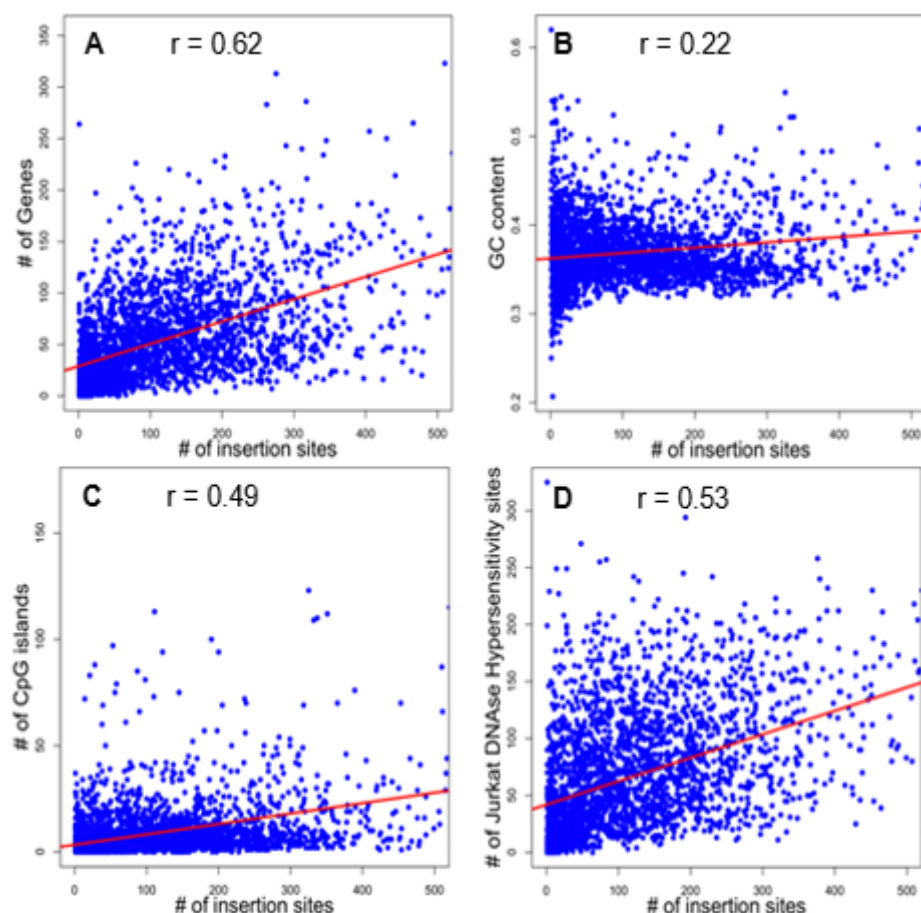
10%のシーケンスリードサブセットを用いて解析した。また、Spearman の ρ 値は 0.9237 (VCN/二倍体ゲノム数) 及び 0.5744 (VCN/CAR 発現 T 細胞数) であった。

出典：報告書 [RPT-018619](#)

ゲノム 1 Mb 当たりの挿入部位密度と選択したゲノム特性（遺伝子密度、CpG アイランド密度、DNaseI 高感受性部位密度及び平均 GC 含量の算出）との相関を評価するために、10%のシーケンスリードサブセットから相関係数を算出した (Figure 8)。

選択したすべてのゲノム特性は信頼度の高い挿入部位密度とともに有意に増加した。最も強い相関は、遺伝子と挿入部位密度 ($r=0.62$, Figure 8 A)、次に DNaseI 高感受性部位 ($r=0.53$, Figure 8 D) で認められた。GC 含量は、評価したゲノム特性の中で挿入部位密度と最も弱い相関であった ($r=0.22$, Figure 8 B)。本挿入プロファイルは、WT HIV についての報告 (Schröder, 2002) から予測されたものであった。

Figure 8: 挿入部位密度とゲノム特性の相関



CpG = シトシンの次にグアニンが並ぶ直鎖状配列、GC = グアニン-シトシン塩基対、# = 数

A = 遺伝子密度、B = GC 含量、C = CpG アイランド密度、D = DNaseI 高感受性部位密度

$p < 0.5 \cdot 10^{-10}$ 、 r = 相関係数 (Pearson's)

出典：報告書 RPT-018619

合計 8,704 の信頼度の高い挿入部位が選択したがん関連遺伝子の TSS の 100 kb 以内で同定され、すべての検体で同定した挿入部位総数 (31,689,625 の信頼度の高い挿入部位) 中の少数であった。がん遺伝子の TSS の 100 kb 以内の信頼度の高い挿入部位における最高頻度は 0.031%であった

(Figure 9)。この挿入プロファイルから、悪性形質転換の機序の 1 つであるがん遺伝子の TSS に特異的な挿入がないことを示唆される。これらの結果は、評価に用いた VCN にばらつきのあるすべての製剤において共通していた。

