



Agilent

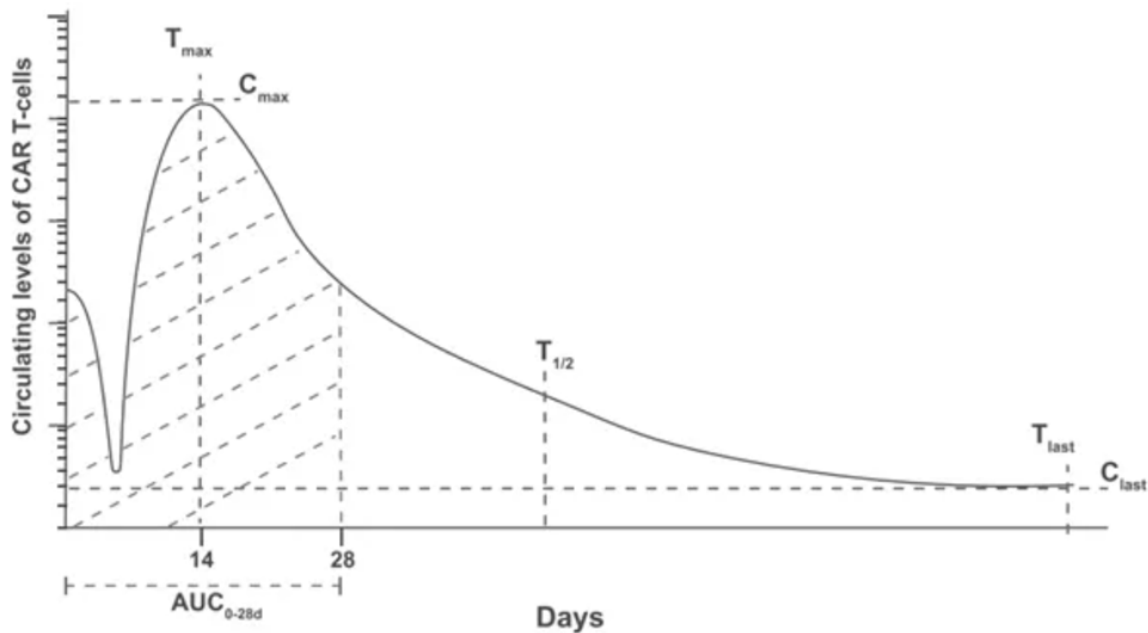
Channel  
Partner

# Agilent流式細胞分析儀檢測 CAR T藥物動力學的方法驗證

目前全球已有9款 CAR T 細胞治療產品上市用於治療B細胞腫瘤。不同於傳統藥物，CAR T 在靜脈注射給藥後會分佈到各個器官包括腫瘤組織，細胞濃度雖然會在短時間內下降，不過 CAR T 與腫瘤靶點結合後會被啟動並增生，CAR T 細胞數量往往在注射2周後達到頂峰，之後根據個體差異呈現不同程度的下降趨勢，有的患者會長期監測仍可觀察到一定數量的 CAR T 細胞，此與長期緩解病情有關。因此監測 CAR T 細胞在周邊血循環的藥物動力學 (Pharmacokinetics, PK) 對於臨床預後的判斷便至關重要。

目前實驗室常用的方法有 ddPCR, qPCR 以及流式細胞儀(FACS)等，ddPCR 和 qPCR 均是在監控基因拷貝數表現，而在醫院等實驗室很難獲得廠商販售的scFv序列，因此很難進行監測。FACS是目前實驗室最常用的檢測手段之一，不管是科研單位還是醫院FACS都是必需的的檢測儀器，因此利用此方法來監測 CAR T 細胞PK是最簡便且快速的方法，且同時可以進行免疫細胞分型以及T細胞功能檢測。

這篇文章中研究人員以 CD19 CAR 為例，驗證商業化抗體 Rabbit anti-mouse FMC63 單抗 R19M 檢測 CAR19 T 細胞的特異性、最低檢測限 LOD、最低定量線LLOQ以及精密度，同時通過大量臨床樣品驗證了FCM和ddPCR方法學的相關性和一致性（準確度），具體資訊已在表1和圖1中詳細闡明



