

1 再発または難治性の B 細胞悪性腫瘍を有する成人患者を対象とした CAR-T 細胞を用いた CD19 および CD22 の二重標的試験:第 I 相試験

- Jay Y.Spiegel
- Shabnum・パテル
- ...
- デビッド・B・マイクロシュ

著者を示す

Nature Medicine,vol.27,p.1419-1431(2021)この記事を引用する

- 27k アクセス
- 23 引用文献
- 430 altmetric 試験
- [Metricsdetails](#)

2 抄録

目覚ましい進歩にもかかわらず、CAR19 を標的としたキメラ抗原受容体 T 細胞(CAR19)による治療を受けた患者の 50% 以上で進行がみられた。CAR19 治療後に進行がみられた大細胞型 B 細胞リンパ腫(LBCL)患者 16 人中 10 人では、CAR19 は認められなかったか、低値であった。治療前の低表面 CD19 濃度は進行と関連していた。CD19-または CD19^{lo} による再発を予防するために、再発/治療抵抗性 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (B-ALL) および LBCL の成人患者を対象とした第 I 相試験(NCT03233854) において、CD19 および/または CD22 を標的とする二重特異性 CAR(CD19-

22.BB.z-CAR)について検討した。主要エンドポイントは製造の実行可能性と安全であり、副次的エンドポイントは有効であった。主要エンドポイントは達成された。97%の製品が治験実施計画書に規定された用量に適合し、用量漸増中に用量を制限する毒性は発生しなかった。B-ALL(n=17)では100%の患者が反応し、88%の微小残存病変陰性の完全奏効(CR)が得られた。LBCL(n=21)では62%の患者が反応し、29%のCRが得られた。再発はB-ALL患者の50%(10人中5人)およびLBCL患者の29%(14人中4人)で認められたが、CD22-/loとの関連は認められなかった。CD19/22-CAR製剤では、CD19で刺激した場合にCD19-/loが減少した。CD19/22-CAR製剤では、CD19で刺激した場合にCD19-/loが減少した。CD19/22-CAR製剤

3 主症状

CAR19を標的とするキメラ抗原受容体修飾T細胞12345678910およびナチュラルキラー(NK)細胞11の目覚ましい抗腫瘍効果により、再発または治療抵抗性(再発/治療抵抗性)のB細胞悪性腫瘍の治療におけるパラダイム・シフトが推進されてきたが、CAR19による治療を受けたpreCARの大半で病勢の進行がみられ、CAR19による治療への反応と関連付けられた臨床要因として、患者数や乳酸脱水素酵素(血清乳酸脱水素酵素)5,8がある。B-ALL¹²におけるCAR19治療後の再発例の30-95%において、スプライス変異や細胞内残存CD19¹²13141516などの様々な機序を介した進行が報告されている。また、効果的なCAR T細胞応答には高い標的抗原発現密度¹⁷18192021が必要であることがいくつかの報告で示されている;単一特異性CD22-CAR²²およびB細胞成熟抗原CARs²³による治療後には、抗原濃度の低下に関連する耐性が示されている。LBCL²¹では様々なレベルで発現しているが、CAR19耐性におけるCD19-/lo LBCLの発現については、まだ十分に研究されていない²⁴25.新たに定義された耐性機序を克服するための次世代治療薬の開発は、重要な未達成の目標である。

CD22はシアル酸に結合する接着分子で、主にB細胞系列に限定されており、ほとんどのB細胞系列悪性腫瘍で発現している²⁶27282930。CD19に対する治療を行った後に進行したLBCLで強化されたB-ALLの小児および若年成人患者を対象とした研究では、CD22 CAR T細胞により73%のCR率が誘導され、CD19+およびCD19-B-ALL²²31で同等の有効性が示されたが、再発にはCD22^{lo} B-ALLの出現との関連が認められ、B-ALLに

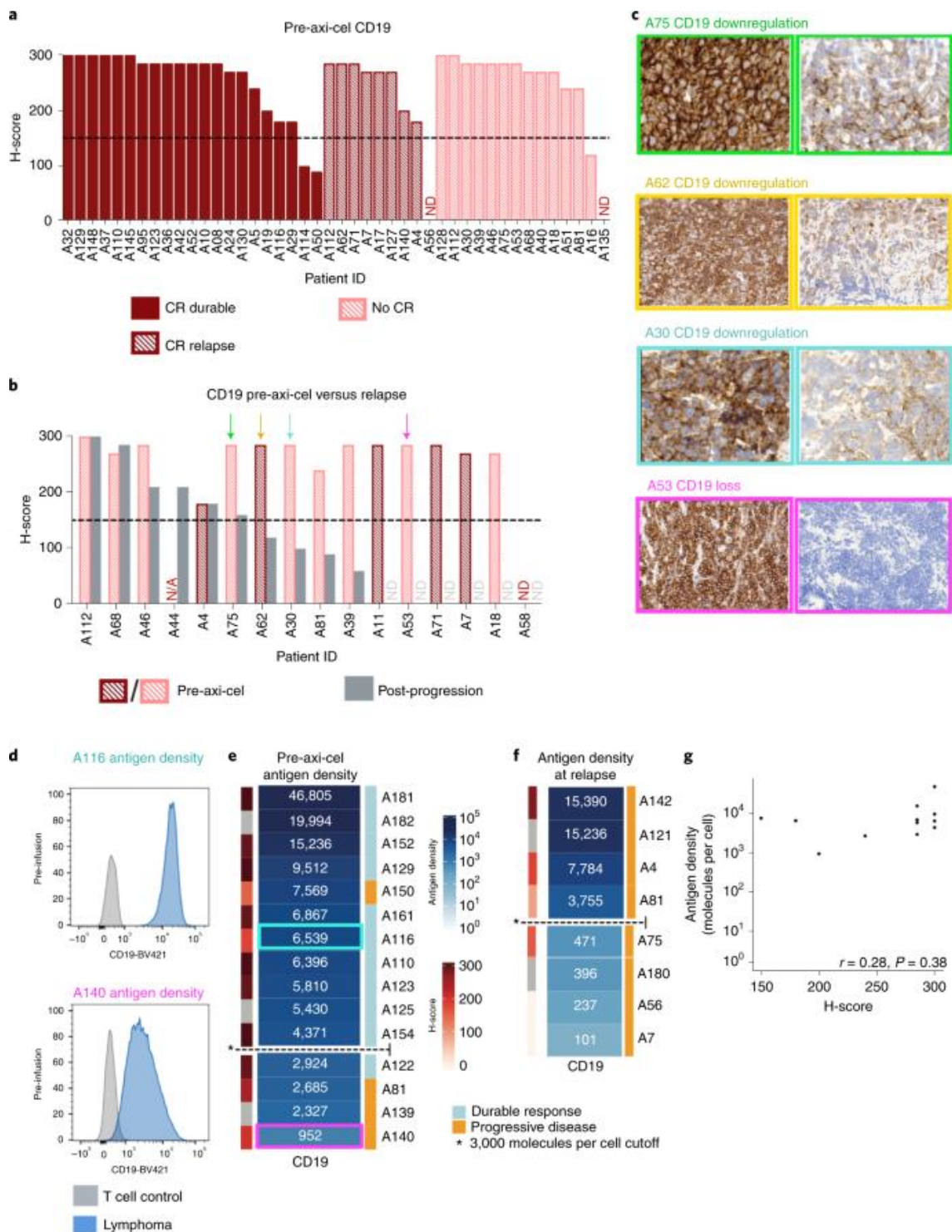
における sequential targeting の限界が示された。再発/難治患者および B-ALL の成人患者を対象とした第 I 相試験では、CD19 および/または CD22(CD19-22.BB.z)22 を標的とする二重特異性 CAR T について検討し、閉鎖系での製造の実現可能性、二重特異性 CAR T 細胞の安全、B-ALL と LBCL の両方における臨床活性が実証された。CD19-/lo の再発が観察され、CD22 の発現が維持されたのは、CD19 に対して CD22 に対する二重特異性受容体の力価が低下したためと考えられる。

4 結果

5 Axicabtagene ciloleucel 耐性は CD19-および CD19lo LBCL と関連

LBCL における CAR19 治療への抵抗性が CD19-/lo の再発と関連しているかどうかを評価するために、当施設では半定量的免疫組織化学(IHC)H スコアを用いて、ベースライン時と Axicabtagene ciloleucel(axi-cel)による治療を受けた患者の病勢進行時の CD19 発現を測定した。追跡期間中央値 21 カ月(95%信頼区間[CI]11-24)で、無増悪生存期間中央値(PFS)は 6.1 カ月(95%CI 3.1-推定不能)であった。23 例(52%)で進行が認められた。23 例中 16 例(52%)で進行後の生検が実施された。axi-cel 以前の CD19 H スコア中央値は 285(四分位範囲[IQR]範囲[IQR]=240-285)であった(図 1a および補足図 1)。H スコアのカットオフ値 150 を用いて CD19 陽性と判定した場合、39 例(89%)が治療前の CD19 陽性であったのに対し、研究対象とされた 16 例中 6 例(37.5%)のみが進行時の CD19 陽性であった。治療前と治療後の H スコアを対にした患者では、15 例中 9 例(60%)が治療前の CD19 陽性から再発時の CD19 陽性に転換した(McNemar test $P=0.003$)(図 1b)。さらに、治療後の生検で CD19 の完全な消失が示された例もあった一方で、CD19 発現の減少が示された例もあった(t 検定 $P=0.32$)。これらのデータからも、治療前の H スコアを連続変数として扱ったところ、長期間の病勢コントロールがみられた患者と進行がみられた患者との間に差は認められなかったことが実証された。LBCL に対する axi-cel 治療後の進行は高い割合で CD19-/lo の発現と関連することが示されたが、治療前の CD19 発現の半定量的 IHC 測定では再発リスクのある患者は同定されなかった。

図 1:IHC は CD19-/lo 病 postaxi 細胞を証明し、定量的フローサイトメトリーによる LBCL preaxi 細胞療法は病気の進行と関連している。



a: Preaxi-cel H スコアでは長期反応例と postaxi-cel 進行例を区別できなかった(t 検定で $P=0.32, P=1$ Fisher の正確な検定)。Waterfall plot of CD19 IHC H スコア preaxi-cel 療法 ($n=44$)。H スコアは陽性 Preaxi の割合 ($0-100$) \times 染色強度 ($1-3$)で算出された。破線は H スコア 150 を示し、陽性率の定義に用いられた。ND: 検出不能 b: preaxi-cel と進行時の H スコアは有意差 (Wilcoxon

符号付順位検定で $P=0.003$)。H スコア 150 をカットオフ値とし、観察された CD19- $^{+}$ 進行率(16 例中 10 例)を用いた場合、95% 二項 CI(Wilson スコア)の推定値は 38-82% であった。N/A, データ点なし c: 進行時(A75: 再発 H スコア=160; A62: 再発 H スコア=120; A30: 再発 H スコア=100; A53: 再発 H スコア=0)d: 進行時(A116)の IHC における CD19 発現量の減少を示した代表的な患者(A140)と進行時(A75: 再発 H スコア=; A62: 再発 H スコア=100; A30: 再発 H スコア=100; A53: 再発 H スコア=)d: 進行時(A 3000)の CD19 発現量の減少を示した代表的な患者(A75: 再発 H スコア=; A62: 再発 H スコア=100)。A30: 再発 H スコア=100; A53: 再発する H スコア=53)e: 15 例の患者で最高(暗青色)から最低(白色)まで整理した定量的フローサイトメトリーによる CD19 部位の密度の中央値 f: axi-cel 後に進行する可能性が高かった(ファーストロジスティック回帰で $P=0.03$)。fit モデルに基づく、1 細胞当たり 3000 分子/細胞が CD19 陽性のカットオフ値とされた。f: axi-cel 進行時($n=8$)の CD19 発現量の中央値 f: axi-cel 後の CD19 部位の密度の中央値 f: axi-cel 後の CD19 0.28 0.38 preaxi Preaxi