以下の結論が得られ、挿入、多クローン性及び選好性に関して遺伝子導入による懸念は認められなかった。

- 信頼度の高い挿入部位数は VCN と高い相関を示し、コピー数/二倍体ゲノム数及びコピー数/CAR 発現 T 細胞数における Spearman の ρ 値はそれぞれ 0.8256 及び 0.4797 であった。
- 抗 BCMA LVV の挿入プロファイルは、遺伝子制御領域よりも発現遺伝子のコーディング領域に挿入されやすいことを示しており、これにより遺伝子制御不全にする挿入の可能性が低下するため、悪性形質転換を介した発がんの可能性も低いと考えられる。
- 本ベクターは、ベクター配列を含むリード配列の 99.76%で単一のプロウイルス配列として存在している。これらの結果は、ベクターゲノムの大部分がコンカテマーへの指向性はないことを示している。
- すべての検体で同定された上位 10 ヶ所の信頼度の高い挿入部位は、検体当たりのベクター固有の挿入部位総数の 0.35%未満であり、10 ヶ所の主要なベクターの挿入部位は、いずれも主要な反復挿入部位がなく、高度な多クローン性の指標である個々のアンプリコン内で反復していないことを示した。
- すべての検体で高度な多クローン性が認められたことから、bb2121 細胞の製造工程における ex vivo での T 細胞増殖中にベクター挿入に起因した発がんによるクローン選択は認められなかったということを裏付けるものであった。
- 評価項目として選択されたすべてのゲノム特性（遺伝子密度、CpG アイランド密度、DNaseI 高感受性部位密度、平均 GC 含量）は、WT HIV の報告（Schröder, 2002）に基づく予測に一致して信頼度の高い挿入部位密度とともに有意に増加した。
- がん遺伝子の TSS の 100 kb 以内の信頼度の高い挿入部位における個々の検体の中での頻度で最も高いものでも 0.031%であり、低頻度であった。この挿入プロファイルは、悪性形質転換の機序の 1 つであるがん遺伝子の TSS に特異的な挿入がないことを示唆している。

5. がん原性試験

bb2121 は自家ヒト細胞製品であるため、がん原性の有無を検討するための標準的なげっ歯類モデルの有用性は限定的である。したがって、挿入突然変異による発がん（4 項）及び bb2121 細胞の形質転換（5.1 項）の可能性について評価し、標準的なげっ歯類のがん原性試験は実施していない。

5.1. 臨床製剤及び健康成人ドナー由来製剤の IL-2 依存的細胞増殖試験

[報告書番号 RPT-018530、添付資料 4.2.3.4.1.1、参考資料]

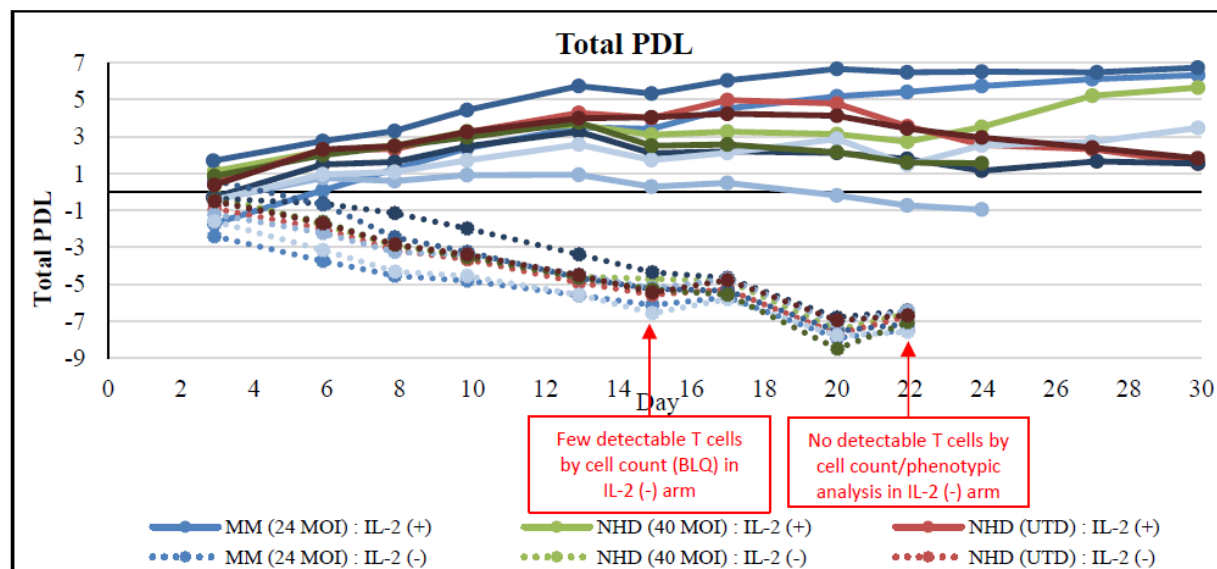
本試験では、遺伝子導入 T 細胞が形質転換する可能性について、IL-2 の存在下及び非存在下での T 細胞の増殖能により評価した。IL-2 依存的増殖性 T 細胞から IL-2 非依存的増殖性 T 細胞への形質転換は、ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV）-I 感染 T 細胞の悪性形質転換の後に生じることが報告されており（Ahsan, 2006; Maeda, 1985; Migone, 1995; Yoshida, 2001）、変異原性及び形質転換のサロゲートマーカーとして用いられる。

MM 患者由来遺伝子導入細胞及び健康成人ドナー由来 T 細胞（抗 BCMA CAR LVV による遺伝子導入の実施細胞及び未実施細胞の両方を含む）を IL-2 存在下又は非存在下で培養した。複数時点で細胞を回収し、フローサイトメトリーにより表現型を、T 細胞受容体（TCR）配列解析により TCR のクローンの多様性を評価した。形質転換の主な指標は IL-2 非存在下での細胞増殖能と考えられ、これを裏付ける副次的指標として表現型及び TCR クローン性の変化を評価した。

