

CTD 第 2 部

2.4 非臨床試験の概括評価

ブリストル・マイヤーズ株式会社

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ADA	anti drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ANA	antinuclear antibodies	抗核抗体
APC	antigen-presenting cells	抗原提示細胞
AUC	area under the concentration vs. time curve	血漿又は血清中濃度曲線下面積
AUC(0-T)	area under the concentration vs time curve from 0 to time of the last measured concentration	投与後 0 時間から最終定量可能時間までの血中濃度時間曲線下面積
AUC(INF)	area under the concentration vs time curve from time zero extrapolated to infinite time	投与後 0 時間から無限時間まで外挿した血中濃度曲線下面積
BMS	Bristol-Myers Squibb	ブリistol・マイヤーズ スクイブ社
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CHMP	Committee for Medical Products for Human Use	欧州医薬品委員会
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CLT	total clearance	総クリアランス
Cmax	maximum concentration	最高血中濃度
CTL	cytotoxic T lymphocyte	細胞傷害性 T 細胞
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4	細胞傷害性 T 細胞抗原 4
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DNP	2,4-dinitrophenyl	2,4-ジニトロフェニル
DTH	delayed-T type hypersensitivity	遅延型過敏
DTIC	dacarbazine	ダカルバジン
DTPA	diethylene triamine pentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
EC ₅₀	concentration required to induce a 50% effect	50%有効濃度
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定
ePPND	enhanced and post natal development study	拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験
EU	European Union	欧州連合
Fab	the region constituting the variable or target binding regions of an antibody	抗体の可変部位又は標的結合部位
Fc	the region constituting the constant (non-target binding) region of an antibody	抗体の定常部位
FcR	Fc receptor	Fc 受容体
FcRn	neonatal Fc receptor	新生児型 Fc 受容体
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FoxP3	a member of the forkhead box transcription factor family	フォークヘッドボックス転写因子ファミリーメンバー
GALT	gut associated lymphatic tissue	腸管系リンパ組織
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
HBsAg	hepatitis virus B surface antigen	B 型肝炎ウイルス表面抗原
HIV	human immunodeficiency virus	ヒト免疫不全ウイルス
HLA-DR	human leukocyte antigen DR-1	ヒト白血球型抗原 DR-1
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン

略号	英語	日本語
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
irAE	immune-related adverse event	免疫関連有害事象
KD	dissociation constant	解離定数
KLH	keyhole-limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
Koff	dissociation rate	解離速度
Kon	association rate	結合速度
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MRT	mean residence time	平均滞留時間
N/A	not applicable	該当なし
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no-observable-adverse-effect level	無毒性量
OD	optical density	光学密度
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PD-1	programmed cell death-1 (CD279)	－
PK	pharmacokinetics	薬物動態
QC	quality control	品質管理
SI	peak stimulation index	最大刺激指数
SIV	simian immunodeficiency virus	サル免疫不全ウイルス
SK-mel	a human melanoma cell line	ヒト悪性黒色腫細胞株
STM	standard test method	標準試験法
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TCR	T cell receptor	T細胞受容体
TDAR	T cell dependent antibody response	T細胞依存性抗体反応
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
Treg	regulatory T cells	制御性 T 細胞
Vss	steady-state volume of distribution	定常状態分布容積