**CAR T 細胞藥代動力學的一般規律：**FDA推薦推薦CAR T細胞相關PK參數包括：頂峰濃度 (C max) ；達峰時間 (T max) ；部分曲線下面積 (pAUC) ；最後觀測濃度 (T last) ；C last時間以及半衰期 (t 1/2) ；

**TABLE 1** FCM validation for CAR T cell detection

Parameters	Validation design	Calculation	Definition
Specificity	PB without CAR T cell ( $7 < S < 10$ )	/	The ability to generate a negative result for negative samples
Sensitivity LOD LLOQ	LOD: PB without CAR T cells ( $S = 15$ ); LLOQ: 293 FT cell line samples with different concentration of CAR19 positive 293FT cells (7 dilutions, performed in triplicates).	LOD: mean + 3 SD LLOQ: above the LOD, the lowest concentration where the CV is acceptable ( $CV < 30\%$ is acceptable)	The ability to correctly identify positive populations among a sample. LOD: the lowest amount of an analyte that can reliably be detected. LLOQ: the lowest amount of an analyte that can reliably be quantitated.
Accuracy <sup>a</sup>	Detect a sample with or without CAR19 T cells by both FCM and ddPCR ( $S = 188, 7^b$ )	Described by the Spearman correlation coefficient $r$ ( $r > 0.8$ is acceptable).	How close the detected value to the real true value
Precision Intra-assay Inter-assay	Intra-assay: triplicates for each sample ( $S = 7$ ); Inter-assay: three independent experiments, triplicates for each sample per experiment ( $S = 7$ ).	Intra-assay: calculated intra-CV for each sample and the precision is indicated by the mean of intra-CV and the range. Inter-assay: mark the mean for each sample in an experiment as M. For each sample, calculate the inter-CV from the three Ms. The precision is indicated by the mean of inter-CV and the range.	The reproducibility of a test Intra-assay: how close the results are when the same sample is repeated tested Inter-assay: the variation among different assay

Abbreviations: PB, peripheral blood; S, sample size.

<sup>a</sup>Due to the lack of acknowledged reference standards, true accuracy cannot be exactly determined. We intended to choose ddPCR as a “gold standard” method, and compare the consistency of the results between FCM and ddPCR. Of particular importance is that the results of ddPCR do not absolutely represent the true value.

<sup>b</sup>One hundred and eighty-eight pairs of clinical samples and seven pairs of 293FT cell line samples.