IL-2 非存在下では、すべての T 細胞（遺伝子導入及び非遺伝子導入）で総細胞数が経時的に減少し、細胞集団の累積分裂回数（PDL）は負数であった。培養 22 日目では、細胞は検出されなかった（Figure 10）。CAR 発現率の増加は、IL-2 非存在下では認められず、IL-2 存在下ではドナーにより多様であった（Figure 11）。非遺伝子導入細胞を含むすべての培養でクローンの多様性の全体的な低下が認められたが、これは形質転換を示すものではなく、全体的な細胞数の減少により培養中のクローンの多様性が経時的に低下した結果であると考えられた（Figure 12 及び Figure 13）。

IL-2 依存的増殖試験の結果、IL-2 非存在下では細胞増殖は認められなかった。また、いずれの条件下でも、CAR 発現 T 細胞の表現型及び CD4 : CD8 比に明らかな変化は認められず、クローンの多様性が大幅に低下することはなかった。これらの結果から、bb2121 細胞は抗 BCMA CAR LVV により悪性形質転換しないことが示された。

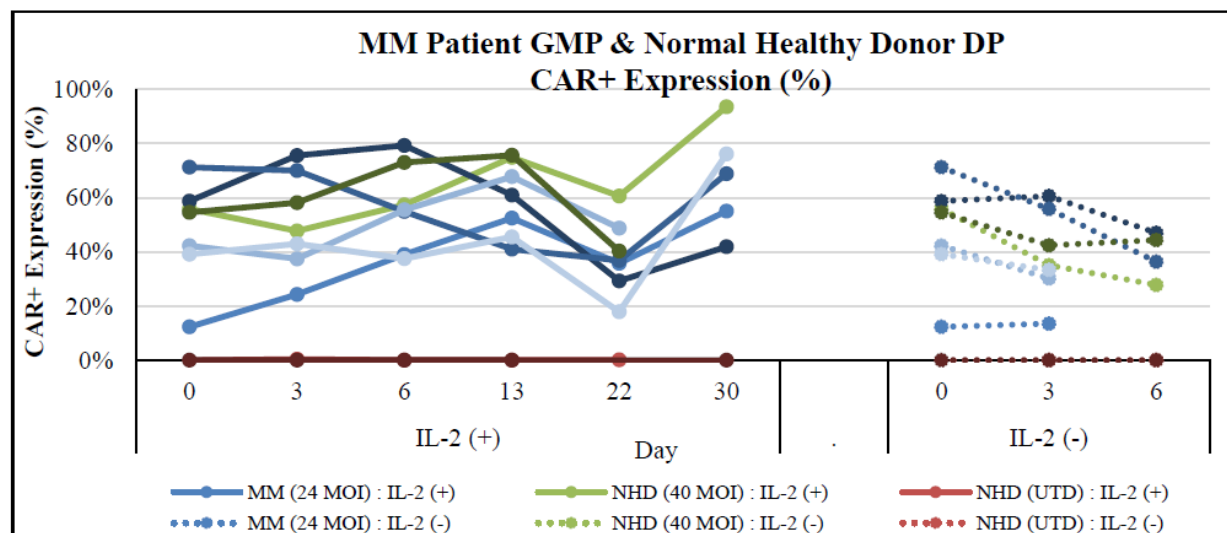
Figure 10: MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の増殖プロファイル



BLQ = 定量限界以下、IL = インターロイキン、MM = 多発性骨髄腫、MOI = 感染多重度、NHD = 健康成人ドナー、PDL = 細胞集団の累積分裂回数、UTD = 非遺伝子導入

出典：報告書 RPT-018530

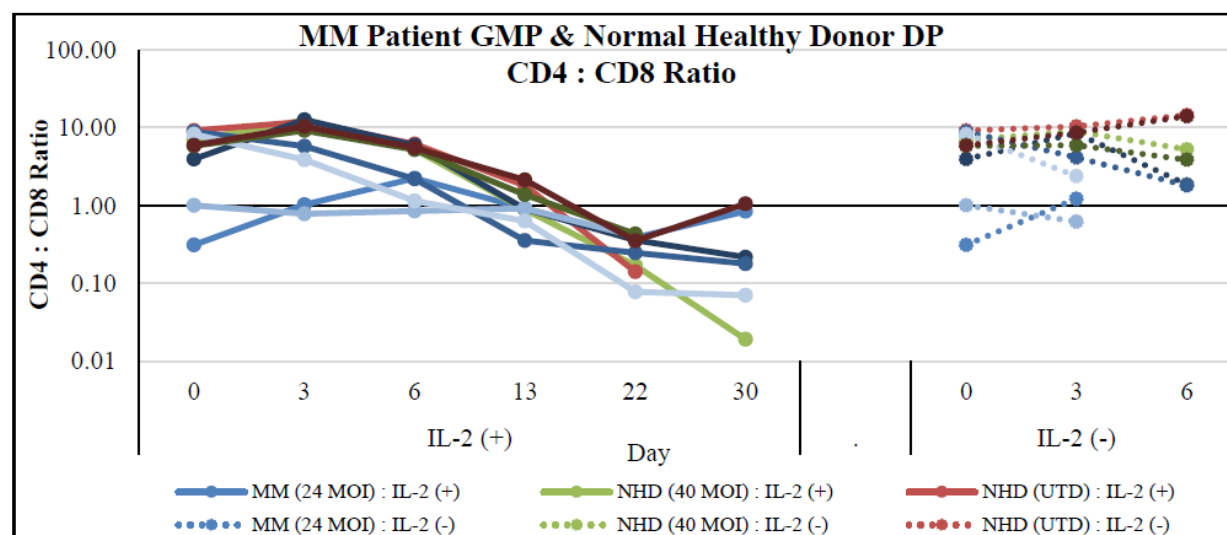
Figure 11:MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の CAR 発現率プロファイル