原データ

フルサイズの画像

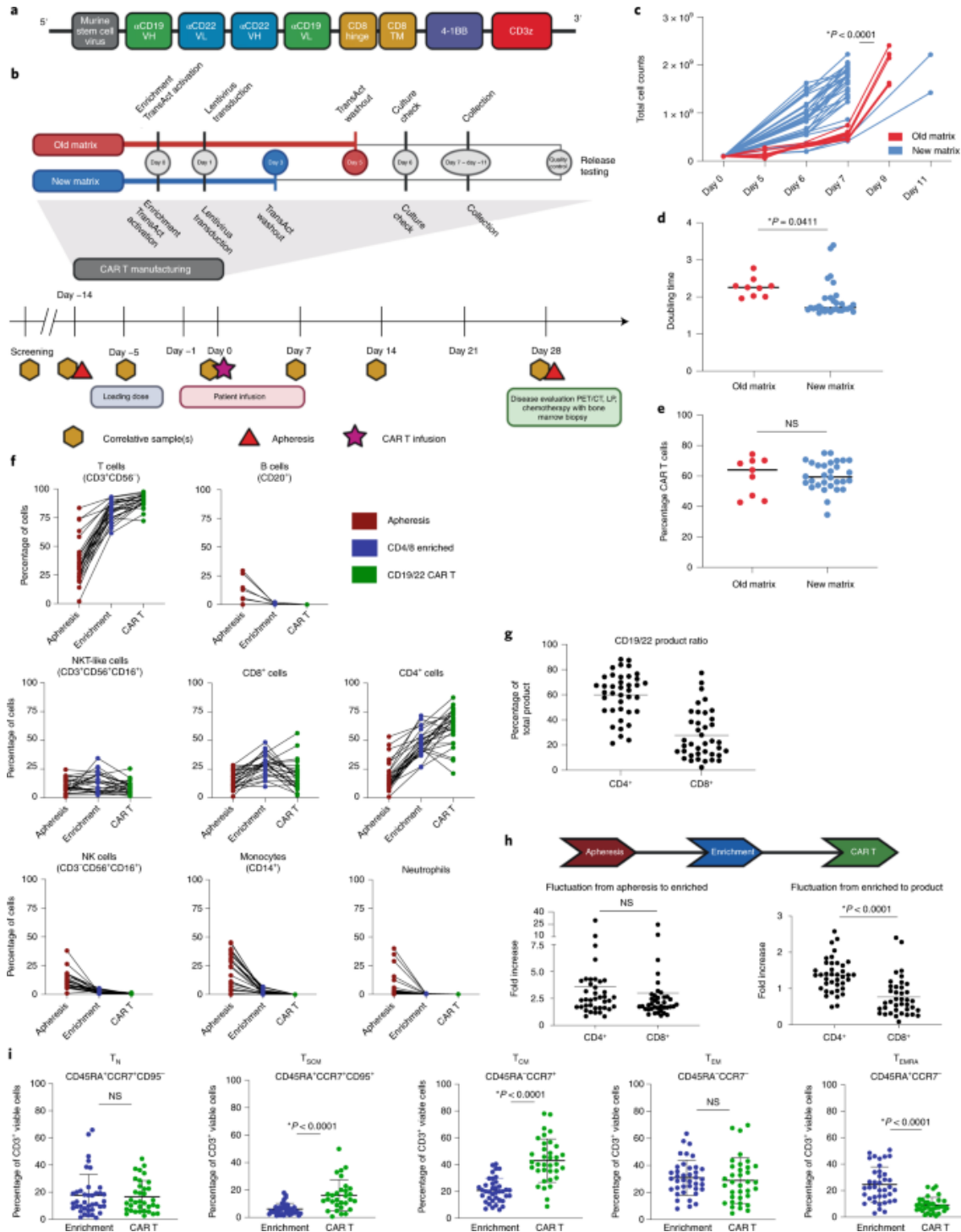
表面密度の定量的評価により axi-cel 後の転帰を予測できるかを評価するとともに、再発に関連する発現の閾値レベルを明らかにする試みを行うために、定量的フローサイトメトリーを用いて細針吸引により得られた生細胞浮遊液の CD19 部位密度を測定した。Preaxi-cel LBCL では、IHC H-スコアで陽性と判定された 2 名の代表的な患者からの LBCLs を示した図 1d に示すように、CD19 部位密度の中央値に相当する患者間内および患者間の変動が認められた。preaxi A116 では IHC H-スコアで陽性と判定された 2 名の患者からの DNA が検出されたのに対し、A140 では IHC H-スコアで陽性と判定された 2 名の患者からの DNA が検出されたことから、IHC H-スコアで陽性と判定された 3 カ月後の CD19 部位密度の中央値は 1 細胞当たり 6396 分子(IQR=3647-8540)であり、その範囲は 1 細胞当たり 952-46~805 分子であった(図 1e)。ペナルティ化ロジスティック回帰モデルを用いた解析では、治療前の CD19 部位密度の中央値が低い患者では axi-cel 後の進行リスクが有意に高く($P=0.03$)、細胞当たり CD19 分子数が 2934 分子の患者では進行リスクが 50% であったのに対し、今回のコホートでは axi-cel 後の進行リスクが有意に高かった($P=0.03$)。LBCL 1 細胞当たり CD19 分子数が 3000 分子を超える患者では 50% であったのに対し、今回のコホートでは 3000 分子/細胞を陽性と判定するカットオフ値を設定した(Extended Data Fig

1)。著者らのコホートでは、1細胞当たり CD19 分子数が 3000 分子以下の LBCL 患者 4 名中 3 名で進行が認められたのに対し、axi-cel 後の進行リスクは 1細胞当たり 3000 分子以下であった(Spearman $r=0.28$, $P=0.38$; Fig 1g and Extended Data Fig 2)。H-スコアは CAR19 治療に対する抵抗性の主要な原因として CD19^{lo} LBCL が出現したことを裏付けており、治療前に細胞当たり CD19 分子数が 3000 分子以下の LBCLs では再発リスクが高くなることが示唆されており、IHC ではなく定量的フローサイトメトリーにより 6538 952 LBCL

6 CAR の構成と臨床試験デザイン

CAR19 欠損は B-ALL における CAR19 不全の重要な機序であることが以前のデータで実証されており、本研究で提示されたデータも同様に、LBCL における CAR19 後の耐性機序として細胞表面の α CD19 の欠如または減少を示唆しており、B-ALL および LBCL における二重抗原抗体標的化の根拠となっている。以前 2232 年に報告されたように、抗 CD19 マウス FMC63 一本鎖可変断片(scFv)と完全ヒト抗 CD22 m971 scFv(CD19 vH- α CD22 vL-リンカー- α CD22 vH- α CD19 vL)をコードする単一シストロンと、それに続いてヒト CD8 ヒンジおよびトランスメンブランドメイン、4-1BB 共刺激ドメイン、および CD3 ζ 活性化ドメインから構成される CD19-22.BB.z-CAR を作製した。再発・難治 B-ALL および LBCL 患者を対象として、CD19-22.BB.z-CAR の第 I 相試験を実施し、主要評価項目として CD19-22.BB.z-CAR の製造可能性と安全を評価した。適格患者は、2 ライン以上の治療後に再発または抵抗性があり、CD19 を発現していることが確認された 3+3 用量漸増相を用いて、CAR19-22.BB.z-CAR の 2 用量(1×10^6 CAR+細胞 kg^{-1} (DL1) と 3×10^6 CAR+細胞 kg^{-1} (DL2))を投与された。最大耐用量は特定されなかったが、DL2 で認められた効果と他の臨床試験で認められた 3×10^6 細胞 kg^{-1} を超える細胞数で毒性が懸念されることから、DL2 では 1×10^7 細胞 kg^{-1} の第 3 用量(CAR T 細胞)を投与されなかった。したがって、2 つの疾患特異的拡大コホートには、第 2 相試験の推奨用量である 3×10^6 CAR T 細胞 kg^{-1} (DL2)が投与された。LBCL

図 2:製造工程全体にわたる CAR 製品の特性解析により、組成及び表現型の変化が明らかにされている。



a, CD19-22-CD8.BB.z-CAR は、CD19 FMC63 および CD22 M971 scFv, CD8 α ヒンジおよび膜貫通ドメイン、4-1BB 共刺激ドメインおよび CD3 ζ ドメインを含んでいた。ユニークな二重特異性構造は、近位側に FMC63 H 鎖、遠位側に M971 L 鎖、M971 H 鎖および FMC63 L 鎖を示した。b, CAR T 製造および臨床試験の模式図。製造の模式図は、古いマトリックスから新

しいマトリックスへの TransACT プロセスの変化を示している。臨床試験の模式図は、スクリーニング、リンパ球除去、CAR T 細胞輸注および疾患評価の時点を示している。LP, 腰椎穿刺。c, 古いマトリックスと比較した新しいマトリックスの製造工程による培養拡大の改善($P < 0.0001$, 両側 t 検定)。d, 古いマトリックスと比較した新しいマトリックスによる倍加時間の有意な短縮($P = 0.0411$, 両側 t 検定)。e, 古いマトリックスと新しいマトリックスとの間で形質導入効率に有意差なし($P =$ 有意差なし(NS), 両側 t 検定)。全体の平均形質導入効率は 60.1% ($n = 39$ 個)であった。f, アフェレーシスの組成の経時的変化、T 細胞($CD3+CD56-$)、B 細胞又は白血病細胞($CD20+$)、 $CD4+$ 、 $CD8+$ 、NKT 様細胞($CD3+CD56+CD16+$)、NK、単球及び好中球のサブセットを観察したとき、 $CD4+$ 細胞、 $CD4+$ 細胞、 $CD8+$ 細胞、NKT 様細胞($CD3+CD56+CD16+$)、NK、単球及び好中球のサブセットを観察したとき、 $CD4+$ 細胞への偏り($P < 0.0001$, 両側 t 検定)。h, アフェレーシスから添加後の最終製品までの細胞数の増加倍率を比較すると、添加と最終製品間で培養中に $CD4+$ 細胞への偏り($P < 0.0001$, 両側 t 検定)が認められた。i, T 細胞メモリーサブセットの表現型解析により、TSCM($P < 0.0001$, 両側 t 検定)及び TCM($P < 0.0001$, 両側 t 検定)細胞サブセットの増加並びに TEMRA($P <$, 両側 t 検定)細胞サブセットの減少が認められた。 $CD19-22.BB.z$ 添加後の TN 及び TEM 細胞サブセットの有意な変化は認められなかった。

[原データ](#)

フルサイズの画像

7 患者の特徴

39 名の患者が 2 つのコホート(B-ALL, $n = 17$, LBCL, $n = 22$)に登録された。38 名に $CD19-22.BB.z-CAR$ の投与が行われた一方で、LBCL を有する 1 名の患者がリンパ除去中に病気の進行と敗血症のため死亡した(Extended Data Fig 3)。LBCL を有する 1 名の注入を受けたコホートの年齢中央値は 69 歳(範囲 25-78 歳)であった(表 1)。うち 15 名は double expressor($c-MYC$ および $BCL2$ の発現)LBCL 人であり、3 名は $c-MYC$ と $BCL2$ および/または $BCL6$ の転座を伴う高悪性度の B 細胞リンパ腫(double-hit)であり、4 名は自家造血幹細胞移植の既往があった。LBCL 患者は全員 CAR-naive であった。B-ALL のコホートでは、年齢中央値は 47 歳(範囲 26-68 歳)であった。71% 同種造血細胞移植(HCT)後に進行し、65% が $CD 19$ に対する治療歴(以前に CAR T を受けた 1 名を含む)、29% が $CD 22$ に対する治療歴を

有していた(表 2)。登録時点で 63%に中枢神経系(CNS)病変の既往があり、12%が活動性 CNS 病変を有していた。

表 1 登録された LBCL 患者の患者背景、反応及び転帰

[フルサイズのテーブル](#)

表 2 登録された B-ALL 患者の患者背景、反応及び転帰

[フルサイズのテーブル](#)

8 閉鎖系製造の実現可能性

この臨床試験の主要な目的は、CliniMACS Prodigy(Miltenyi Biotec)(治験実施計画書に規定された細胞用量を満たす細胞製剤の 80%以上と定義)における閉鎖系製造を用いた細胞生産の実現可能性を評価することであった。製造工程の概略を図 2b 及び拡張データ図 4a に示す。当初、7-9 d 製造工程(旧マトリックス)では、5 日目に T 細胞アクチベーター(TransACT)の洗い出しを利用していた。DL1 では、57%(7 製品中 4 製品)が 7 日以内に規定の細胞用量を満たし、43%(7 製品中 3 製品)が 9 日以内に規定の細胞用量を満たした。用量を増加させながら製造時間を短縮するために、3 日目に TransACT を除去する工程変更(新マトリックス)を導入し、用量達成に必要な培養時間を大幅に短縮した。これは、7 日目までの総細胞数の増加($P < 0.0001$; 図 2c)と製品倍加時間の短縮($P = 0.04$; 図 2d)に反映されている。アフエレーシスを受けた 39 人の患者のうち、事前に定められた出荷基準を満たす CAR T 製品が 100%の割合で製造された。97%の製品が治験実施計画書に規定された用量を満たした。82%(39 製品中 32 製品)が治験実施計画書に規定された用量を満たした(4 旧マトリックス、28 新マトリックス)(拡張データ図 4b-d)。平均形質導入効率 $は 60.1%$ (範囲 34~6-75.2%; 図 2e)であり、平均ベクターコピー数は 2.23(範囲 1~31-4.0; 拡張データ図 4e)であった。

9 CD19-22.BB.z-CAR T 点滴静注用製剤の特性解析

アフエレーシス、postCD4/CD8 陽性 T 細胞の増菌、最終的な CAR T 産物の採取から検体を採取し、細胞サブセット解析を行い、T 細胞集団の増菌と白血病細胞の除去を確認した。アフエレーシス製品と比較すると、製造され