表1. 驗證設計方案以及資料統計評估

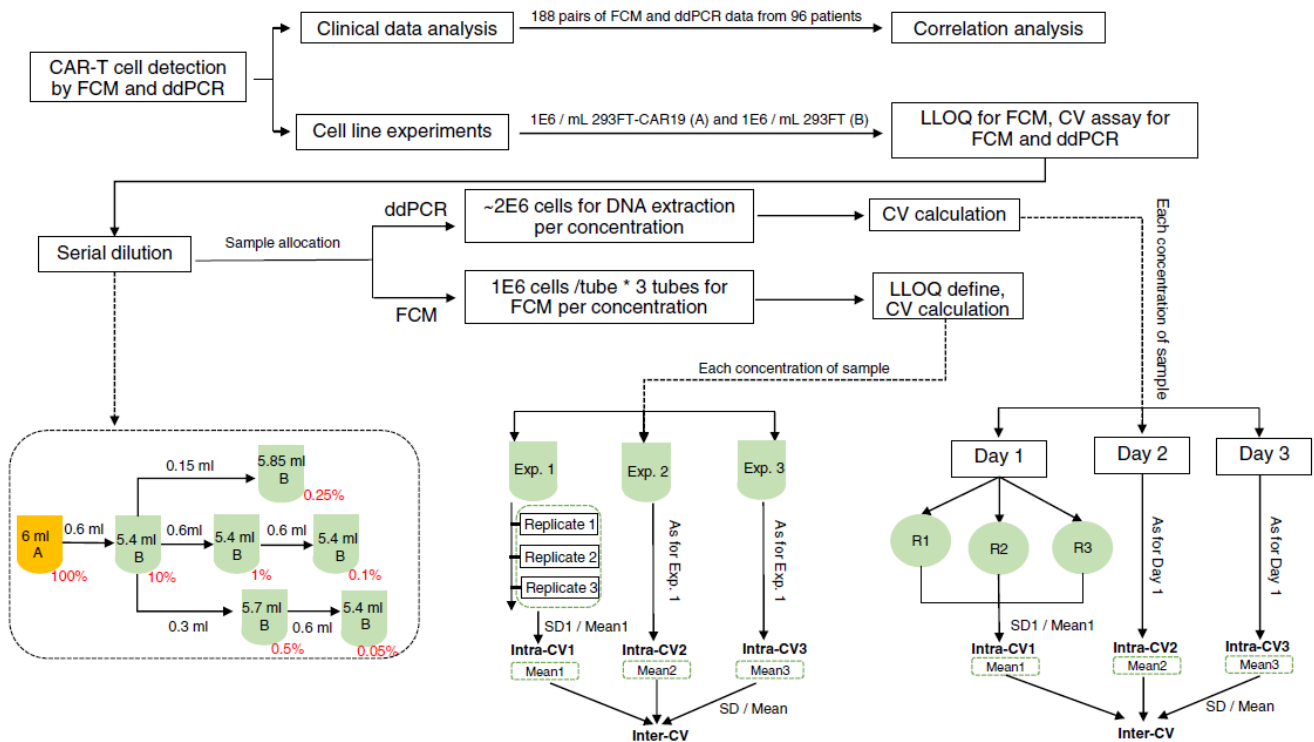


圖1. 整體驗證方案的工作流程圖

## 01 特異性

本研究中，對比了三種CAR檢測抗體 protein L、CD19 抗原蛋白以及抗CAR抗體R19M在周邊血樣本中的特異性，通過圖2結果可見 protein L 的特異性較抗原蛋白和R19M抗體差異，而重組抗原蛋白存在不穩定性，因此本研究選擇特異性和穩定性較好的R19M進行CAR T 藥代動力學的檢測。