Table of Contents

1	非臨床試験計画概略.....	6
2	薬理試験.....	7
2.1	効力を裏付ける試験.....	7
2.2	作用機序.....	9
2.3	副次的薬理試験.....	12
2.4	安全性薬理試験.....	12
2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	12
3	薬物動態試験.....	14
3.1	分析法	14
3.1.1	血漿中及び血清中 Ipilimumab 濃度測定法.....	14
3.1.2	ADA 測定法.....	14
3.2	薬物動態及びトキシコキネティクス.....	15
3.3	吸収及びバイオアベイラビリティ	17
3.4	分布	17
3.5	代謝	18
3.6	排泄	18
3.7	薬物動態学的薬物相互作用.....	18
4	非臨床毒性試験.....	18
4.1	単回投与毒性試験.....	20
4.2	反復投与毒性試験.....	21
4.3	遺伝毒性試験.....	26
4.4	がん原性試験.....	26
4.5	生殖発生毒性試験.....	26
4.6	局所刺激性.....	27
4.7	その他の毒性試験.....	27
4.7.1	抗原性／免疫原生.....	27
4.7.2	免疫毒性試験.....	28
4.7.3	依存性	29
4.7.4	代謝物の毒性試験.....	29
4.7.5	不純物及び原薬関連分子種の安全性評価.....	29

4.7.6	<i>In vitro</i> 細胞増殖及びサイトカイン放出評価.....	29
4.7.7	併用投与毒性試験.....	30
4.7.8	異なる製造工程による原薬（製剤）の比較試験.....	31
4.7.9	組織交差反応性.....	31
4.7.10	新添加物の安全性評価.....	32
5	総括及び結論.....	33
6	参考文献.....	37

List of Tables

表 4-1:	非臨床毒性試験一覧.....	19
表 4.2-1:	サル及びヒトにおける Ipilimumab の曝露量比較	21
表 4.2-2:	表面プラズモン共鳴による Ipilimumab とヒト及びカニクイザル CTLA-4 の結合	24

1 非臨床試験計画概略

Ipilimumab (MDX-010、BMS-734016) は、細胞傷害性 T 細胞抗原 4 (CTLA-4) に選択的な免疫グロブリン (Ig) G サブクラス 1 (κ 軽鎖) の完全ヒト型モノクローナル抗体 (mAb) であり、がん治療の目的で開発されている CTLA-4 免疫チェックポイント阻害薬である。Ipilimumab の作用機序は、活性化した T 細胞サブセットに発現する CTLA-4 とプロフェッショナル抗原提示細胞上の B7 (CD80/CD86) 分子との相互作用の阻害と考えられている。その結果、Ipilimumab は活性化 T 細胞の抑制的調節を遮断し、腫瘍抗原特異的な T 細胞を増殖及び活性化させ、腫瘍増殖を抑制する。また、CTLA-4 の阻害は、制御性 T 細胞 (Treg) の機能を低下させ、腫瘍免疫反応を亢進させる。更に、Ipilimumab は、腫瘍組織における Treg 数を選択的に減少させ、その結果、腫瘍内の活性化 T 細胞数と Treg 数の比 (エフェクター T 細胞/Treg) が増加して腫瘍細胞死を誘導すると考えられる。

Ipilimumab はヒト及びカニクイザルの CTLA-4 に高い親和性を有し (K_D 値はそれぞれ 2.69~10.4 nM 及び 8.24~20.1 nM)、また、*in vitro* 試験においてヒト CTLA-4 に対する B7.1 (CD80) 及び B7.2 (CD86) の結合を EC_{50} 値約 0.2 μ g/mL で阻害した。Ipilimumab は *in vitro* において補体依存性細胞傷害 (CDC) を誘導しなかったが、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) の可能性を検討した *in vitro* 試験において IgG Fc 受容体 (Fc γ R) IIA 及び Fc γ RIII と比べて Fc γ RI に強力に結合し、本薬の標的である CTLA-4 発現細胞に対して ADCC を引き起こす可能性を示した。*In vitro* 条件下では、Ipilimumab は一貫性のない ADCC を示したが、*in vivo* の非臨床試験及び臨床試験では末梢血 T 細胞に ADCC は認められなかった。また、6 例の膀胱癌患者に Ipilimumab を 3 mg/kg で投与した臨床試験において、2 回目投与の 4 週間後に腫瘍内の Treg 数が Ipilimumab を投与していない患者と比較して有意に減少したことから、Ipilimumab は腫瘍組織の Treg 数を選択的に減少させると考えられた。