た製品では T 細胞数と CD4 陽性細胞数が増加し、CD8 陽性細胞とナチュラルキラーT(NKT)様のサブセットに変化はみられず、B 細胞や白血病細胞 (CD20 陽性と定義)、NK 細胞、単球、好中球が減少していた(図 2f)。

CD19-22.BB.z 製剤は CD4+優位を示した(図 2g)。これが T 細胞増菌 postapheresis によるものか製造工程によるものかを明らかにするために、製造工程における CD4+および CD8+細胞数の増加を評価した(図 2h)。アフエレーシスから増菌までの増加に差はみられなかったが、増菌から最終製品までの CD4+および CD8+T 細胞サブセットの増加には有意な差が認められ($P<0.0001$)、製造工程が製品中の CD4+細胞の割合を増加させていることが示唆された。強化アフエレーシス検体と比較したところ、製品では幹細胞メモリーT(TSCM)($P<0.0001$)および中央メモリーT(TCM)($P<0.0001$)細胞サブセットが増加しており、ナイーブ T(TN)およびエフェクターメモリー T(TEM)細胞集団に変化はなく、終末分化エフェクターメモリー(TEMRA)細胞サブセットが減少していた($P<0.0001$;図 2i)。

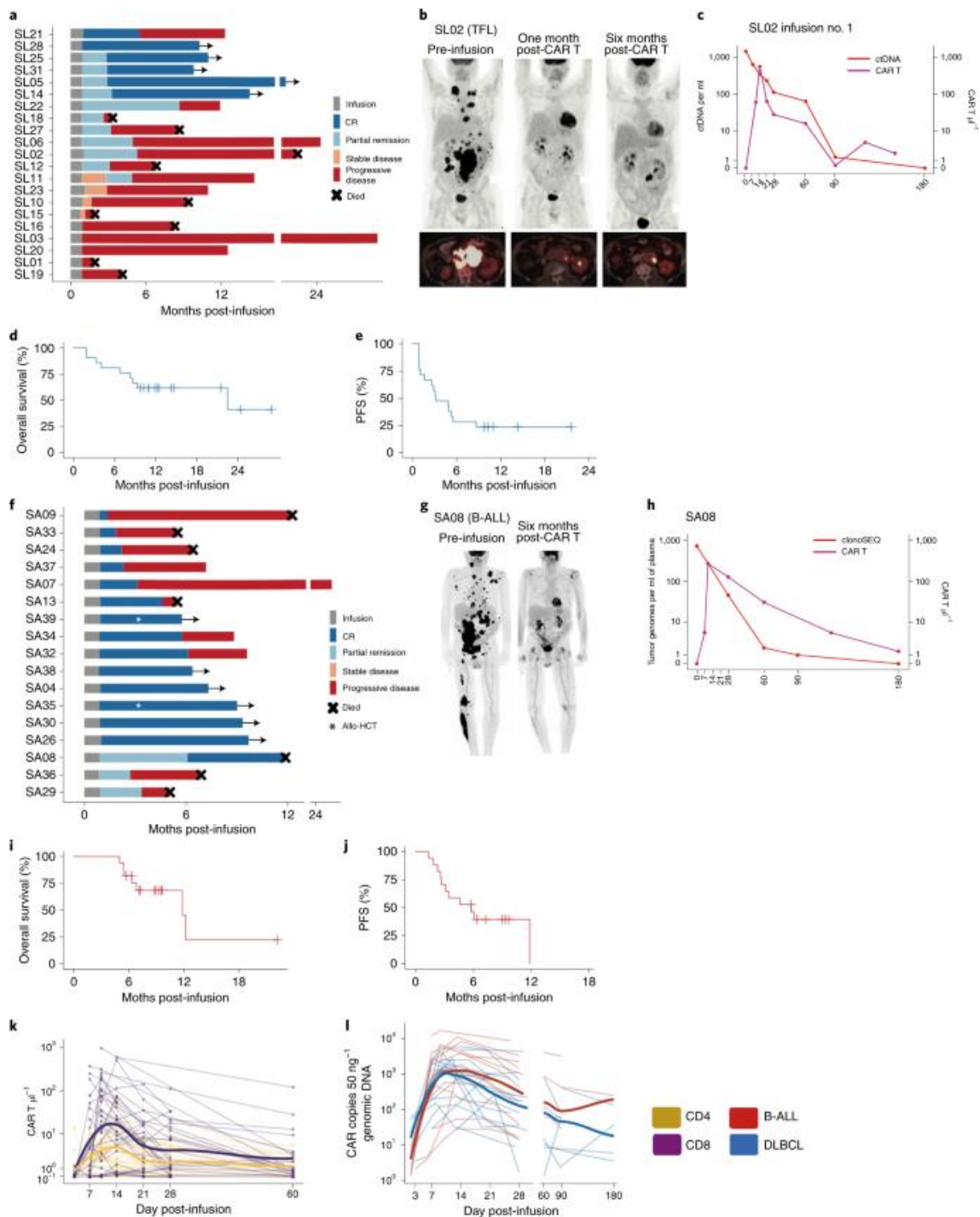
10 毒性

用量漸増期間中に用量制限毒性(DLT)は認められず、試験期間中に合計 1 件の DLT が認められた。グレードを問わないサイトカイン放出症候群 (CRS)は 29 例(76%)に発現し、中央値は注入 1 日後(範囲 0-8)に発現し、中央値は 4 日後(範囲 1-12)に持続した(表 1 および表 2 ならびに拡大データ 図 5)。グレード 3 以上の CRS は 2 例(5%)に認められた。神経毒性は 14 例 (37%;LBCL 9 例および B-ALL 5 例)に発現し、4 例にグレード 3 以上の神経毒性が認められた。神経毒性の発現は注入 5 日後(範囲 3-9)にみられ、中央値は 4 日後(範囲 1-11)に持続した。CRS と神経毒性はいずれも施設のガイドラインに従って治療され、15 例(39%)にトシリズマブが 1 回以上投与され(範囲 1-3)、45%にコルチコステロイドが投与された。CRS と神経毒性はいずれも消失した。2 例に高フェリチン血症とフィブリノゲン減少症を伴うマクロファージ活性化症候群の臨床検査所見が認められ、同時にグレード 3 以上の神経毒性も認められたため、高用量コルチコステロイドとアナキンラ 31 の投与を受けた。

11 反応

LBCL では、第 II 相試験の推奨用量で治療された患者(n=15)における 3 カ月後の全奏効率(ORR)と CR 率は、それぞれ 40%(95%CI 16-68%)と 33%(95%CI 12-62%)、LBCL 患者コホート全体(n=21)における 3 カ月後の最良 ORR は 62%(95%CI 38-82%)、CR 率は 29%(95%CI 11-52%)であった。奏効例 13 例のうち 5 例では、点滴後 1 カ月から 3 カ月までの間に反応の改善が認められた(図 3a-c)。追跡期間中央値 10 カ月(95%CI 8.5-7-21.5)では、全生存期間中央値は 22.5 カ月(95%CI 8.3-推定不能;図 3d)であり、より長期の追跡により変化する可能性がある。PFS 中央値は 3.2 カ月(95%CI 1.2-5.5;図 3e)。LBCL 人で CD19-22.BB.z による治療を受けた患者における奏効の動態を解明するため、診断用腫瘍検体が入手可能な患者 16 例を対象として、nadired 量の経時的変化を細胞フリーの循環腫瘍 DNA(ctDNA)により評価した(Extended Data 図 6)33。臨床効果が持続していた患者 4 例では最終評価時に ctDNA が検出されなかった。進行がみられた患者 12 例のうち、点滴後 14-21 日目に ctDNA の初期減少が観察され、9 例では臨床進行時またはそれ以前に ctDNA の上昇が認められた。これらの知見から、LBCL における CD19-22.BB.z-CAR 後の病勢進行は、早期の強い反応に続いて早期獲得耐性と関連することが示唆される。LBCL

図 3:CD19-22.BB.z-CAR は LBCL と B-ALL の両方で活性を示す。



a:リンパ腫患者(n=21)における寛解持続期間と進行中の反応を示した Swimmer プロット。5 例では投与後 1~3 カ月で反応の深さが増した。b:患者 S2 の PET スキャンでは投与後 1 カ月で部分寛解がみられ、投与後 6 カ月でその後の進行がみられた。c:ctDNA を用いたリンパ腫病変のモニタリング。患者 SL02 に CD19-22.BB.z を注入した患者 21 例の全生存期間。e:リンパ腫患者コホートの PFS。f:B-ALL 患者コホートの Swimmer プロット

(n=17)。2例に同種幹細胞による地固め療法(白星)g:LBCLを注入した患者21例の全生存期間。e:リンパ腫患者コホートのPFS。h:細胞ベースのNGSを用いた患者SA8の疾患モニタリング(感度 10^{-6})では、PETでの反応の改善とCD19-22.BB.z.i:B-ALL患者17例の全生存期間。j:B-ALL患者コホートのPFS。k:フローサイトメトリーにより測定した注入後の循環CD4およびCD8 CD19-22.BB.z CAR T細胞の絶対数(n=38)。l:qPCRにより測定したゲノムDNA 50 ng当たりの循環CD19-22.BB.zコピー数(n=33)。注入から1および2カ月後(35-75日後)、3カ月後(76-120日後)および6カ月後(120-200日後)に測定したCD19-22.BB.zの初期増殖および持続を示した。BBZ
[原データ](#)

フルサイズの画像

B-ALLの一次反応は注入から28日後に評価された。B-ALL患者(n=17)全員が反応を達成した。14人がCR(82%)、3人が部分寛解(図3f)を得た。1人の患者の反応(SA8)は注入から6カ月後にCRに改善し(図3g,h)、全体のCR率は88%となった。その全員が骨髄感度 10^{-4} で微小残存病変(MRD)陰性(拡大データ図7)であり、髄外病変の患者ではPET/CTで陰性と判定された。中央値で9.3カ月(95%CI 7.2 NE)の追跡後、全生存期間中央値は11.8カ月(95%CI 5.5 NE)(図3i)、PFS期間中央値は5.8カ月(95%CI 2.6 NE)(図3j)であった。2人の患者がCR中に同種造血幹細胞移植に進み、現在も寛解中である。骨髄由来の免疫グロブリン受容体の次世代シーケンシング(NGS)によるMRDの連続分析では、CRが持続していた患者の100%(5/5)でMRD陰性の反応が持続した一方、進行していた患者の70%(10/7)で形態学的再発前または再発時にMRDが持続または増加したことが明らかにされた(拡大データ図7)。