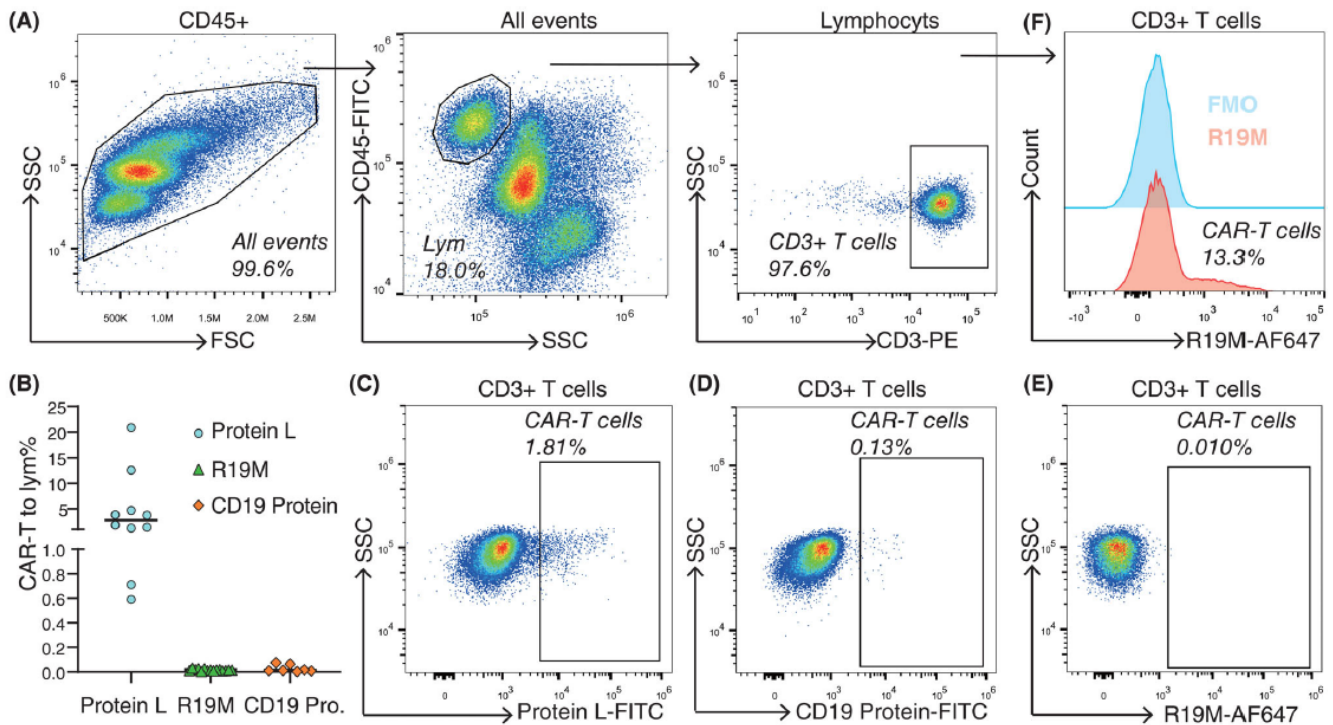


圖2. Agilent NovoCyte流式細胞儀進行gating以及抗體特異性驗證

## 02 靈敏度

流式細胞儀方法分析的靈敏度包括最低檢測限LOD也就是指信號值與背景值的區分能力，本研究中根據 15 份不含 CAR19 T 細胞的 周邊血樣本的FACS檢測結果計算出 LOD（即平均值加三倍 SD 值）。最終檢測出平均值為0.016%，而SD為0.00696%，因此LOD最終為0.03678%（圖2B）。

基於LOD值，利用wild-type 293FT細胞序列稀釋陽性對照細胞293FT-CAR19，將CAR陽性比例的最低理論值設置在0.05%。根據圖3結果，7個稀釋梯度的檢測值與理論值線性相關  $R^2=0.9999$ 。且在最低稀釋比例組中，9個樣品的平均檢測值為0.048%，intra-CV為10.8%，inter-CV為2.0%。結果表明，當採集足夠多的細胞時，透過R19M 抗體FACS檢測 CAR19 陽性細胞的的 LLOQ 設為 0.05% 是安全的。