Ipilimumab の臨床試験は、本申請の適応症である進行期悪性黒色腫を含む複数の種類のがんで実施されている。進行期悪性黒色腫の患者に対する臨床推奨用量は、1 回量 3 mg/kg の 90 分間点滴静注を 3 週間間隔で 4 回投与である。

本概括評価では、Ipilimumab の薬理、薬物動態 (PK)、トキシコキネティクス (TK) 及び毒性試験の概略を記載する。Ipilimumab の非臨床試験で認められた所見は、他の標的特異的な蛋白質医薬品で報告されている所見と適宜比較した。また、他の免疫調節薬 (BMS-663513 と MDX-1106) を併用した場合はそれらの結果と比較した。

Ipilimumab の作用機序について、サイトカイン産生や T 細胞依存性抗体産生などの T 細胞機能の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理学的モデルを用いて評価した。また、ヒト CTLA-4 を発現したトランスジェニックマウスの大腸癌モデルを用いた評価も実施した。

Ipilimumab の毒性については、薬理活性を示すカニクイザルを用いて毒性試験を実施し、予定臨床用量及び用法 (3 mg/kg を 3 週間に 1 回計 4 回静脈内投与) の 10 倍 (30 mg/kg) 及び 7 倍 (3 日に 1 回投与) まで評価した。Ipilimumab はげっ歯類に対して交差反応性を有さないため、げっ歯類を用いた毒性評価は実施しなかった。なお、重要な試験はいずれも医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) 適合下で日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドラインに準拠して実施した。

毒性試験の最長投与期間は ICH S6 ガイドラインの推奨に従い 6 ヶ月間とした。すべての重要な試験は、試験の実施時点で総合的な分析評価及び PK プロファイルに基づき臨床製剤と同等である製剤を用いて実施した。プロセス B [] は、79 日間比較試験 (-1416-128 試験) でプロセス A () と毒性学的及び薬物動態学的に同等であることが示され、サル 1 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験 (DS06064 試験) で評価した。また、プロセス C () を高め、 と を最大化するために開発された製造方法) とプロセス B はサル単回静脈内投与薬物動態比較試験 (DS07167 試験) において毒性学的及び薬物動態学的に同等であることが示された。更に、予定市販製剤に用いられるプロセス C.1 () 及び () をより確実に除去するため、プロセス C の () のひとつを変更した製造工程) は、生物学的特性の分析結果からプロセス C による Ipilimumab との生物活性の同等性が示されたため、プロセス C からプロセス C.1 へのブリッジング試験を実施する必要はないと判断した。

ヒトの薬物動態試験のみならず、非臨床毒性試験の結果を裏付けるため、血漿中又は血清中の Ipilimumab 及び抗 Ipilimumab 抗体 (ADA) の高感度かつ特異的酵素免疫吸着測定 (ELISA) 法が開発された。1 ヶ月間間歇投与毒性試験及び 3 ヶ月間 (79 日間) 間歇投与毒性・有効性試験における Ipilimumab のトキシコキネティクス (TK) は GLP に準拠して検討された。開発初期の試験で用いた分析法のバリデーションは実施されなかったが、開発後期の試験で用いた分析法は、生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイダンス¹ (以下、BMV ガイダンスとする) に準拠するため並びに分析性能を高めるため様々な改良が施され、また、バリデーションが実施された。