12 CD19-22.BB.z CAR T細胞の in vivo での定量

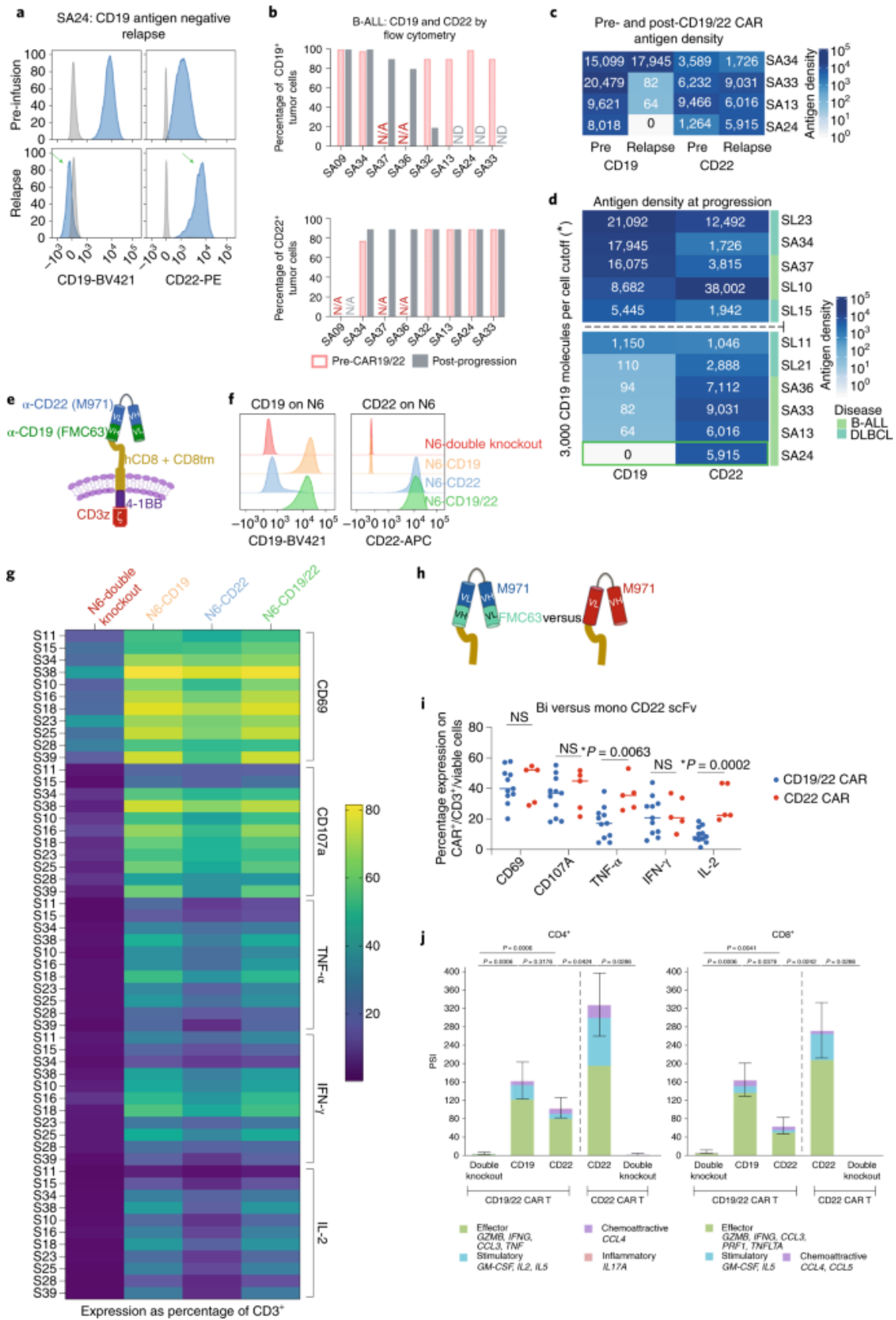
CD19-22.BB.z-CAR細胞はフローサイトメトリーと定量PCR(qPCR)の両方で血中に検出され、注入後10-14日の間にピークがみられた(図3k,l)。フローサイトメトリーで測定した循環血中のCD19-22.BB.z細胞のピーク数の中央値は36 CAR μ l⁻¹(IQR=13-136)であった;qPCRで測定したCD19-22.BB.z導入遺伝子のコピー数は50 ng当たり1794(IQR=509-4,315)であった。ピーク拡大はLBCLとB-ALL間または用量レベル間で有意な差はなかった(拡大データ図8a,b)。曲線下面積(AUC)で測定したより高い拡大は、CRSおよび神経毒性の増加と関連していた(拡大データ図8c,d)。製造されたCD19-

22.BB.z-CAR 製品では CD4+細胞が優勢であったにもかかわらず、CD8 CD19-22.BB.z 細胞は CD4 と比較してより大きな拡大を示し、AUC とピークレベルの両方で測定し(拡大データ図 8e,f)、ほとんどの患者でピーク CD4:CD8 比<1 であった(拡大データ図 8g)。製品中の CAR+細胞上の消耗マーカーを分析したところ、CD4+細胞は CD39(参考文献 34)およびプログラム細胞死タンパク質 1(PD-1)の発現レベルが高かったことが示され(拡大データ図 8h,i)、これは CD8+CAR T 細胞と比較して CD4+細胞の in vivo で拡大が減少した根拠となる可能性がある。

13 CD19-22.BB.z-CAR 後の進行性疾患の患者における抗原発現

次に、CD19-22.BB.z-CAR 後の進行時点での CD19 および CD22 の発現量をフローサイトメトリー法(LBCL SA24[図 4a])により定量したところ、90%の閾値を用いて、進行した B-ALL 患者 10 例中 5 例で CD19 の発現量が陰性または低値であり、CD22 は保持されていたことが示された(図 4b および表 2)。B-ALL 患者 4 例を対象とした治療前後のペア検体での抗原検査では、IHC において 3 例で CD19 の発現量低下が確認された(図 4c)。進行時に生検を受けた患者 14 例では、IHC において 3 例が CD19-/lo であった(拡大データ図 9a)。試験への登録に CD22 の発現は必要とされず、治療前の CD22 の発現は不均一であった(拡大データ図 9b)。治療前の CD22-/lo LBCL は 3 例で、2 例は未確定であった。治療前の CD22 H スコアが 150 を超えていた 6 例全例が CD22 陽性を維持していた。B-ALL または LBCL 患者 11 例では進行時に定量的フローサイトメトリーが行われた。6 例は細胞当たり CD19 が 3000 以下の低値であり(図 4d)、このうち 1 例は CD19 H スコアが 150 を超えていた LBCL 患者であった。全体では、CD19-22.BB.z-CAR 治療後の進行時点で、LBCL 患者 14 例中 4 例(29%)が CD19-/lo であった(拡大データ図 9a および表 2)。6000

図 4:CD19-22.BB.z-CAR 後の CD22 部位密度が維持され、CD22 に対する CAR T 機能が低下した CD19 陰性の再発。



a,CD19とCD22の両方の発現を示す preCD S24の抗原濃度 CD19-22.BB.z(上)とCD19の消失および進行時のCD22の保持(下、緑矢印)。
b,B-ALL治療前および進行後の患者における従来のフローサイトメトリーによるCD19およびCD22の評価では、CD22の保持とともにCD19の消失が示された。c,B-ALLにおいて、治療前および postCD19-22-CD.BB.zでの抗原定量を行った4人の患者のうち3人で、CD22の発現の保持と関連したCD19の消失が示された。d,CD19-22.BB.z後の進行時(11人)のCD19およびCD22の抗原濃度 CD19およびCD22の中央値は1細胞当たり約6000分子であり、6人の患者では細胞当たり1150分子未満であった。破線は1細胞当たり3000分子でのカットオフを示す。e,CD19-22.BB.zの二重特異性CARの模式図(ループ構造を示す)。f,NALM6腫瘍株で刺激したCD19-22.BB.zからのCD69,CD107a,TNF- α 、IFN- γ およびIL-2の分泌または発現を示すICSヒートマップ(N6-CD19-22.BB.z/22株による刺激とN6-CD22.BB.z/22株による刺激でより強い活性化およびサイトカイン分泌が示された。h,CD19-22.BB.z対単一特異性CD22.BB.z.i,CD19-22.BB.z対単一特異性CD22.BB.z(n=11)対単一特異性CD22.BB.z(n=5)のCAR産物のICS刺激とN6-CD22.BB.z(n=11)対単一特異性CD22.BB.z(n=5)のCAR産物のICS刺激とN6-CD22.BB.z(n=11)対単一特異性CD22.BB.z(n=5)のCAR産物のICS刺激では、単一特異性CAR22.BB.zを介したIL-2およびTNF- α のサイトカイン分泌の増加が示された(両側t検定)。j,単一細胞IsoPlexisプラットフォームを用いたN6-CD19による臨床製品(n=7個の個別製品)の刺激では、N6-CD22と比較してPSIが高かった。N6-CD22で刺激

[原データ](#)

フルサイズ画像

14 CD19-22.BB.z-CAR Tは、CD22 scFvを介して刺激された場合、分泌するサイトカインの量が少なくなる

CD22を温存したCD19-*lo*の再発パターンから、CD19-22.BB.z-CARを発現するT細胞はCD19に対して有意な免疫圧を及ぼすがCD22に対しては作用しないことが示唆された。in vitroモデルでは、CD19-22.BB.z-CARがCD19/CD22+細胞株に対して活性であることが実証された(Extended Data Fig 10a)。これに対処するため、我々は、単一細胞アッセイを用いて、CD19-22.BB.z-CAR内でCD19 scFvを介して伝達されるシグナルとCD22 scFvを介して伝達されるシグナルの相対的な力価をCD19-22.BB.z-CARを介して伝達されるシグナルとCD22 scFvを介して伝達されるシグナルの相

対的な力価を比較した(Fig.4e)。製造された細胞製品 11 個から採取した検体を用いて、CD19-22.BB.z-CAR T細胞を、二重陽性の NALM6(N6-CD19,1細胞当たり約 20000 CD19 分子、1細胞当たり約 50000 CD22 分子)、CD22 が CRISPR-Cas9 を介してノックアウトされた NALM6(N6-CD19,1細胞当たり約 20000 CD19 分子、1細胞当たり 0 CD22 分子)、CD19 が CRISPR-Cas9 を介してノックアウトされた NALM6(N6-CD22,1細胞当たり約 40000 CD22 分子、1細胞当たり 0 CD19 分子)、または CD19 と CD22 の両方が遺伝的に欠失した NALM6(N6-double knockout)と共 212835

ICS を用いると、CD19-22.BB.z-CAR で製造された製品は、N6-CD19 との共培養後に CD69 の発現量を測定すると活性化しているように見えたが、N6-CD22 では活性が低く($P<0.0001$),CD107($P<0.0001$),腫瘍壊死因子 α (TNF α)($P<0.0001$),インターロイキン 2(IL-2)($P<0.0001$),インターフェロン γ (IFN- γ)($P<0.0001$)では、N6-CD22 よりも N6-CD19 の方が高い発現が認められた(図 4g)。

CD19 による刺激とは対照的に、CD22 による PSI および ICS の低下は、CD22 scFv の力価の低下を示唆した。次に、CD19-22.BB.z-CAR の CD22 scFv の活性を単一特異的な CD22.BB.z-CAR(図 4h)223136 で同一の scFv と比較した。N6-double knockout および N6-CD22 に対する進行中の臨床試験(NCT04088890)に登録された再発/難治性 LBCL または B-ALL 患者から採取した GMP(Good Manufacturing Practice)により製造された CD22.BB.z-CAR T細胞(n=5)の活性を比較したところ、T細胞上の単一特異的 CAR の平均蛍光強度は 2 特異的 CAR のそれよりも高かった(Extended Data Fig 10b,c)。CD19-22.BB.z-CAR T細胞と CD22.BB.z-CAR T細胞は CD69 の発現ならびに IFN- γ および CD107 の分泌により測定した同程度の活性化レベルを示したが(Fig.4i)、CD22.BB.z-CAR T細胞は N6-CD19/22,N6-double ここで検討された集団において CD22 の発現が維持されている疾患 0.0063 0.0002 0.04 IsoPlexis

15 討論

可変 scFv と共刺激ドメイン 56715163738 を組み込んだ多数の研究を通じて、B-ALL における CAR19 後の CD19 欠損が頻繁に同定されている。LBCL では、CAR 1935394041 後の CD19 欠損も症例報告で報告されているが、LBCL における CAR19 後の CD19 発現に関する系統的な解析は実

施されていない。今回の研究では、当施設で axi-cel による治療を受けた LBCL 患者 44 例の CD19 発現を評価したところ、治療前の定量的フローサイトメトリーの方が従来の IHC よりも、将来の進行に関連する低レベルの抗原を同定する上で感度が高いことが明らかにされた。定量的フローサイトメトリーは、CAR 治療に対する抵抗性の機序としての抗原調節を特徴づける予測バイオマーカーとして役立つ可能性がある。

CD19 および CD20 を標的とするタンデム CAR T 細胞を含む初期の臨床試験では、複数の抗原を同時に標的にすることの有効性がいくつかの研究で実証されており(224243444546)、進行時の CD19 消失率が低いという有望な結果が示されている(4748)。この試験で使用された CD19-22.BB.z-CAR は、ループ配向 22 に設計された 2 つの scFv からなる単一分子であり、in vitro および異種移植モデル 32 で活性が実証された。この試験で提示された臨床データでは、B-ALL で 82% が MRD-CR を達成し、LBCL では 62% の ORR で臨床的に活性を示した。毒性は低く、グレード 3 以上の CRS を経験した患者は 5%、神経毒性を経験した患者は 11% であった。CD19-22.BB.z-CAR T 細胞は、B-ALL の両方で臨床的に活性を示し、MRD-CR を達成した患者は 82% であり、ORR は 62% であった。CD19-22.BB.z-CAR T 細胞は、B-ALL でも臨床的に活性を示し、グレード 3 以上の CRS を経験した患者は 5%、神経毒性を経験した患者は 11% であっ

しかしながら、B-ALL の再発時に観察された抗原発現パターンは CD19-22.BB.z-CAR と一致しており、CD19 抗原に対して有意な免疫圧をもたらした一方で、CD22 の発現低下または消失がみられなかったことから、CD22 標的に対する免疫圧がより限定的であることが示唆された。単一特異的な CD22-CAR T 細胞を用いた研究では、CD22lo B-ALL に関連した抵抗性が明確に示されたが、この試験では認められなかった 22.LBCL では、再発時に CD22lo の発現がみられたが、治療前の CD22 の発現は不均一であり、一部の患者では認められなかった。我々のデータによると、二重特異性 CAR における CD22 scFv の結合は、CD19 scFv と比較してサイトカインの分泌量が少ないことが示された。これらの結果から、in vivo での CAR の効力を予測する上でサイトカイン産生が臨床的に意味のある製品品質特性である可能性が示唆され、多特異的キメラ