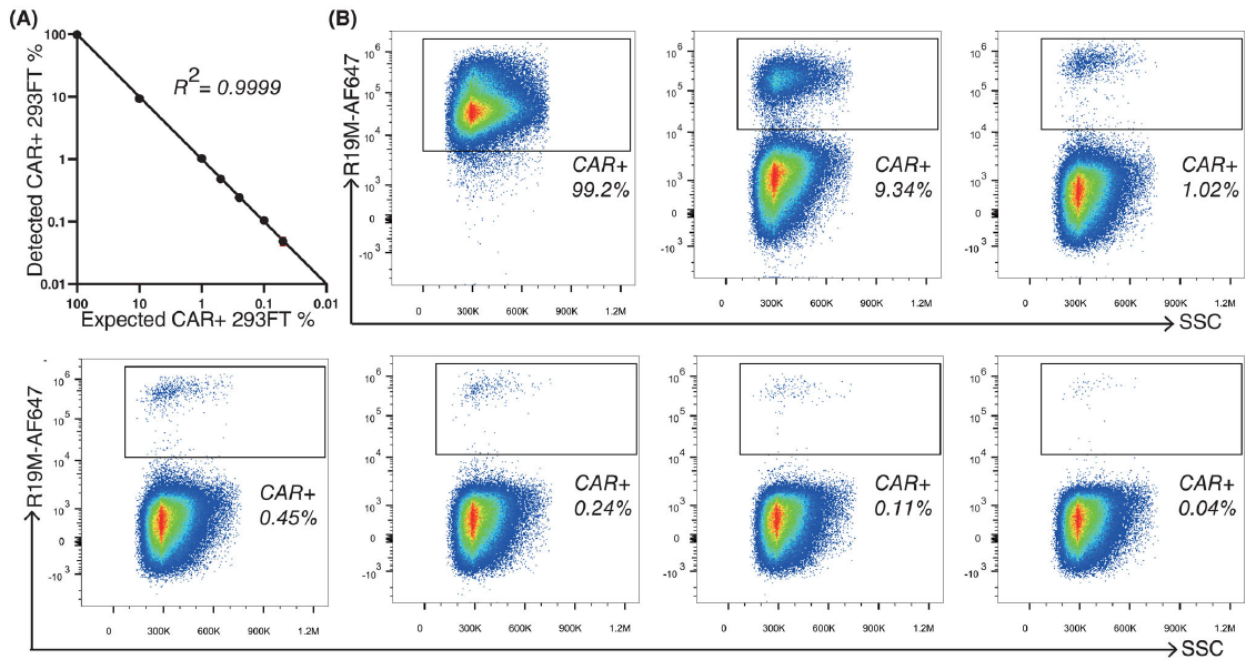


圖3. Agilent NovoCyte 流式細胞儀進行序列稀釋293FT-CAR19細胞的線性檢測結果

### 03 準確度

本研究中通過ddPCR的方法來驗證準確度，並在兩種來源的陽性樣品（293FT-CAR19 細胞株和188份 CAR19 T 細胞治療後的臨床周邊血樣本）進行了 FACS 和 ddPCR 的平行比較。根據檢測結果分析 CAR T/Lym 和 copies/ug DNA 的相關性，在陽性細胞系上的結果表明二者的 Spearman correlation 係數為1（圖4A），呈完全相關。而在臨床樣本資料中，188個樣本的相關係數為0.6875呈強相關。

研究者發現在 CAR T/Lym<0.5%的樣品中，FACS 和 ddPCR 資料呈弱相關（ $r=0.3577$ ）。當只分析 CAR T/Lym $\geq$ 0.5%的樣品，發現相關係數增加到了0.814，呈極強相關性。這些資料共同表明在臨床檢測中，ddPCR 和 FACS 在監測 CAR19 T 細胞藥代動力學方面具有相對較好的一致性，同步證明了 FACS 作為臨床上 CAR T 細胞PK檢測方法的準確性。