CAR = キメラ抗原受容体、DP = 製剤、IL = インターロイキン、MM = 多発性骨髄腫、MOI = 感染多重度、NHD = 健康成人ドナー、UTD = 非遺伝子導入

出典：報告書 RPT-018530

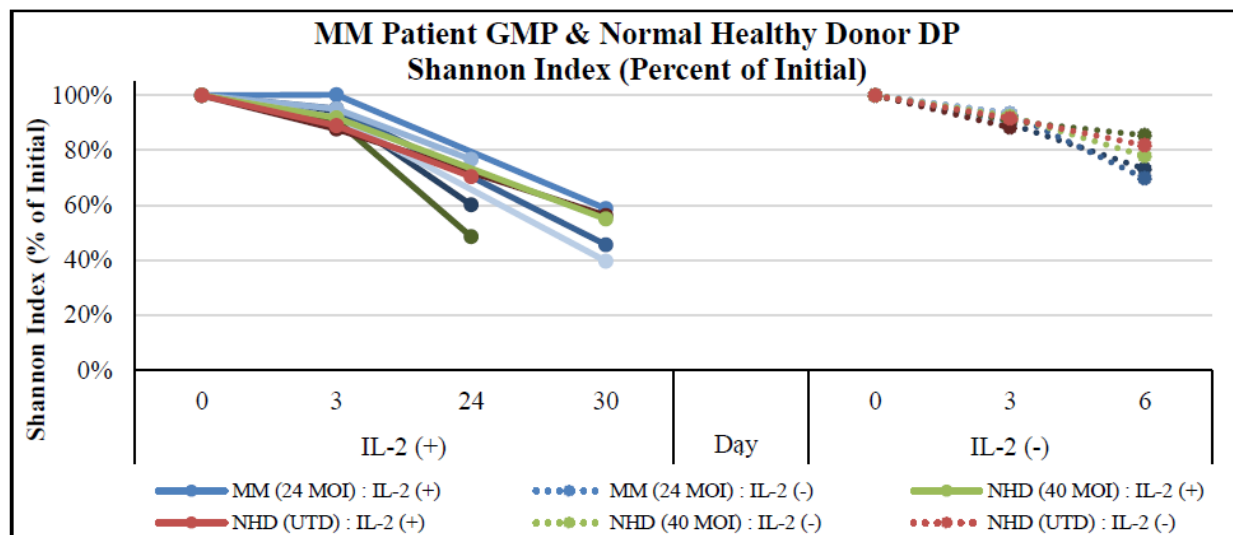
Figure 12:MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の CD4 : CD8 比プロファイル



CD = 分化抗原群、DP = 製剤、IL = インターロイキン、MM = 多発性骨髄腫、MOI = 感染多重度、NHD = 健康成人ドナー、UTD = 非遺伝子導入

出典：報告書 RPT-018530

Figure 13:MM 患者及び健康成人ドナー由来 bb2121 細胞の多様度指数



DP = 製剤、IL = インターロイキン、MM = 多発性骨髄腫、MOI = 感染多重度、NHD = 健康成人ドナー、UTD = 非遺伝子導入

出典：報告書 RPT-018530

6. 生殖発生毒性試験

bb2121 の生殖発生毒性試験は実施していない。

7. 局所刺激性試験

bb2121 の局所刺激性試験は実施していない。

8. その他の毒性試験

BCMA の発現及び分布を確認するため、抗ヒト BCMA 抗体の組織交差反応性試験（GLP 適合）並びに抗ヒト BCMA 抗体及び bb2121 細胞の BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質を発現させた細胞マイクロアレイを用いた標的及び標的外結合能の評価を実施した。

8.1. 抗ヒト BCMA 抗体のヒト組織交差反応性試験

[報告書番号 B4-097、添付資料 4.2.3.7.7.1、評価資料]

BCMA の発現及び分布を明らかにするため、正常ヒト組織の凍結切片を免疫染色し、ヤギ由来抗ヒト BCMA 抗体の反応性を評価した。

正常組織の凍結切片にヤギ由来抗 BCMA ポリクローナル抗体を 2 及び 10 µg/mL の濃度で添加した。また、陰性対照抗体にはヤギ抗ヒト BCMA 抗体とは異なる抗原特異性を有するヤギ IgG ポリクローナル抗体（抗 CkIgY 抗体）を用いた。さらに、一次抗体を添加しないアッセイ対照を設けた。

陽性対照細胞株の MM 細胞株 RPMI8226 細胞の細胞塊凍結切片では、ヤギ抗ヒト BCMA 抗体の高濃度（10 µg/mL）で細胞膜及び細胞質に軽度～高度の染色が認められ、染色頻度は散発的～高頻度であった。低濃度（2 µg/mL）の染色では、染色頻度はまれ～散発的に低下した。ヒト小腸の凍結切片では、ヤギ抗 BCMA 抗体の両濃度で粘膜固有層内に時折認められる単核細胞の細胞膜及び細胞質を

軽度～高度な染色が認められ、既知の BCMA 陽性形質細胞の組織分布 (Bellucci, 2005; Carpenter, 2013; Kalled, 2005; Laabi, 1994; Laabi, 1992; Ng, 2004; O'Connor, 2004) と一致した。陰性対照細胞の骨髓性赤白血病細胞株 K562 細胞の細胞塊凍結切片では、ヤギ抗 BCMA 抗体との特異的反応はいずれの濃度でも認められなかった。また、陰性対照抗体のヤギ抗 CkIgY 抗体は、陽性及び陰性対照細胞のいずれとも特異的反応を示さなかった。アッセイ対照（一次抗体非添加）では、染色は認められなかった。ヤギ抗 BCMA 抗体が陽性対照細胞と特異的反応を示し、陰性対照細胞とは特異的反応を示さず、さらに陰性対照抗体が反応性を示さなかったことから、本試験系の感度、特異性及び再現性が確認された。