現時点では、CAR の工学的手法の多くは経験的なものであり、CD19 と CD22 を同時に標的とするための複数のアプローチが現在研究中である

(3249505152)。最適な単一特異的 CAR の工学的手法は、強直性シグナル伝達の予防 53 ヒンジ長の最適化、5455 ヒンジ/膜貫通ドメイン 21 の最適化、標的エピトープと腫瘍細胞膜 275657 との距離の最適化など、多数の因子に依存する。ヒトでの試験では、CD22 を標的とする多数のキメラ抗原受容体が、構造のわずかな変化が活性の喪失 4958 を引き起こす可能性があることが実証されている。タンDEM CAR(連結された scFv)との関連では、最適な工学的手法には最適な二重特異性受容体 5960 の工学的手法も必要であり、これは CD22 標的にとって特に困難となる可能性がある。同じ scFv を有する単一特異的 CAR と比較した場合、CD19-22.BB.z-CAR では TNF- α および IL-2 の分泌が低下していた。CAR T 細胞の IL-2 の分泌閾値は IFN- γ 20 のそれよりも高いことがすでに示されており、CAR の有効性をよりよく識別できる可能性がある。この結果から、工学的な反復は、重要な品質特性としてサイトカイン産生を組み込んだ単一細胞

CAR19 の B-ALL および LBCL61 を対象とした過去の多くの試験で報告されているように、CD19 陽性細胞の再発率も有意に高かったことから、一部の患者では CD19 陽性細胞に対する効力も不十分である可能性が示唆された。CAR の製造方法が改善されれば、T 細胞不全に起因する可能性が高い抗原抵抗性を予防できる可能性がある。CD4:CD8 CAR 細胞の明確な組成と TCM 6263 などの T 細胞サブセットの優先的な投与が最適な CAR 活性 1 を媒介するという仮説が立てられてきた。TCM と TSCM が選択的に濃縮された製造工程では TEMRA が低くても最終生成物が CD4 優位に偏ることが判明した。さらに、この製造工程で製造された CD4 細胞では CD39 と PD-1 の発現量が高くなり、消耗に関連することから、製造工程では最適な最終生成物の組成が得られない可能性が示唆された。これらの知見を受けて、CD4:CD8 比のバランスを高めるために製造工程を修正するべく試験登録を一時停止し、CD4 CAR 細胞

要約すると、この研究から、LBCL に対する CAR19 治療後の主要な耐性経路は antigen-/lo escape であり、LBCL 中の antigen の定量は CAR T 細胞療法後の転帰と相関するというエビデンスが得られた。CD22 と CD19 を同時に認識できる二重特異性 CAR を用いて、B-ALL における安全で印象的な臨床活性が実証された。この試験における LBCL の 6 カ月 PFS(29%,95% CI 12-48%)はチサゲンレクロイセル 64 と同程度であった。したがって、B-ALL 患者を対象とした本試験では登録が継続中であり、この二重特異性 CAR に対する耐性は CD19+CD22+再発と関連していたが、こ

れはおそらく CAR T 細胞の内因性限界を反映しており、CD22 標的に対する免疫圧が不十分であることを意味している。我々のデータはまた、CAR T 細胞の力価を認定するための重要な製品品質特性としてのサイトカイン産生の価値を示している。今後の研究では、CAR T 細胞による多特異的標的化を最適化し、B 細胞悪性腫瘍とその他の固形癌および液体癌の両方におけるこのクラスの治療薬の効力を向上させるために、CAR T 細胞による多特異的標的化を最適化する必要がある。

16 方法

17 試験デザイン

CD19-22.BB.z-CAR については、再発・難治性の LBCL および B-ALL の成人患者を対象とした単一施設共同第 I 相試験がスタンフォード大学病院で実施され、内部審査委員会による承認と ClinicalTrials.gov(NCT03233854)に登録されたほか、安全と試験実施のためにスタンフォード内部と CAR-T 外部の専門家で構成される試験固有の安全モニタリング委員会が設置され、データモニタリングはスタンフォードの施設内データ安全モニタリング委員会が監督し、2013 年のヘルシンキ宣言 (Declaration of Helsinki) に従って全患者から書面による同意が得られた。完全な試験実施計画書は補足情報に記載されている。用量漸増期では、2 つの組織型を単一群に組み入れ、3+3 デザインを用いて 3 つの用量レベル (DL1:1×10⁶ cells kg⁻¹、DL2:3×10⁶ cells kg⁻¹、DL3:1×10⁷ cells kg⁻¹) での組み入れが許可された。用量漸増期では、試験実施計画書に規定された用量を満たす製品の 80% 以上が DLT と判定された。副次評価項目としては、LBCL では 3 カ月時点、B-ALL では 1 カ月時点で臨床反応を誘発する CD19-22.BB.z-CAR の効果が認められた。副次的評価項目としては、第 2 相試験の推奨用量で 15 例が組み入れられた後、無益性解析が実施された。LBCL では無益性は 3 カ月時点の ORR が 33% 以下、B-ALL では無益性は 1 カ月時点の ORR が 40% 以下と定義された。探索的目的は、CD19-22.BB.z-CAR 投与後の CD19-22-および/または CD22-再発率、CD19-22.BB.z-CAR 投与後の CD19-22.BB.z-CAR 投与時の ORR が 33% 以下であった。

18 患者の登録および適格性

白血球除去療法に適格とされた患者は、2ライン以上の治療後に再発または治療抵抗性を示した LBCL または B-ALL の 18 歳以上であった。該当する場合は、以前の自家 HCT または同種 HCT が 1 ラインの治療として考慮された。以前の治療の一部としてアントラサイクリンおよび抗 CD 20 モノクローナル抗体の投与を受けていた LBCL を有する患者が適格とされた。Richter 型を含む形質転換した indolent リンパ腫は適格とされた。PET/CT による測定が必要とされた。B-ALL については、形態的病変(髄外病変を含む)または MRD が検出でき、かつ骨髄芽球が 5% 未満であることが条件とされた。以前の抗 CD19 標的療法(以前の CAR T を含む)については、以前の CAR の発現が末梢血中の T 細胞の 5% 未満であれば許可された。白血球除去療法時に以前の全身療法から 2 週間以上または 5 半減期のいずれか短い期間が経過しており、以前の毒性が全て安定しているかまたはグレード 1 以下に回復している必要がある。十分な骨髄機能は、血球減少が基礎疾患としての白血病/リンパ腫によるものと考えられる場合を除き、必要とされた。すなわち、好中球絶対数が $750\mu\text{L}$ 以上、血小板数が $50000\mu\text{L}$ 以上、リンパ球絶対数が $150\mu\text{L}$ 以上であり、かつ以前の全身療法から 2 週間以上または 5 半減期のいずれか短い期間が経過している必要がある。また、以前の毒性が全て安定しているかまたはグレード 1 以下に回復している必要がある。十分な臓器機能は、クレアチニンが 2 mg/mL 以上、コントロール不良の細菌、ウイルスまたは真菌感染症または抗生物質の静脈内投与を必要とする感染症が認められた場合、臨床的に有意な ECG 所見が認められない場合、臨床的に有意な胸水貯留が認められない場合、ベースライン時の酸素飽和度が 92% 以上である場合と定義された。適切な臓器機能は、クレアチニンが 2 mg/mL 以上、コントロール不良の細菌、ウイルスまたは真菌感染症または抗生物質の静脈内投与を必要とする 1.5

白血球アフェレーシス後は、治験責任医師の判断でブリッジング療法が許可され、注入前 5 日目から 3 日目にかけて、フルダラビン 30 mg/m^2 とシクロホスファミド 500 mg/m^2 から成るコンディショニング化学療法薬が投与された。2017 年 9 月 12 日から 2019 年 11 月 19 日までの間に CD19-22.BB.z-CAR の投与が開始され、2020 年 6 月 15 日時点でデータがロックされていた。用量漸増及び製造の実行可能性は、疾患の種類に関係なく連続した LBCL により決定された。用量漸増後、患者コホート及び B-ALL コホートが拡大され、各コホート 15 例に第 II 相試験の推奨用量が投与された。

19 毒性評価

用量漸増期では、CRS は Lee 基準 66 に基づき、神経毒性は有害事象共通用語基準 v.4.0.3 に基づき、コホート拡大期では、CRS は米国移植・細胞療法学会(American Society for Transplantation and Cellular Therapy:ASTCT) 基準、神経毒性は ASTCT 免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群の基準 67 に基づき、報告内容を統一するため、用量漸増群の患者は ASTCT 基準に基づき再分類された。有害事象は、治療を受けた全患者について、疾患再発または死亡まで収集された。

20 反応の評価

LBCL がみられる患者と髄外病変があるが同時に骨髄病変も中枢神経系病変もみられない B-ALL 患者の反応は、ルガーノの PET/CT の基準 67 を用いて評価された。その他の B-ALL 患者については、形態的に骨髄芽球が 5%未満の場合が CR、マルチパラメータフローサイトメトリーによる骨髄芽球の割合が 10-4%未満の場合が MRD 陰性と定義された。

21 Axi-cel 患者

2017 年 12 月 27 日から 2020 年 4 月 9 日までの間に、標準的な LBCL に対して axi-cel による治療を受けた連続例の患者が同定された。臨床データの収集ならびに血液およびリンパ節検体の採取については、臨床アウトカムに関するバイオレポジトリプロトコルに基づく同意が得られた。IHC および/または定量的フローサイトメトリー用の組織検体が入手可能な患者も解析対象とされた。このプロトコルはスタンフォード内部審査委員会(Stanford Internal Review Board:no.43375)の承認を受けた。臨床データはカルテのレビューから後ろ向きに収集された。治療効果はルガーノ基準に従って X 線検査で評価された。

22 CD19-22.BB.z 産生

CD19-22.BB.z 製品は、7-11 d 製造工程の閉鎖系自動化システム「CliniMACS Prodigy」で製造された。本 CAR-T 製造の項に記載されている

日は、いずれも製造スキーマ(拡張データ図 2)を反映したものである。凍結した患者のアフェレーシスは、Lovo(Fresenius Kabi)で洗浄し、低用量の IL-2 で一晩静置した後、CliniMACS Prodigy に充填した。0 日目にアフェレーシスは TransAcT(Miltenyi Biotec)で T 細胞を活性化する前に CD4 および CD8 T 細胞を豊富に添加した。1 日目に TransAcT をレンチウイルスベクターである CD19-22.BB.z で形質導入し(図 2a)、感染効率 40 で T 細胞を除去した。その後、TransAcT は 3 日目(新しいマトリックス)または 5 日目(古いマトリックス)に洗い出され、一連の培地交換が行われた。目標用量が達成された 7 日目、9 日目または 11 日目に最終製品が採取され、品質管理試験用に採取され、凍結保存された。製剤の出荷基準は補足表 1 に記載されている。試験期間中、静脈間時間を短縮するために、製造工程の改善を繰り返し実施した。

23 IHC 法

組織マイクロアレイは、診断的生検から採取したホルマリン固定パラフィン包埋組織の 0.6 mm コアを二重に用いて構築された 68。入手可能であれば、症例から追加の全組織切片が評価された。

組織マイクロアレイ又は全切片標本を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋した組織の厚さ 4 mm の切片を用いて免疫組織化学的検査を行い、Leica BOND-III(Leica Biosystems 社)を用いて自動免疫染色を行い、CD19(クローン BT51E;希釈前マウスモノクローナル抗体;Leica Biosystems 社)及び CD22(クローン FPC1;希釈前マウスモノクローナル抗体;Leica Biosystems 社)に対する抗体を用いてスライドを染色した。

染色強度(0:陰性;1:弱;2:中等度;3:強)および染色された腫瘍細胞の割合(0-100%)が独立して評価され、2 名の病理医(S.Y.および Y.N.)が共同でスコアを算出し、陽性強度に染色された腫瘍細胞の割合を乗じて Hスコア 0-300 とした。

24 CD19-22.BB.z 細胞の検出

MD Anderson Cancer Center⁶⁹ で開発された抗イディオタイプ抗体を用いて CD19-22.BB.z 細胞が検出され、抗体標識キットを用いて DyLight 650(サー

モフィッシャー・サイエンティフィック)に結合された後、下流のフローサイトメトリーで使用するために-80°Cで保存された。

25 アフェレーシス、増菌及び最終製品採取時の製造検体の表現型検査

本項では、図 2 に示した表現型解析の方法について説明する。全ての試料を FACS 緩衝液(1×PBS,2%FCS)で洗浄し、4°Cで最低 30 分間染色した後、追加洗浄を行い、フローサイトメトリー法として MACSQuant Analyzer 10(Miltenyi Biotec)を用いた。対照としては MACS Comp ビーズキット(カタログ番号 130-097-900;Miltenyi Biotec)を用いた。これらの実験に用いた抗体を補足表 2 に示す。