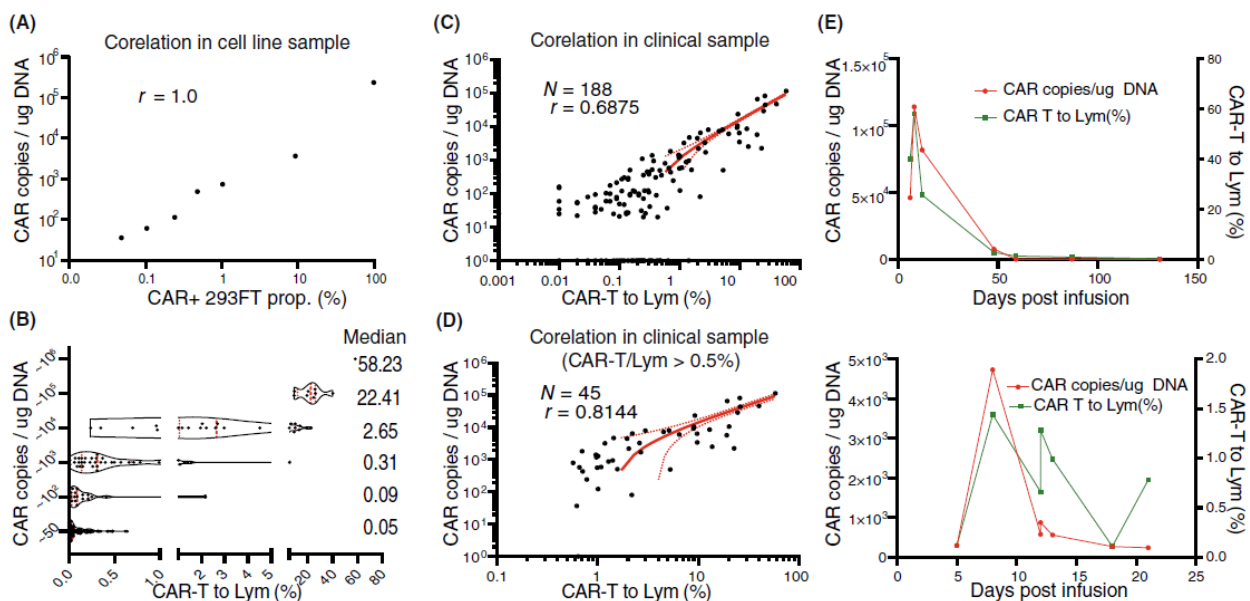


圖4. FACS和ddPCR檢測結果的相關性研究結果

## 04 精密度

使用 CAR19 陽性的 293FT 細胞株通過序列稀釋製備了標準樣本。每個樣本在三個獨立實驗中進行處理和檢測，每個實驗有三重複，並測定FACS和ddPCR兩種方法的 inter-CV和 intra-CV 值。結果顯示所有結果中CV均不超過18%，表明兩種方法都能精確定量CAR19陽性細胞。然而發現兩種方法的CV在CAR19表現下降時均會升高，表明兩種方法在定量低表現的CAR19時精密度都會下降。