ヒト組織パネルでヤギ抗ヒト BCMA 抗体による染色が認められた組織を以下に要約する。

細胞膜の染色：

- 結腸、卵管（10 µg/mL のみ）、食道、小腸、胃、リンパ節、上皮小体（10 µg/mL のみ）、前立腺、唾液腺、胸腺（10 µg/mL のみ）及び扁桃の常在性、遊走性若しくは浸潤性単核細胞

細胞質の染色：

- 結腸、卵管（10 µg/mL のみ）、食道、小腸、胃、リンパ節、上皮小体（10 µg/mL のみ）、前立腺、唾液腺、胸腺（10 µg/mL のみ）及び扁桃の常在性、遊走性若しくは浸潤性単核細胞
- 甲状腺及び扁桃の紡錘細胞

紡錘細胞の染色については、これを裏付ける文献報告がないため予測されたものではなかったが、2 種の組織のみであったことからこの種の細胞の非特異的染色であった可能性も考えられる。正常ヒト組織中の常在性、遊走性若しくは浸潤性の単核細胞の細胞膜及び細胞質のヤギ抗ヒト BCMA 抗体による染色は、これを裏付ける正常ヒト組織中の形質細胞の BCMA 発現に関する文献報告

(Bellucci, 2005; Carpenter, 2013; Kalled, 2005; Laabi, 1994; Laabi, 1992; Ng, 2004; O'Connor, 2004) に基づいて予測されたことであり、正常ヒト組織における BCMA 発現が確認された。

8.2. 細胞マイクロアレイを用いた BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する抗 BCMA 抗体の標的及び標的外結合の評価

[報告書番号 B4-137、添付資料 4.2.3.7.7.2、参考資料]

HEK293 細胞株（ヒト胎児の腎由来細胞）の細胞マイクロアレイを用い、4 種の抗ヒト BCMA 抗体の BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する標的及び標的外結合を評価した。HEK293 細胞株には、細胞マイクロアレイの導入効率（タンパク質発現）を確認するための蛍光タンパク質（ZsGreen1）及び細胞の原形質膜表面に発現する単一の特異的な遺伝子組換えヒトタンパク質をコードするベクターを導入させた。本試験で用いた抗ヒト BCMA 抗体は、ヤギ由来抗 BCMA ポリクローナル抗体、マウス IgG2a モノクローナル抗体（mAb）クローン 19F2 並びにマウス IgG1 mAb クローン 17G5.A8 及び 17G5.B2 であった。ヒト BCMA への結合性のないアイソタイプ対照抗体には、ヤギ IgG 対照抗体並びにマウス IgG1 及び IgG2a 対照抗体を用いた。HEK293 細胞の発現タンパク質は、BCMA（別称：腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー17 [TNFRSF17]）、既知の 29 種類の TNFRSF メンバータンパク質のうち 22 種類及び抗 BCMA mAb と結合する可能性のあるその他の 358 種類の遺伝子組換え細胞表面タンパク質を用いた。

導入効率（遺伝子マーキング又は遺伝子組換えタンパク質発現）及び抗体の結合は、蛍光画像解析を用いて検出・定量した。その結果、1) HEK293 細胞は、BCMA 及びその他の TNFRSF メンバー並びにこれらと関連性のない抗 BCMA 抗体に認識されるタンパク質を通常発現していないこと、2)

市販のヤギ抗 BCMA 抗体及びマウス mAb 19F2 並びに独自に作製したマウス抗 BCMA mAb クローン 17G5.A8 及び 17G5.B2 は BCMA のみに特異的に結合することが示された。これらの抗体は、試験した 22 種類の TNFRSF メンバータンパク質及び 358 種類の関連性のないタンパク質のいずれにも結合しなかった。したがって、これらの抗 BCMA 抗体は BCMA に特異的であり、さらに、BCMA は他の TNFRSF メンバータンパク質と交差反応性を示すエピトープを共有しないと考えられる。

8.3. 細胞マイクロアレイを用いた BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する bb2121 細胞の標的及び標的外結合の評価

[報告書番号 RP1343、添付資料 4.2.3.7.7.3、参考資料]

HEK293 細胞株の細胞マイクロアレイを用い、bb2121 細胞の BCMA 関連及び非 BCMA 関連タンパク質に対する標的及び標的外結合を評価した。HEK293 細胞株には、細胞マイクロアレイの導入効率（タンパク質発現）を確認するための蛍光タンパク質（ZsGreen1）及び細胞の原形質膜表面に発現する単一の特異的な遺伝子組換えヒトタンパク質をコードするベクターを導入させた。HEK293 細胞の発現タンパク質は、BCMA（TNFRSF17）を含む 5861 種類のヒト細胞膜タンパク質及び細胞表面に固定化させた分泌タンパク質に加え、371 種類のヒトヘテロダイマーを用いた。

導入効率（遺伝子マーキング又は遺伝子組換えタンパク質発現）及び細胞の結合は、蛍光画像解析を用いて検出・定量した。その結果、bb2121 細胞の 17 種類のタンパク質及びヘテロダイマーに対する結合が認められたが、そのうち BCMA を除く 16 種類は対照群（抗 BCMA CAR 遺伝子非導入 T 細胞）でも結合が認められたため、非特異的な結合であると考えられた。この結果から BCMA への bb2121 細胞の結合は特異的であることが確認された。