26 表現型および消耗プロファイリングのためのフローサイトメトリー

全ての試料を FACS 緩衝液(1×PBS,3%FCS)で洗浄し、4°Cで最低 30 分間染色した後、さらに洗浄してフローサイトメトリーを実施した。UltraComp eBeads(カタログ番号 01-2222-41;Invitrogen)を対照として用い、以下に示す抗体インデックスから得たそれぞれの抗体で染色した。試料を LSRFortessa X-20(BD Biosciences)で泳動し、以下に示す抗体インデックスから得た抗体を用いて染色した。

27 消耗および T 細胞サブセットの表現型検査パネル

本項では、図 2 及び図 4 に示した細胞内サイトカインパネルの方法及び拡大データ図 2 に示した方法について説明する。まず、試料をパネル骨格(CD3、CD4、CD8、CAR、バイアビリティ)で染色した後、T 細胞サブセット(CD45RA、CD45RO、CCR7、CD62L、CD95)又は消耗マーカー(CD39、LAG3、PD-1)の 2 つに分割し、全ての試料を調製し、上記と同様に洗浄した。この項及び前の 2 つの項の分析は、FlowJo v10.5.3(FlowJo LLC)で実施した。

28 フローサイトメトリーによる NALM6 腫瘍ライン抗原密度検査

本項では、図 4 に示した細胞内サイトカインパネルの作製方法について述べる。全ての NALM6 株を 2 つに分け、CD19 又は CD22 抗体のいずれかで染色し、上記と同様に調製、洗浄した。

29 CD19-22.BB.z/CD22.BB.z 産物と NALM6 標的細胞との共培養

本項では、図 4 に示した細胞内サイトカインパネルの操作法について説明する。37°C で 6-7 時間培養した後、細胞をモネンシン(サーモフィッシャー・サイエンティフィック)および CD107a と共培養し、陽性対照としてホルボールミリステートアセテート/イオノマイシン(Sigma-Aldrich)条件を採用し、モネンシンなし、CD107a なし、腫瘍細胞なしのいずれも陰性対照とした。共培養後、細胞を FACS 用緩衝液で洗浄し、CD3,CD4,CD8,CD69,CAR,LIVE/DEAD および CD107a から成る細胞外抗体混液に再懸濁し、4°C で 30 分間培養した。次に細胞を FACS 用緩衝液で洗浄した後、CAR-T 産物を固定・透過処理するキット(BD Biosciences)を用いて細胞内サイトカイン染色を行い、IFN- γ および TNF- α から成る細胞内抗体混液に再懸濁し、4°C で一晩培養した。翌朝、細胞を FACS 用緩衝液で洗浄した後、LSRFortessa X-20 上でフローサイトメトリーを行う。抗体の全パネルを補足表 3 に示す。

30 リアルタイム末梢血 CAR-T 表現型検査

LSR II(BD Biosciences)を用いてリアルタイムで CAR-T 細胞及び CAR-B 細胞の免疫プロファイリングを行うための高次元イムノフェノタイピングフローサイトメトリーパネルがデザインされ、Cytobank で解析された。新鮮な全血液から Ficoll(Ficoll-Paque PLUS;Sigma-Aldrich)を用いた勾配遠心法により PBMC(末梢血単核細胞)が分離され、2,000,000 個の PBMC 間が固定化 Live/Dead aqua(Invitrogen)amine-reactive viability で染色された後、Fc ブロック(TruStain FcX;BioLegend)とともに 5 分間プレインキュベートされた後、補足表 4 に記載された抗体パネルを用いて室温で染色された。CD19-22.BB.z 細胞が陽性対照として用いられ、8 mL の全血液から分離された細胞数に制限されない限り、少なくとも 106 個の細胞が採取され、CAR-T 細胞の検出限界は、採取された全 PBMC の 104 個に 1 個と算出された。

31 in vivo CD19-22.BB.z-CAR 拡張期の qPCR 法による測定

ベースライン時および 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目、90 日目および 180 日目の postCAR 注入時に QIAamp DNA Mini Kit(カタログ番号 51306;QIAGEN)を用いて全血(2×10^6 - 5×10^6 PBMC)から DNA を抽出した。CAR の存在は、補足表 5 に示したプライマーおよびプローブ配列を用いた qPCR により測定された。標準曲線には、部分 CD19-22.BB.z 配列と部分アルブミン配列を含むカスタムミニ遺伝子プラスミド(Integrated DNA Technologies)を設計し、 5×10^6 ~ 5×10^9 コピーの範囲で 10 倍段階希釈したプラスミドが標準曲線に含まれていた。各時点のプラスミドと患者の DNA を 3 回測定したところ、 $5 \mu\text{L}$ の DNA(合計 50 ng)、100 nM の順方向および逆方向アルブミンプライマー(または 100 nM の順方向および 200 nM の逆方向 CD19-22.BB.z プライマー)、 $10 \mu\text{L}$ の TaqMan Fast Universal PCR Master Mix(2 \times)に懸濁した 150 nM のプローブ、No AmpErase UNG または同等物(サーモフィッシャー・サイエンティフィック)および $5 \mu\text{L}$ の TE 緩衝液(カタログ番号 AM9935;Invitrogen)が含まれていた。Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System を用いて qPCR を行ったところ、1 反応当たり $20 \mu\text{L}$ の精度で $R^2 > 0.99$ 、 $-3.38 > \text{傾き} > -3.71$ 、効率 $> 86\%$ であった。

32 32-plex サイトカインの IsoPlexis

CD19-22.BB.z または CD22.BB.z 産物をマイクロビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて磁氣的に選択し、CD4+および CD8+集団を NALM6-double knockout,NALM6-CD19 または NALM6-CD22 と 1:2 の比率(T 細胞:腫瘍)で 20 時間共培養した後、培養により腫瘍細胞を除去し、残りの T 細胞を CD22-Fc-AF647 で染色して CD19-22.BB.z を検出した。続いて、30000 個の生細胞を 32 プレックスのヒト多官能価単一細胞 IsoCode チップ(IsoPlexis)に導入した。試料が入手できた時点でチップを複製し、データを解析した。チップし、IsoSpeak ソフトウェア v.2.8.0.0(IsoPlexis)を用いてデータを解析した。単一細胞の刺激条件、百分率および PSI の間の統計的有意性は、Mann-Whitney U-test により検定した。IsoLight

33 殺腫瘍効果のある IncuCyte 増殖試験

二重特異性 CD19-22.BB.z と単一の CD19 および CD22 CAR T 細胞の殺腫瘍能は、NALM6-野生型、NALM6-CD19 knockoutor NALM6-CD22 ノックアウトのいずれかをエフェクター:標的比 3:1 で共培養することにより評価

された。全て同じドナーから採取した CD19-22.BB.z 細胞は CliniMACS Prodigy 上で培養し、CD19 および CD22 CAR T 細胞は小規模の平板培養法を用いて培養した。全ての NALM6 細胞株は緑色蛍光蛋白(GFP)陽性であり、導入されていない T 細胞は模擬条件として用いた。殺腫瘍効果は、IncuCyte System(Sartorius)を用いた GFP の経時的な減少として測定し、正規化した。

34 抗原密度の評価

検体は採取から 24 時間以内(平均±時間)に処理され、補足表 6 に記載された抗体の組合せを用いて染色され、FACSLyric システム(BD Biosciences)で分析された。CD19、CD20 及び CD22 の蛍光強度の中央値は、抗原密度測定のための飽和抗体条件下で測定された。細胞当たりの結合抗体量は、Quantibrite フィコエリトリンビーズ(BD Biosciences)及びアロフィコシアニン及び Brilliant Violet 421(BD Biosciences)用のカスタム BD Biosciences 定量ビーズ(BD Biosciences)を用いたキャリブレーションにより、蛍光抗体比を調整した後、細胞当たりの結合抗体量が算出された。

35 細胞フリー腫瘍 DNA の測定

保存されたパラフィン包埋組織から腫瘍 DNA が抽出された。NGS により、普遍的コンセンサスプライマーを用いた IgH-VDJ、IgH-DJ 及び Igκ/Igλ 領域の PCR 増幅が実施され、腫瘍クローン型(Adaptive Biotechnologies 社)⁷⁰ が決定された。postCD19-22.BB.z-CAR 注入前、0、7、14、21、56 及び 90 日目に EDTA 入り採血管から採取した血液から抽出した血漿中の ctDNA が測定された。

36 統計解析

記述統計は、連続変数については中央値と IQR によって、カテゴリ変数については数と百分率によって列挙され、Fisher の正確(独立)検定と McNemar の(従属)検定はカテゴリ変数間の関連を評価し、2つのランダム連続変数間の関連については Spearman 相関を用いた。連続変数については、スチューデントの t 検定又は Wilcoxon の符号付順位検定のいずれかを用いて群間比較が行われた。すべての検定は両側検定であった。

CD19 濃度と進行のリスクを関連付けるために、被験者数が少なかったことからファースのペナルティ付きロジスティック回帰を用いた。全生存期間は、輸注から原因を問わない死亡までの期間と定義された。PFS は、輸注から病勢進行又は原因を問わない死亡までの期間と定義され、最終追跡時に打ち切りとされた。全生存期間及び PFS は、Kaplan-Meier 法により推定された。奏効率は 95% ClopperPearson CI とともに要約された。解析は探索的なものであり、多重比較の調整は行われなかった。使用した統計ソフトウェアパッケージには、R v.3.6.2 及び Prism 8(GraphPad Software)が含まれており、Prism 8 で得られた P 値は $P < 0.0001$ を下回らなかった。

37 報告のまとめ

研究デザインに関する詳細な情報は、本記事にリンクされた Nature Research Reporting Summary に掲載されている。

38 データの利用可能性

生データおよび解析データの要求については、すべて責任を負う著者が照査し、要求に知的財産権または守秘義務が課されるか否かを判断する。本稿に含まれていない患者関連のデータについては、臨床試験の一環として作成されたものであり、患者の秘密保持の対象となる場合がある。共有可能なデータおよび資料については、資料提供契約に基づき公表する。図 1-4 および拡張データ図 1-7 の原資料は、論文とともに提供される。CD19-22 の二重特異性 CAR 配列は、2015 年 3 月 19 日に出願された「二重特異的抗 Cd 22-抗 Cd 19 キメラ抗原受容体」という表題の特許出願(米国仮特許出願第 62/135442 号)に記載されており、アミノ酸配列は補足図 2 に示されている。

39 参考文献

1. Turtle, C.J. et al., CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B 細胞 ALL patients. *J. Clin. Invest.* 126, 2123-2138 (2016).

PubMed PMC 記事 Google Scholar

2. Locke,F.L.et al.Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma(ZUMA-1):a single-arm,multicenter,phase 1-2 trial.Lancet Oncol.20,31-42(2019).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

3. Neelapu,S.S.et al.Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma.N.Engl.J.Med.377,2531-2544(2017).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

4. Schuster,S.J.et al.,チサゲンレクロイセル in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma.N.Engl.J.Med.380,45-56(2019).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

5. Hay,K.A.et al.Factors associated with durable EFS in adult B 細胞 ALL patients achieving MRD-陰性 CRを達成した CD19 CAR T 細胞療法後の成人 B 細胞 ALL 患者。血液 133,1652-1663(2019).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

6. モード、S.L.et al.,チサゲンレクロイセル in children and young adults with B 細胞 lymphoblastic leukemia.N.Engl.J.Med.378,439-448(2018).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

7. Park,J.H.et al.Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia.N.Engl.J.Med.378,449-459(2018).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

8. Nastoupil, L.J. Standard-of-care axicabtagene ciloleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma: results from the US Lymphoma CAR T Consortium. *J. Clin. Oncol.* 38, 3119-3128 (2020).
-

PubMed の記事 PMC Google Scholar

9. エイブラムソン、J.S. et al.: 再発/治療抵抗性(R/R)大細胞型 B 細胞リンパ腫を対象とした lisocabtagene maraleucel (liso-cel) の多施設共同第 I 相試験である Transcend NHL 001 から得られた重要な安全・効果に関する結果。血液 134, 241 (2019)。
-

記事 Google Scholar

10. Lee, D.W. et al., T cells expressing CD19 chimeric antigen receptor for acute lymphoblastic leukemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517-528 (2015).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

11. Liu, E. et al. Use of CAR-transmitted natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *N. Engl. J. Med.* 382, 545-553 (2020).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

12. Majzner, R.G. & Mackall, C.L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer Discov.* 8, 1219-1226 (2018).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

13. Bagashev らは、CD19 を標的とした免疫療法後に出現した CD19 の変化により、ミスフォールディングタンパク質が小胞体内に保持されると報告している。 *Mol. Cell. Biol.* 38, e00383-18 (2018)。
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

14. Asnani, M. et al. CD19 イントロン 2 の保持は、CD19 にサブクローンフレームシフト変異を有する白血病における CART-19 耐性の一因となる。白血病 34,1202-1207(2020)。
-

PubMed の記事 PMC Google Scholar

15. Orlando, E. J. et al., Genetic mechanism of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. Nat. Med. 24, 1504-1506 (2018).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