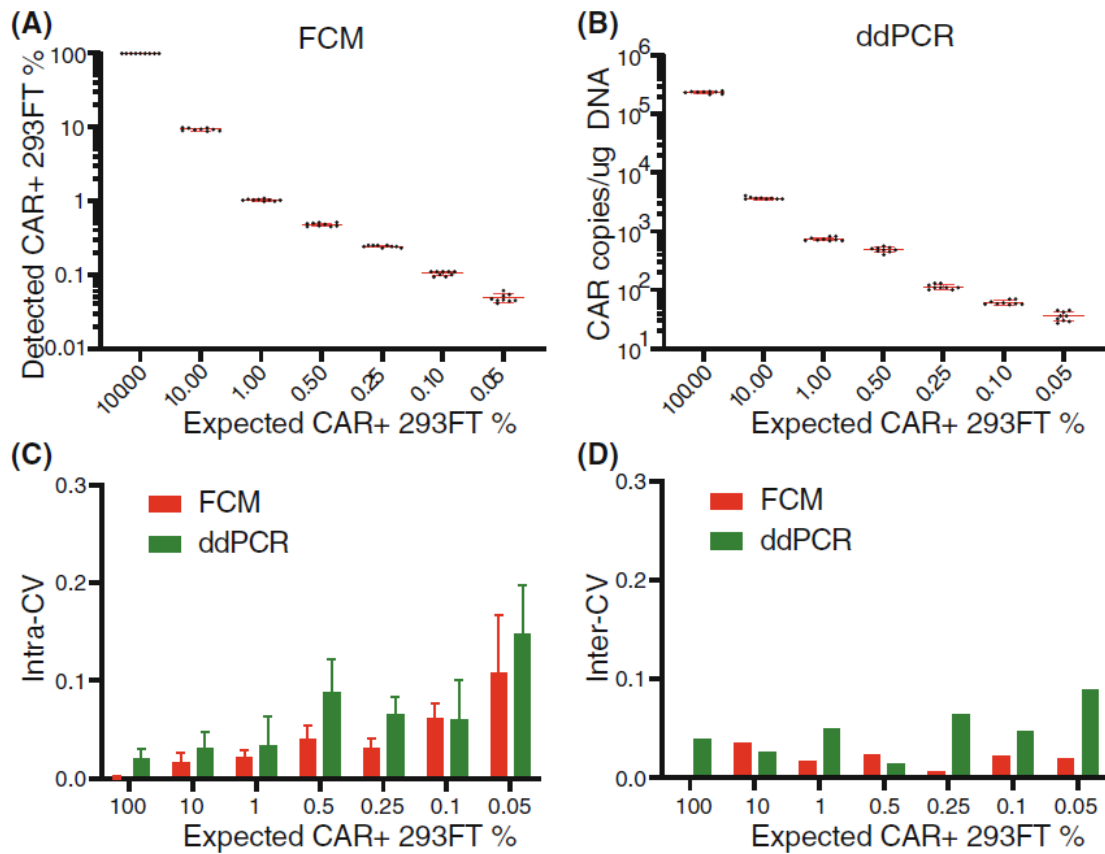


圖5. FACS和ddPCR的精密度對比研究結果

## 05 總結

應用 FACS 檢測和定量人體內CAR19 T 細胞是一種可靠的方法，與 ddPCR 皆具有良好的一致性。在檢測 CAR T 細胞表現較低的樣本時，ddPCR 和 FACS 的精確度都有所下降，導致兩種技術的一致性降低。因此，同時採用ddPCR 和 FACS 兩種方法檢測 CAR T 細胞可為體內 CAR T 細胞動力學提供更可靠的結果。

本研究中FACS採用的是 [安捷倫Novocyte系列智慧化流式細胞儀](#)，Novocyte系列流式細胞儀配備頂級的核心硬體，保證儀器的性能與靈敏度。可提供至多達 5 個雷射和最多 30 個螢光通道的靈活選擇。軟體做到採集與分析為一體，同時內置多種資料分析模組。搭配自動化上樣系統NovoSampler Q，可整合到不同的實驗室自動化平臺中，滿足tube、eppenforff以及多種plate等。Novocyte系列流式細胞儀一直以來以其卓越的性能、高靈敏度以及操作簡便而深受客戶的喜愛。

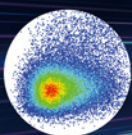


### 參考文獻

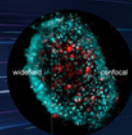
1. Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Products Draft Guidance for Industry. U.S. FDA. <https://www.fda.gov/media/156896/download>
2. Cheng, J, Mao, X, Chen, C, Long, X, Chen, L, Zhou, J, et al. Monitoring anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell population by flow cytometry and its consistency with digital droplet polymerase chainreaction. *Cytometry*. 2023; 103(1): 1626. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24676>
3. Sarikonda, G., Mathieu, M., Natalia, M., Pahuja, A., Xue, Q., Pierog, P. L., Trampont, P. C., Decman, V., Reynolds, S., Hanafi, L. A., Sun, Y. S., Eck, S., Hedrick, M. N., Stewart, J. J., Tangri, S., Litwin, V., & Dakappagari, N. (2021). Best practices for the development, analytical validation and clinical implementation of flow cytometric methods for chimeric antigen receptor T cell analyses. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 100(1), 79–91. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21985>
4. Dasyam N, George P, Weinkove R. Chimeric antigen receptor T-cell therapies: Optimising the dose. *Br J Clin Pharmacol*. 2020 Sep;86(9):1678-1689. doi: 10.1111/bcp.14281. Epub 2020 Mar 24.

## THE FUTURE LAB | FUTURE CMC

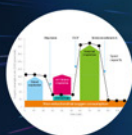
進階與您一同邁入新未來



Multi-color  
Flow



Confocal  
Live Image



Energy  
Metabolism



Bioreactor



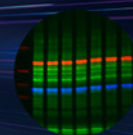
Organ Chip



Digital PCR



Multiplex  
Assay



IP Western



進階生物科技股份有限公司

台北總公司 02-26959935

免付費專線 0800251302

傳真 02-26958373

[www.level.com.tw](http://www.level.com.tw)



進階官網



FB粉絲團