8.4. 新規添加剤の安全性評価

bb2121 の副成分である Plasma-Lyte A にはグルコン酸ナトリウムが含有されており、bb2121 製品中の濃度は ■ mg/mL である。bb2121 の予定臨床投与量（最大 250 mL）から算出したグルコン酸ナトリウムの一最大投与量は ■ mg である。本用量は静脈内投与での使用前例である 57 mg¹を超えているため、安全性を評価した。本邦で上市されている医薬品でグルコン酸ナトリウムを含有するマイオビュー「注射用」の毒性試験情報に加え、血中でグルコン酸及びカルシウムイオンとして存在すると考えられるグルコン酸カルシウムを含有するカルチコール注射液 8.5% 5 mL/10 mL（カルチコール注射液）の毒性試験情報から安全性を評価した。マイオビュー「注射用」のラット及びウサギ単回投与毒性試験では、1500 mg（マイオビュー「注射用」の最大臨床用量 [1 バイアル] の 1500 倍 [1 バイアルにグルコン酸ナトリウムを 1 mg 含有]）まで投与しても明らかな所見は認められなかった²。本用量は bb2121 に含有されるグルコン酸ナトリウムの一最大投与量の約 ■ 倍に相当する。また、グルコン酸カルシウムのイヌ 6 ヶ月間反復投与毒性試験では、グルコン酸カルシウムをカルシウムとして 10 mg/kg/day の用量（グルコン酸として 97 mg/kg/day）でイヌに 6 ヶ月間静脈内投与した結果、一般症状、行動、体重及び体温は正常であり、反復して行った注射部位に対する刺激並びに高カルシウム血症も認められず、尿検査でも明らかな変化はみられなかった³。本用量は bb2121 に含有されるグルコン酸としての一日最大投与量の約 ■ 倍に相当する。なお、カルチコール注射液のヒト最大用量は 2000 mg（グルコン酸として 1740 mg）³であり、bb2121 に含有さ

¹ 日本医薬品添加剤協会ホームページ 医薬品添加物安全性データ、グルコン酸ナトリウム
(<http://www.jpec.gr.jp/detail=normal&date=safetydata/ka/daku16.html>)

² 日本メジフィジックス株式会社、マイオビュー「注射用」医薬品インタビューフォーム、2019 年 9 月改訂（第 6 版）。

³ 日医工株式会社、カルチコール注射液 8.5% 5 mL/10 mL 医薬品インタビューフォーム、2018 年 8 月改訂（第 3 版）。

れるグルコン酸としての一日最大投与量の約 ■■■ 倍に相当する。したがって、本添加剤のヒトでの安全性は担保されていると考えられた。

9. 考察及び結論

bb2121 は、抗 BCMA CAR LVV を用いて遺伝子導入したヒト T 細胞を主成分とした遺伝子改変自家 T 細胞免疫療法製剤である。したがって、bb2121 細胞を動物に投与する従来の毒性試験から得られる安全性情報は限定的と考えられ、標準的な一般毒性試験、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。また、bb2121 の用法は単回投与（点滴）であるため、反復投与毒性試験は実施しなかった。bb2121 の安全性試験としては、挿入突然変異誘発によるベクターの遺伝毒性及び遺伝子導入細胞の悪性形質転換能を評価した。また、bb2121 の標的である BCMA の分布について、正常ヒト組織を用いた交差反応性試験を実施した。

MM 患者及び健康成人ドナー由来の bb2121 細胞の挿入部位解析では、がん原性はないことが示唆された。すべての抗 BCMA CAR LVV を導入した T 細胞は高度に多クローン性が示され、主要な挿入部位は認められなかった。これまでに報告のある遺伝子治療で重度の有害事象に関与したことがある遺伝子（例：CCND2、LMO2、MDS1/EVI1 [MECOM]、MN1 [Hacein-Bey-Abina, 2003a, 2003b, 2008; Ott, 2006; Deichmann, 2007; Howe, 2008; Boztug, 2010; Braun, 2014]）やその近傍における挿入選好性は認められなかった。

IL-2 依存的増殖試験の結果から、bb2121 細胞の製造工程で遺伝子導入後の T 細胞の悪性形質転換は認められなかった。IL-2 非添加の培養では細胞増殖は認められなかった。評価したいずれの条件下でも、CAR 発現 T 細胞の表現型及び CD4 : CD8 比に明らかな変化は認められず、クローンの多様性の大幅な低下も認められなかった。これらの結果から、抗 BCMA CAR LVV はがん原性がないことが示唆された。

正常ヒト組織における BCMA の発現及び分布については、抗ヒト BCMA 抗体を用いたヒト組織交差反応性試験を、抗ヒト抗体及び bb2121 細胞のヒト BCMA 特異性については、細胞マイクロアレイを用いた標的及び標的外タンパク質結合能試験をそれぞれ実施し、標的外毒性のリスクが低いことが示唆された。

新規添加剤の安全性評価の結果、ヒトでの安全性は担保されていると考えられた。

非臨床薬理試験（モジュール 2.6.2 「薬理試験の概要文」 2.2 項及びモジュール 2.6.3 「薬理試験概要表」 2 項）、前述した挿入部位解析及び挿入突然変異誘発性、抗ヒト BCMA 抗体の組織交差反応性並びに抗ヒト BCMA 抗体及び bb2121 細胞の標的及び標的外タンパク質結合能の評価結果から、免疫調節薬、プロテアソーム阻害薬及び抗 CD38 抗体を含む 3 つ以上の前治療歴を有する成人 MM 患者の治療剤として bb2121 の安全性が支持された。