2 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

抗原特異的 T 細胞反応の生成と維持には複数の刺激性及び抑制性シグナルが必要である。一方、CD28 又は CTLA-4 とそれらのリガンドである B7.1 及び B7.2 との相互作用は、T 細胞活性化と免疫寛容の重要な段階として知られている。ナイーブ T 細胞の活性化は、抗原提示細胞 (APC) の細胞表面上において主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子の溝に提示される抗原ペプチドによる T 細胞受容体 (TCR) の刺激を必要とする。ナイーブ T 細胞上に発現した CD28 と APC 上の B7.1 又は B7.2 分子との結合によって伝達される共刺激シグナルは、抗原特異的 T 細胞の増殖及びサイトカインの産生をもたらす²。初回抗原刺激を受けた T 細胞は、T 細胞の活性化を制限及び調整する機構として CTLA-4 を発現させる。CTLA-4 は CD28 と競合し、より高い親和性で B7.1 及び B7.2 と結合する。CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 との相互作用は、T 細胞増殖及びサイトカイン (主に IL-2) 産生の阻害をもたらす複数の細胞内シグナルを誘導する²。腫瘍特異的 T 細胞の腫瘍増殖抑制での役割及び CTLA-4 の T 細胞反応阻害における重要な役割から、CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 との相互作用を阻害する薬剤は、抗腫瘍免疫反応を増強させる可能性が考えられた。このことは、抗 CTLA-4 抗体がマウス腫瘍モデルにおいて、単剤療法又は他の療法との併用で腫瘍増殖の著明な阻害や腫瘍を消失させることにより確認された。CTLA-4 とリガンドとの相互作用の阻害は、細菌³、寄生虫⁴ に対する宿主反応も増強させ、また、*in vitro* における HIV 感染 T 細胞におけるウイルスの増殖も抑制した⁵。

Ipilimumab は、CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 との相互作用を阻害する作用を有するヒト CTLA-4 に特異的なヒト免疫グロブリンであり、抗原特異的 T 細胞に対する抑制性の調節シグナル伝達を阻害する。CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 との結合を阻害することにより、B7.1 及び B7.2 は CD28 との相互作用が可能となり T 細胞に共刺激シグナルを提供する。CTLA-4 は、活性化されたエフェクター T 細胞上での発現

に加えて、CD4+CD25+FoxP3+マーカーを発現しているTregのおよそ 50%において、その細胞表面上に恒常的に発現する。TregにおけるCTLA-4 の機能的役割が複数の論文で報告されている^{6,7,8}。Treg上のCTLA-4を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを用いた試験において、Tregを介する免疫抑制におけるCTLA-4の役割が明らかにされている⁶。これらのマウスはCTLA-4 ノックアウトマウスと類似した致死性自己免疫リンパ球増殖性症候群を発症することから、Tregの機能におけるCTLA-4 の重要な役割が裏付けられた。大腸炎モデルの試験では、CTLA-4 のシグナル伝達を阻害することによりTregの抑制性機能を無効にした⁷。ヒトにおいて、CD4+CD25+CTLA-4+の表現型を有するTregは、CD4+CD25+CTLA-4- Tregと比較してより強力な抑制活性を示した⁸。

これらのCTLA-4 の欠損による研究はCTLA-4 阻害薬の有効性を裏付けるのに有益であるが、モノクローナル抗体によるCTLA-4 阻害とは異なる結果を生じる可能性がある。また、これらの研究は、抗腫瘍免疫反応におけるエフェクターT細胞上又はTreg上のCTLA-4 阻害による免疫調節作用については検討していない。CTLA-4 を阻害するmAbの抗腫瘍活性がエフェクターT細胞上のCTLA-4 に対するものか、あるいはTreg上のCTLA-4 に対するものかを解明するため、ヒトCTLA-4 を発現するエフェクターT細胞、Treg又はそれら両方の細胞を有する免疫不全マウスを用いてB16/BL6 悪性黒色腫モデルにおける試験を実施した⁹。その結果、エフェクターT細胞上のCTLA-4 のみを阻害した場合には、著明な抗腫瘍活性（腫瘍増殖の遅延及び 40%のマウスで腫瘍消失）が認められたが、Treg上のCTLA-4 のみを阻害した場合には腫瘍増殖に変化はみられなかった。また、両細胞上のCTLA-4 を遮断した場合には最大抗腫瘍活性（73%のマウスで腫瘍消失）が認められた。