16. Sotillo らは、「獲得変異と CD19 の選択的スプライシングが融合することで、CART-19 に対する抵抗性 (Resistance to CART-19 Immunotherapy) が可能」 cov. 5, 1282-1295 (2015)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

17. Majzner, R. G. らによると、汎がん抗原である B7-H3 を標的とする CAR T 細胞は、小児の固形腫瘍および脳腫瘍に対して強力な前臨床活性を示す。Clin. Cancer Res. 25, 2560-2574 (2019)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

18. Watanabe, K. et al. 「標的抗原密度は、抗 CD 20-CD 28-CD 3 ζ キメラ抗原受容体で修飾されたエフェクター CD8⁺T 細胞の有効性を規定する」(J. Immunol. 194, 911-920 (2015))。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

19. Hombach, A.A. et al., Superior therapeutic index in lymphoma therapy: CD30+CD34+造血幹細胞はキメラ抗原受容体 T細胞による攻撃に抵抗する。Mol. Ther. 24, 1423-1434(2016).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

20. Walker, A.J. et al., Tumor antigen and receptor density regulate efficacy of the chimeric antigen receptor targeting anaplastic lymphoma kinase. Mol. Ther. 25, 2189-2201(2017).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

21. Majzner, R.G. et al., Tuning the antigen density requirement for CAR T-cell activity. Cancer Discov. 10, 702-723(2020).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

22. Fry, T.J.らは、CD 22 を標的とした CAR T細胞は、CD 19 を標的とした CAR による免疫療法に対して未治療または抵抗性を示す B-ALL の寛解を誘導する。Nat. Med. 24, 20-28(2018).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

23. Cohen, A.D. et al., B細胞成熟抗原特異的 CAR T細胞は多発性骨髄腫で臨床的に活性を示す。J. Clin. Invest. 129, 2210-2221(2019).
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

24. Oak, J. et al. Target antigen deregulation and other mechanism of failure after axicabtagene ciloleucel(CAR19)therapy. Blood 132, 4656(2018).
-

記事 Google Scholar

-
25. Neelapu, S.S. et al.によると、axi-cel 後に再発した大細胞型 B 細胞リンパ腫患者において、他の B 細胞系統の特徴が維持された CD 19 欠損が認められた。血液 134,203(2019).
-

記事 Google Scholar

-
26. Shah, N.N. et al., Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 62,964-969(2015).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

-
27. Haso, W. et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptor targeting B 細胞 precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121,1165-1174(2013).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

-
28. Tedder, T.F., Poe, J.C. & Haas, K.M. CD22: a multifunctional receptor that regulates B lymphocyte survival and signal transduction. *Adv. Immunol.* 88,1-50(2005).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

-
29. Raponi, S. et al. Flow cytometer study of potential target antigen (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma* 52,1098-1107(2011).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

30. Olejniczak, S.H., Stewart, C.C., ドノヒュー、 K. & Czuczman, M.S. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B 細胞 malignancy using flow cytometry. *Immunol. Invest.* 35, 93-114 (2006).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

31. Shah, N.N. et al., CD4/CD8 T 細胞の選択はキメラ抗原受容体(CAR) T 細胞の力価と毒性に影響を及ぼす: 第 I 相抗 CD 22 CAR T 細胞試験の最新の結果。 *J. Clin. Oncol.* 38, 1938-1950 (2020)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

32. Qin, H. et al. 「CD19 と CD22 の両方を標的とする二価キメラ抗原受容体の前臨床開発」、 *Mol. Ther. Oncolytics* 11, 127-137 (2018)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

33. Frank, M.J. et al., Optimizing circulating tumor DNA based assessment in patients with large B-Cell Lymphoma with Axicabtagene ciloleucel. *J. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00377> (2021).
34. Weber, E.W. et al., Transient rest はエピジェネティックなリモデリングを介して消耗した CAR-T 細胞の機能を回復させる。 *Science* 372, eaba1786 (2021)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

35. Yu, H. et al., Repeated loss of target surface antigen after immunotherapy in primary median large B cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 92, E11 E13 (2017)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

36. Baird, J.H.らによる CD 22 を標的とする CAR による T 細胞療法は、CD 19 を標的とする CAR に抵抗性を示す大細胞型 B 細胞リンパ腫において完全寛解を誘導する。血液 137,2321-2325(2021)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

37. Gardner, R. et al. CD19 陰性骨髄表現型の獲得により、MLL 遺伝子再構成 B-ALL が CD19 CAR-T 細胞療法から免疫逃避することが可能となる。血液 127,2406-2410(2016)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

38. ヤコビー、E. et al. による CD19 CAR の免疫圧は、B 前駆細胞急性リンパ芽球性白血病の系統転換を誘発し、本来の白血病の可塑性を明らかにする。Nat. Commun. 7,12320(2016)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

39. Schuster, S.J. et al., Chimeric antigen receptor T cells in refractory B 細胞リンパ腫。N. Engl. J. Med. 377,2545-2554(2017)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

40. シャラビ、H. et al., Sequential loss of tumor surface antigen after chimeric antigen receptor T cell therapy in diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica 103, e215 e218(2018)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

41. Ali, S.A. らは、抗 B 細胞成熟抗原キメラ抗原受容体を発現する T 細胞は、多発性骨髄腫の寛解を引き起こす。血液 128,1688-1700(2016)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

42. HER2 および IL13R α 2 を標的とする Hegde, M. et al. Tandem CAR T 細胞は腫瘍抗原逸脱を軽減する(J. Clin. Invest. 126, 3036-3052(2016))。
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

43. Bielanowicz, K. et al., Than 価 CAR T 細胞は膠芽腫における患者間の抗原変動性を克服する。Neuro Oncol. 20, 506-518(2018)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

44. Zah, E. et al. Systematic optimized BCMA/CS1 bispecific CAR-T cells, robustly control heterogeneous な多発性骨髄腫を制御する。Nat. Commun. 11, 2283(2020)。
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

45. He, X. et al. CD13 および TIM3 を標的とする二重特異性および分裂 CAR T 細胞は急性骨髄性白血病を根絶する。Blood 135, 713-723(2020)。
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

46. Schmidt らは、APRIL に基づく三量体の CAR 結合ドメインを合理的に設計することにより、多発性骨髄腫の効率的な標的化が可能になるとしている。Blood Adv. 3, 3248-3260(2019)。
-

PubMed PMC 記事 CAS Google Scholar

47. Shah, N.N. et al. 「Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B 細胞 malignancy: a phase 1 dose escalation and expansion trial. Nat. Med. 26, 1569-1575 (2020).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

48. Tong, C. et al., Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B 細胞リンパ腫。 Blood 136, 1632-1644 (2020).
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

49. Gardner, R.A. et al., Efficacy of SCRI-CAR19x22 T cell product in B-ALL and persistence of anti-CD22 activity. J. Clin. Oncol. 38, 3035 (2020).
-

記事 Google Scholar

50. Fousek, K. らは、CD19 の発現に関係なく急性 B 細胞系白血病を標的とする CAR T 細胞を開発した。 白血病 35, 75-89 (2021)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

51. Dai, H. et al. 「Bispecific CAR-T cells targeting CD19 and CD22 both for therapy of adults with relapsed or refractory B 細胞 acute lymphoblastic leukemia」 J. Hematol. Oncol. 13, 30 (2020).
-

PubMed PMC 記事 CAS Google Scholar

52. Amrolia, P.J. et al., CD19 および CD22 を標的とする CAR (bicistronic chimeric antigen receptor) T 細胞療法「AUTO3」の小児における再発・難治性 B 細胞性急性リンパ芽球性白血病 (r/r B-ALL) 患者を対象とした第 I 相試験: Amelia study. Blood 134, 2620 (2019).
-

記事 Google Scholar

53. Lynn, R.C.らは、CAR T細胞における c-Jun の過剰発現は消耗抵抗性を誘導する。Nature 576,293-300(2019).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

54. Guest, R.D. et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptor: evaluation of 4 different scFv and antigen. J. Immunother. 28, 203-211 (2005).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

55. Hudecek, M. et al. Receptor affinity and extracellular domain modification は、ROR 1 特異的キメラ抗原受容体 T細胞による腫瘍認識に影響を及ぼす。Clin. Cancer Res. 19, 3153-3164 (2013).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

56. Long, A.H., Haso, W.M. & Orentas, R.J. Lessons from a highly active CD22-specific chimeric antigen receptor. Oncoimmunology 2, e23621 (2013).
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

57. Li, D.らは、グリピカン 3 を標的とする持続性多機能キメラ抗原受容体 T細胞により、マウスの同所性肝細胞癌が消失することを示した。Gastroenterology 158, 2250-2265.e20 (2020).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

58. Singh, N. et al. Single chain variable fragment linker length は CAR の生物学と T 細胞の有効性を調節する。血液 134,247(2019).

記事 Google Scholar

59. Grada, Z. et al., TanCAR: a novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy. Mol. Ther. Nucleic Acids 2, e105(2013).

PubMed PMC 記事 CAS Google Scholar

60. CD19/CD20 二重特異性キメラ抗原受容体を発現する Zah, E., Lin, M.-Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M. C. & Chen, Y. Y. T 細胞は悪性 B 細胞による抗原逃避を防ぐ。Cancer Immunol. Res. 4, 498-508(2016).

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

61. Spiegel, J. Y. et al. Outcomes of patients with large B-cell lymphoma progressing after axicabtagene ciloleucel. Blood 137, 1832-1835(2021).

CAS PubMed PMC Google Scholar

62. Blaeschke, F. et al., Induced of a central memory and stem cell memory phenotype in functional active CD4+ and CD8+ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19+ acute lymphoblastic leukemia. Cancer Immunol. Immunother. 67, 1053-1066(2018).

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

63. Xu, Y. et al. 密接に関連した T 記憶幹細胞は、CAR-CD19-T 細胞の in vivo での増殖と相関しており、IL-7 および IL-15 によって保存されている。Blood 123, 3750-3759(2014).

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

64. Pasquini, M.C. et al., Real-world evidence of チサゲンレクロイセル for pediatric acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv.* 4, 5414-5424 (2020).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

65. Cheson, B.D. et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the ルガーノ classification. *J. Clin. Oncol.* 32, 3059-3067 (2014).
-

PubMed PMC 記事 Google Scholar

66. Lee, D.W. et al., Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124, 188-195 (2014).
-

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

67. Lee, D.W. et al., ASTCT のコンセンサスによる、サイトカイン放出症候群と免疫エフェクター細胞に関連する神経毒性に関するグレード分類。 *Biol. Blood Marrow Transplant.* 25, 625-638 (2019)。
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

68. Marinelli, R.J. et al. The Stanford Tissue Microarray Database. *Nucleic Acids Res.* 36, D871-D877 (2008).
-

CAS の PubMed に関する記事 PMC Google Scholar

69. Jena, B. et al., Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody for detection CD19-specific T cells in clinical trials. PLoS ONE 8, e57838 (2013).

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

70. Ching, T. et al., Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establish measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. BMC Cancer 20, 612 (2020).

CAS の PubMed PMC 記事 Google Scholar

[参考文献のダウンロード](#)

40 謝辞

本研究は California Institute for Regenerative Medicine (Award No. CLIN2-10846 to C.L.M., principal investigator) および National Cancer Institute (Grant No. 5P30CA124435 to C.L.M., grant no. U54 CA232568-01 to C.L.M. and D.M.) から支援を受けた。C.L.M. は Stanford University Cancer Immunotherapy Program を支援する Parker Institute for Cancer Immunotherapy のメンバーである。本研究は Virginia and D.K. Ludwig Fund for Cancer Research (C.L.M.) から支援を受けた。National Gene Vector Biorepository (National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health [NIH]) から資金提供を受け、契約番号 75N92019D00018 で J.Y.S. は 2019-2020 米国血液学会 Research Training Award for Fellows から支援を受けた。K.L.D. は Maternal and Child Health Research Institute から Anne T. and Robert M. Bass Endowed Faculty Scholder in Pediatric Cancer and Blood Diseases の Taube Distinguished Scholder である。本研究は Maternal and Child Health Research Institute から Anne T. and Robert M. Bass Endowed Faculty Scholder in Pediatric Cancer and Blood Diseases の Taube Distinguished Scholder である。本研究は Maternal and Child Health Research Institute から Anne T. and Robert M. Bass Endowed Faculty Scholder in Pediatric Immunotherapy の Taube Distinguished Scholder であ

る。本研究は Maternal and Child Health Research Institute から Anne T.and Robert M.Bass Endowed Faculty Scholder in Pediatric Cancer and Blood Diseases の Taube 01 049605 BioRender IsoPlexis

41 著者に関する情報

著者によるメモ

1. レイチェル・リン

現住所:米国カリフォルニア州サンフランシスコ市ライエル
Immunopharma

2. 著者ら(Jay Y.Spiegel,Shabnum Patel,Lori Muffly)は等しく貢献した。

3. 著者である Steven Feldman,Crystal Mackall,David B.ミクローシュが
共同で本研究を監督した。

42 所属

1. **Division of Blood and Marrow Transplantation and Cellular
Therapy,Stanford University School of Medicine,Stanford,CA,USA**