10. 参考文献

- Ahsan MK, Masutani H, Yamaguchi Y, Kim YC, Nosaka K, Matsuoka M, et al. Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin binding protein-2. *Oncogene*. 2006;25(15):2181-91.
- Bellucci R, Alyea EP, Chiaretti S, Wu CJ, Zorn E, Weller E, et al. Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor. *Blood*. 2005;105(10):3945-50.
- Biffi A, Bartholomae CC, Cesana D, Cartier N, Aubourg P, Ranzani M, et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood*. 2011;117(20):5332-9.
- Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Avedillo Diez I, Dewey RA, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich Syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1918-27.
- Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A, Rothe M, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome – Long term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med*. 2014;6(227):227ra33.
- Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2048-60.
- Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, Garrigue A, Brugman MH, Hu J, et al. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2225-32.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003a;348(3):255-6.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulich P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003b;302(5644):415-9.
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3132-42.
- Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3143-50.
- Kalled SL. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204:43-54.
- Laabi Y, Gras MP, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A. The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(7):1147-54.
- Laabi Y, Gras MP, Carbonnel F, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, et al. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J*. 1992;11(11):3897-904.
- Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, et al. Retroviral DNA integration: Viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Path*. 2006;2(6):e60.
- Maeda M, Shimizu A, Ikuta K, Okamoto H, Kashihara M, Uchiyama T, et al. Origin of human T-lymphotrophic virus I-positive T cell lines in adult T cell leukemia. Analysis of T cell receptor gene rearrangement. *J Exp Med*. 1985;162(6):2169-74.
- Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, et al. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*. 1995;269(5220):79-81.

Ng LG, Sutherland APR, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol.* 2004;173(2):807-17.

O'Connor BP, Raman VS, Erickson, LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med.* 2004;199(1):91-7.

Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* 2006;12(4):401-9.

Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110(4):521-9.

Yoshida T, Miyagawa E, Yamaguchi K, Kobayashi S, Takahashi Y, Yamashita A, et al. IL-2 independent transformation of a unique human T cell line, TY8-3, and its subclones by HTLV-I and -II. *Int J Cancer.* 2001;91(1):99-108.

TABLE OF CONTENTS

1.	毒性試験：一覧表	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	3
4.	毒性試験用原薬	3
5.	単回投与毒性試験	3
6.	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	3
7.	反復投与毒性試験：重要な試験	3
8.	遺伝毒性試験：IN VITRO 試験	4
8.1.	臨床製剤のベクター挿入部位解析	4
9.	遺伝毒性試験：IN VIVO 試験	6
10.	がん原性試験	7
10.1.	臨床製剤及び健康成人ドナー由来製剤の IL-2 依存的細胞増殖試験	7
11.	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	8
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	8
13.	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験	8
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	8
15.	新生児を用いた試験	8
16.	局所刺激性試験	8
17.	その他の毒性試験	9
17.1.	組織交差反応性試験	9
17.2.	標的及び標的外タンパク質結合能試験	10

1. 毒性試験：一覧表

Investigational Product: bb2121

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Report No.	Location in Dossier
Genotoxicity								
No traditional Genotoxicity studies were conducted.								
Integration Site Analysis	Human T cells	In vitro	N/A	N/A	No	Germany	RPT-018619	4.2.3.3.1.1
Carcinogenicity								
No traditional Carcinogenicity studies were conducted								
Insertional Mutagenesis (IL-2 independent growth study)	Human T cells	In vitro	N/A	N/A	No	Celgene Warren NJ USA	RPT-018530	4.2.3.4.3.1
Other Toxicity Studies								
Tissue Cross-reactivity	Human tissues (normal)	In vitro	N/A	N/A	Yes	USA	B4-097	4.2.3.7.7.1
Evaluation of Unintended (Off-target) Binding	Human embryonic kidney cells (HEK293)	In vitro	N/A	N/A	No	UK	B4-137	4.2.3.7.7.2
							RP1343	4.2.3.7.7.3

BCMA = B cell maturation antigen; Gt = goat; HEK = human embryonic kidney; N/A = not applicable.

2. トキシコキネティクス試験

該当なし

3. トキシコキネティクスデータ

該当なし

4. 毒性試験用原薬

該当なし

5. 単回投与毒性試験

該当なし

6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

7. 反復投与毒性試験：重要な試験

該当なし

8. 遺伝毒性試験：In vitro 試験

標準的な in vitro 遺伝毒性試験は実施していない。

8.1. 臨床製剤のベクター挿入部位解析

Investigational Product: bb2121

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No.
Human T cells	In vitro	N/A	N/A	20 clinical bb2121 drug products	Sequencing: 31,689,625 reads; > 2 million unique integration sites (IS) • HC-IS shows statistically significant correlation with VCN (Spearman's p values of 0.8256 and 0.4797 for copies/diploid genome and copies/CAR+ T cell, respectively). • The insertion profile of anti-BCMA LVV demonstrates preference for the coding regions of expressed genes versus regulatory elements, which decreases the likelihood of insertions that disrupt gene regulation and therefore the probability of oncogenesis via malignant transformation. • The vector exists as a single proviral sequence in 99.76% of vector containing reads which indicate that the majority of vector genomes present are not in concatemeric orientation. • Across all samples the top 10 HC-IS identified were < 0.35% of the total number of unique IS per sample and the ten most prominent vector IS showed no repetition in individual amplicons which is an indicator for a highly polyclonal vector insertion, without any dominant recurring vector IS. • A highly polyclonal vector integration profile was observed across all samples which supports the conclusion that no clonal selection due to vector insertional oncogenesis was observed during ex vivo T cell expansion in the bb2121 manufacturing process.	RPT-018619

8.1 臨床製剤のベクター挿入部位解析（続き）

Investigational Product: bb2121

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No.
Human T cells	In vitro	N/A	N/A	20 clinical bb2121 drug products	- All chosen genomic features tested (density of genes, CpG dinucleotides, DNaseI hypersensitivity sites, average GC base content) increased significantly with HC-IS density which was as expected based on what is known about WT HIV. - The highest frequency of HC-IS within a 100 kb window of the TSS of an oncogene was found to be 0.031%, which is a low frequency and thus a worst case per sample and suggests that there is no specificity of vector integration relative to the TSS of oncogenes.	RPT-018619

bp = base pairs; BCMA = B cell maturation antigen; CAR = chimeric antigen receptor; GC = guanine cytosine; CpG = cytosine phosphate guanine; DNA = deoxyribonucleic acid; HC = high confidence; HIV = human immunodeficiency virus; IS = integration site; LVV = lentiviral vector; N/A = not applicable; TSS = transcription start site; VCN = vector copy number; WT = wild type.

9. 遺伝毒性試験：In vivo 試験

該当なし

10. がん原性試験

標準的ながん原性試験は実施していない。

10.1. 臨床製剤及び健康成人ドナー由来製剤の IL-2 依存的細胞増殖試験

Investigational Product: bb2121

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No.
Human T cells	In vitro	N/A	N/A	5 clinical patient donors; 2 normal healthy donors Transduced and untransduced samples; with and without IL-2	Without IL-2: No T cell expansion - cell population doubling level (PDL) was negative for transduced and untransduced samples, with few detectable T cells at Day 15, and no detectable T cells at Day 22. No increase in CAR+ expression frequency compared to Day 0 No skewing of CAR T cell phenotypes or CD4:CD8 ratios No substantial decrease in clonal diversity With IL-2: PDL increased CAR+ expression increased in a variable and donor-dependent manner Changes in CD4:CD8 ratios Greater decrease in diversity compared to samples without IL-2	RPT-018530

CAR = chimeric antigen receptor; CD = cluster of differentiation; IL = interleukin; N/A = not applicable.

11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

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

該当なし

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当なし

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

該当なし

15. 新生児を用いた試験

該当なし

16. 局所刺激性試験

該当なし

17. その他の毒性試験

17.1. 組織交差反応性試験

Investigational Product: bb2121

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No.
Human tissues (normal)	In vitro	N/A	N/A	3 donors/tissue type (when available)	Positive Control (RPMI 8226 MM cells): Gt anti-BCMA stained membrane and cytoplasm (2 and 10 µg/mL) Negative Control (K562 cells): Gt anti-BCMA did not specifically react at 2 or 10 µg/mL Control Antibody (Gt anti-CkIgY): did not specifically react with either positive or negative controls Assay Control (primary antibody omission): no staining Test Tissues: Gt anti-BCMA stained membrane and cytoplasm of resident, migrating, and/or infiltrating mononuclear cells in several human tissues including colon, Fallopian tube (10 µg/mL only), esophagus, small intestine, stomach, lymph node, parathyroid (10 µg/mL only), prostate, salivary gland, thymus (10 µg/mL only), and tonsil. This staining was considered expected and consistent with the presence of BCMA+ plasma cells. Gt anti-BCMA stained cytoplasm of spindle cells in 1 thyroid and 2 tonsil samples; spindle cell staining was considered unexpected and may be nonspecific.	B4-097

17.2. 標的及び標的外タンパク質結合能試験

Investigational Product: bb2121

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Sex/No. per Group	Noteworthy Findings	Report No.
HEK293 cells	In vitro	N/A	N/A	N/A	- Non-transfected HEK293 cells do not express BCMA or other related TNFRSF member proteins, or unrelated proteins that would be recognized by an anti-BCMA Ab. In transfected HEK293 cells expressing TNSRFS and other proteins, Abs tested (goat anti-BCMA Ab AF193, mouse mAb 19F2, and mouse anti-BCMA mAbs 17G5.A8, and m17G5.B2) specifically bind to BCMA/TNFRSF17 only, and not to other known TNFRSF member proteins or to any of 358 unrelated proteins evaluated - The anti-BCMA Abs evaluated are specific for BCMA, and BCMA does not appear to share cross-reactive epitopes with other TNFRSF member proteins	B4-137
HEK293 cells	In vitro	N/A	N/A	N/A	bb2121 was screened for binding against fixed human HEK293 cells, individually expressing 5861 full-length human plasma membrane proteins and cell surface-tethered human secreted proteins plus 371 human heterodimers. This revealed 17 hits altogether. Of the 17 hits identified in the screening, 16 were positive for binding to the control T cells and thus considered to be non-specific. Thus, bb2121 showed a single specific interaction with BCMA, the primary target. These data indicate high specificity of bb2121 for its intended target.	RP1343

Ab = antibody; BCMA = B cell maturation antigen; Gt anti-BCMA = goat IgG antibody directed against human BCMA; Gt anti-CkIgY = goat anti-chicken IgY; HEK = human embryonic kidney; mAb = monoclonal antibody; MM = multiple myeloma; N/A = not applicable; RPMI = Roswell Park Memorial Institute; TNFRSF = tumor necrosis factor receptor superfamily.