Jay Y.Spiegel,Lori Muffly,John H.Baird,Matthew J.Frank,Parveen シラ
ーズ、Juliana Craig,Maria イグレスィアス、Sally Arai,Laura
Johnston,Robert Lowsky,Everett Meyer,Robert S.Negrin,Andrew
R.Rezvani,Surbhi Sidana,Judith シズル、Wen-Kai 翁&David B.ミクロ
シュ

2. **Center for Cancer Cell Therapy,Stanford Cancer
Institute,Stanford University School of Medicine,Stanford,CA,USA**

Shabnum Patel,Lori Muffly,尾田 Sahaf,Harshini Chinnasamy,Zach
Ehlinger,Warren Reynolds,Rachel Lynn,ニコラオス Gkitsas,Robbie
G.Majzner,Liora Schultz,スネーハーラーマクリシュナ、Kara
L.Davis,Katherine A.Kong,Steven Feldman,Crystal L.Mackall&David
B.ミクロシュ

3. **Division of Hematology/Oncology,ロヨラ University Medical
Center,Chicago,IL,USA**

M.ホサインナシード

4. **Stanford University School of Medicine, Department of Clinical Pathology, Stanford, CA, USA**
Jean Oak, Sheren Younes, Yasodha Natkunam, Michael G. Ozawa & Eric Yang
5. **Stanford University School of Medicine, Department of Biomedical Data Science, Stanford, CA, USA**
John Tamareisis
6. **Stanford University School of Medicine, Department of Pediatrics Hematology/Oncology, 米国カリフォルニア州スタンフォード**
Maria カテリーナ Rotiroti, Robbie G. Majzner, Liora Schultz, スネーハー ラーマクリシュナ, Kara L. Davis & Crystal L. Mackall
7. **Adaptive Biotechnologies 社(米国ワシントン州シアトル)**
Chelsea Mullins, Allison Jacob & イラン Kirsch
8. **IsoPlexis(米国コネチカット州ブラントフォード)**
Magali Bazzano, Jing Zhou & Sean Mackay
9. **BD Biosciences 社(米国カリフォルニア州サンノゼ)**
Scott J. Bornheimer
10. **Pediatric Oncology Branch Center for Cancer Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA**
Liora Schultz, Nirali N. Shah, Haiying Qin & Terry Fry
11. **University of Colorado Anschutz and デンバー小児病院、 Department of Pediatrics Hematology/Oncology, University of Colorado Anschutz and Institute(米国コロラド州デンバー)**
テリー・フライ

43 拠出金

C.L.M.とD.B.M.が試験を計画した。

D.B.M., S.F., J.Y.S., S.P., L.M., J.H.B., N.M.H., J.O., B.S., J.C., M.I., S.Y., M.G.O., E.Y., Z.E., W.R., R.Lynn と H.C. がデータの収集と組み立てを行った。

C.L.M.,D.B.M.,S.F.,J.Y.S.,S.Y.,L.M.,L.M.,J.H.B.,S.F.,J.Y.S.,S.Y.,M.N.N.N.,
J.T.,I.K.,C.M.と A.J.がデータの分析と解釈を行い、
C.L.M.,D.B.M.,S.N.S.,J.S.,W.K.W.,L.S.,H.Q.,T.F.がデータの解析と解釈を
行い、C.L.M.,D.B.M.,S.W.,L.S.,H.Q.と A.J.がデータの解析と解釈を行い、
C.L.M.,J.S.,W.K.W.,L.S.,H.Q.と A.J.がデータの解析と解釈を行い、
C.L.M.,D.B.M.,S.F.,J.Y.S.,S.P.N.,J.T.,I.K.,C.M.j.S.,W.K.W.,L.S.,H.Q.と T
Lowsky

44 対応する著者

Crystal L.Mackall 又は David B.ミクローシュとの対応

45 倫理宣言

46 競合する利益

C.L.M.は Lyell Immunopharma および Syncopation Life Sciences の創設者であり、同社の株式を保有し、コンサルティング料を受け取っているほか、NeoImmune Tech、ネクターTherapeutics、Immatics、GlaxoSmithKline および Apricity Health からコンサルティング料を受け取り、CD22-CAR については Juno Therapeutics からロイヤルティを受け取っている。Vor Biopharma および Apricity Health の株式を保有している。D.B.M.は Kite-Gilead、Juno Therapeutics-Celgene-ブリストル・マイヤーズスクイブ、Novartis および Adaptive Biotechnologies からコンサルティング料を受け取っている。また、Kite-Gilead および Adaptive Biotechnologies から研究依頼を受けている。S.F.は Lonza PerMed、Gradalis、Obsidian および Samsara Biocapital から研究依頼を受けている。S.P.は Cellares、Amgen、Pfizer および Kite-Gilead から研究依頼を受けている。A.S.N.は Adaptive Biotechnologies、Astellas Pharma、Servier および Baxsara Biocapital から研究依頼を受けている。A.R.N.は Adaptive Biotechnologies、Astellas Pharma、Servier および Baxsara Biocapital から研究依頼を受けている。A.R.N.は Amgen、Pfizer および Kite-Gilead から研究依頼を受けている。A.R.N.は Adaptive Biotechnologies、Astellas Pharma、Servier および Baxsara Biocapital から研究依頼を受けている。A.R.N.は CAR invariant NKT 細胞を開発している Kuur Therapeutics、ならびに CAR サイトカイン誘導性キラー細胞を開発している CoImmune から研究依頼を受けている。A.R.R.は Pharmacyclics から

研究支援を受けており、1 回限りの特別な科学諮問委員会として Nohla および Koledio を担当している。A.R.R.は U.S.Department of Justice の医療専門家証人である。H.Q.は NIH を通じて胸腺ストローマのリンホポエチン受容体-CAR に関するロイヤルティを Lentigen から受け取っている。I.K.、C.M.および A.J.は Adaptive Biotechnologies の常勤従業員および株主である。R.G.M.は CAR T 細胞に対する免疫療法の分野で載 Aptorum Immunopharma

47 追加情報

ピアレビュー情報 Nature Medicine は、本研究のピアレビューに貢献してくれた Katayoun Rezvani、Saar Gill をはじめとする匿名のレビュー担当者に感謝の意を表するとともに、Saheli Sadanand は本論文の第一編集者であり、残りの編集チームと協力して編集プロセスとピアレビューを管理した。

Springer Nature 社は、公表された地図および施設との関係における管轄区域の主張に関して、中立性を維持している。

48 拡張データ

49 [拡張データ図 1 axi-cel 後の再発のモデルに基づく予測](#)

あてはめたペナルティ付きロジスティック回帰モデルに基づく、治療前の所定の CD19 抗原密度に対する再発リスクの推定値。

50 [拡張データ図 2 前 axi-cel 抗原密度の評価](#)

CD19 IHC H スコアおよび抗原密度を定量的フローサイトメトリーにより 15 名の患者で axi-cel 前に測定した。これらの値のスピアマン相関を 1G に示す。

51 [拡張データ図 3 CONSORT 図](#)

CD19-22-CD8.BB.z 臨床試験の全体図

52 [拡張データ図 4 CD19/22 CAR T 製造フローチャートと培養日数、製造マトリックス、用量レベル、疾患別の製品内訳](#)

a:旧マトリックスと新マトリックスの TransAcT 洗い出し時期の違いを詳述した製造工程図、b:培養日数により分類した輸液製剤の特性表、c:疾患コホートにより分類した輸液製剤の特性表、d:採取時の旧マトリックスと新マトリックスとの間の製剤膨張度の有意な差($p < 0.0001$, t 検定、両側)。ボックスプロットの中心線は中央値に対応し、ヒンジは 25 パーセンタイル値及び 75 パ

面積。CD4 の AUC は CD4 の AUC より大きかった($p=6.0 \times 10^{-6}$)。f, フローサイトメトリー法により e 及び f を比較した CD4 及び CD8 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD8 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD8 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD8 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD4 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD8 CD19-22.BB.z-CAR のピーク面積。CD4 及び CD8 CD19-22.1.5 5.2 10-8 1.2 10-10

原データ

57 拡張データ図 9 CD19-22.BB.z 投与後の部位密度の変化

a:IHC H-score pre-CD19-22.BB.z 及び post progression を用いて LBCL 患者の CD19 を評価した場合のウォーターフォールプロット。CD19 陽性のカットオフ値は 150 であった。b:IHC H-score pre-CD19-22-CD8.BB.z 及び post progression を用いて LBCL 患者の CD22 を評価した場合のウォーターフォールプロット。CD22 陽性のカットオフ値は 150 であった。

原データ

58 拡張データ図 10 Incucyte による CD19-22 scFv の機能評価ならびに CD19-22.BB.z-CAR および CD22-BB.z.CAR の MFI, 形質導入効率および VCN の比較

a:Incucyte は CD19-22、CD19、CD22 または Mock T 細胞との共培養後に殺腫瘍効果を示し、CD19 scFv または CD22 scFv のいずれかを介して良好に作用する($n=1$ ドナー、技術的 3 連)b:蛍光標識した CD22 分子を介して測定した平均蛍光強度 c:CAR 導入効率及びベクターコピー数 b-c については、 $n=5$ CD22-BB.z 製剤、11 CD19-22.BB.z 製剤。

原データ

59 補足情報

60 補足情報

補足表 1-6、補足図 1-4 及び CD19-22.BB.z 試験実施計画書

61 報告のまとめ

62 原データ

63 原データ図 1

統計的な情報源データ

64 原データ図 2

統計的な情報源データ

65 [原データ図 3](#)

統計的な情報源データ

66 [原データ図 4](#)

統計的な情報源データ

67 [元データの拡張データ図 4](#)

統計的な情報源データ

68 [元データの拡張データ図 6](#)

統計的な情報源データ

69 [元データの拡張データ図 7](#)

統計的な情報源データ

70 [元データ\(拡張データ\)図 8](#)

統計的な情報源データ

71 [元データの拡張データ図 9](#)

統計的な情報源データ

72 [元データの拡張データ図 10](#)

統計的な情報源データ

73 権利と許可

オープンアクセス本文書は Creative Commons Attribution 4.0 International License の下でライセンスされており、本文書では、オリジナルの著者および情報源に適切なクレジットを付与し、Creative Commons license へのリンクを提供し、変更があった場合に限り、いかなる媒体または形式においても使用、共有、改変、配布および複製が許可されている。本文書に含まれる画像またはその他の第三者の資料は、その資料のクレジットラインに別の記載がない限り、本文書の Creative Commons License に含まれている。本文書の Creative Commons License に含まれておらず、意図する使用が法的規制により許可されていない場合、または許可された使用を超えている場合は、著作権者から直接許可を得る必要がある。本文書のライセンスのコピーを閲覧するには、<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>にアクセスすること。

[転載と許可](#)

74 本記事について

75 この記事を引用する

Spiegel,J.Y.,Patel,S.,Muffly,L.et al.による CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B 細胞 malignants:a phase 1 trial.Nat Med 27,1419-1431(2021).<https://doi.org/1.1038/s41591-021-01436-0>

[引用文献のダウンロード](#)

- 2020 年 9 月 29 日受領
- 受理 09 年 2021 年 6 月
- 2021 年 7 月 26 日発行
- DateAugust 2021 を発行する
- DOI<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01436-0>

76 この記事を共有する

以下のリンクを共有していれば、誰でもこのコンテンツを読むことができる:

共有可能なリンクを取得する

Springer Nature SharedIt コンテンツ共有構想(content-sharing initiative)により提供される

77 被験者

- [急性リンパ性白血病](#)

- [がん免疫療法](#)
- [リンパ腫](#)
- [第Ⅰ相試験](#)

78 詳細な情報

- [新たに考案された有効な CD22 CAR-T 療法は、継続治療として CD19 CAR-T 療法と併用することで、再発・難治性の白血病患者に強い抗腫瘍効果をもたらした。](#)

- 張昱

- 西齋李

- Jianxiang 王

実験的血液学・腫瘍学(2022)

- [再発性または難治性多発性骨髄腫における BCMA および CD38 を標的とする二重特異性 CAR-T 細胞療法](#)

- ヘン・メイ

- 成公李

- Yu Hu 氏

Journal of Hematology&Oncology 誌(2021 年)

- 次世代の CAR-NK 免疫療法の開発

- アレキサンダー・Biederstädt

- カタユーン・レズヴァニ

International Journal of Hematology(2021)

- 再発または難治性の B 細胞性急性リンパ芽球性白血病の小児および若年成人患者を対象とした CAR-T 細胞を用いた CD19 および CD22 の二重標的試験:第 I 相試験

- ショーン・コルドバ

- Shimobi 大沼河

- ペルシア J.Amrolia

ネイチャー・メディシン(2021)