Ipilimumabを 1～9 mg/kgの用量で投与した臨床試験では、免疫関連有害事象（irAE）を発現した患者において、投与 3 週間後に測定した末梢血Tregの発現頻度や機能に変化はみられなかった¹⁰。同様に、サルを用いた 3 ヶ月間間歇投与毒性試験において、Ipilimumab (10 mg/kg) 投与後のCD4+CD25+CTLA-4+ T細胞の発現頻度に変化は認められなかった。しかし、1 回目以降の投与の約 2 週間後に、メモリーT細胞（CD3+CD45RO+、CD3+CD45RA-又はCD4+CD28+CD95+）の発現頻度が一貫して増加した。反対に、がん患者にIpilimumab（3 mg/kg）を投与した臨床試験の 1 試験では、投与後初期の 3 日間において末梢血Treg量の減少が認められたが、Day 28 までには投与前のレベル以上に回復した¹¹。しかし、本臨床試験ではIpilimumabのTreg機能に及ぼす影響や腫瘍の微小環境におけるTreg数の調節作用は検討していない。臨床データでは明らかでなかったが、非臨床薬理試験の結果からエフェクターT細胞上のCTLA-4 阻害が腫瘍特異的免疫反応の発現に重要であること、また、エフェクターT細胞とTregs上のCTLA-4 の同時阻害により最大抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった⁹。

近年、抗CTLA-4 抗体による腫瘍組織内のT細胞数比（エフェクターT細胞／Treg）の増加と抗腫瘍効果との関連が報告されている。マウス悪性黒色腫モデルやマウス大腸癌モデルにおいて、FcγRとの結合能を有する抗マウスCTLA-4 抗体は、腫瘍の微小環境でFcγRを発現するマクロファージの作用を介して腫瘍内のTregを減少させる。その結果、エフェクターT細胞／Treg比が増加し、抗腫瘍効果を発現させることが報告されている。また、腫瘍内のTregにおけるCTLA-4 発現は、末梢血のTregや腫瘍内のCD4+及びCD8+T細胞と比較して、顕著に高いことから、抗CTLA-4 抗体により腫瘍内のTregが選択的に減少することも示された^{12,13}。また、膀胱癌患者（n = 6）にIpilimumabを 3 mg/kgで投与した臨床試験において 2 回目投与の 4 週間後にIpilimumabを投与していない患者と比較して腫瘍におけるTreg数の有意な減少が認められ、Ipilimumabは腫瘍中のTreg数を減少させると考えられた¹⁴。

2.2 作用機序

Ipilimumab はヒト CTLA-4 に高い親和性 (K_D 値 2.69~10.4 nM) で結合するヒト免疫グロブリン G1 (IgG1) である。Ipilimumab はヒト CTLA-4 発現細胞に EC_{50} 値 190 ng/mL で結合し、1~10 μ g/mL で結合の飽和を示した。Ipilimumab は *in vitro* において、B7.1 及び B7.2 の CTLA-4 への結合を EC_{50} 値 約 0.2 μ g/mL で阻害し、B7.1 及び B7.2 に対する最大阻害濃度はそれぞれ 6~20 μ g/mL 及び 1~3 μ g/mL であった。これらの *in vitro* 試験の結果は、Ipilimumab が有効な免疫調節薬として良好な結合親和性と阻害特性を有することを示している。

Ipilimumab は IgG1 mAb であることから、補体を活性化し、Fc 受容体 (FcR) と結合する可能性がある。補体依存性細胞傷害 (CDC) 試験において、Ipilimumab は 50 μ g/mL までの濃度では CTLA-4 発現細胞に細胞毒性を示さなかった。免疫グロブリンの定常領域 (Fc) と、単球、ナチュラルキラー (NK) 細胞及び他の単球系細胞上に発現した FcR との結合は、抗体が結合した細胞を減少させるエフェクター機能を介在する。予想されたように、Ipilimumab は Fc γ RIIA 及び Fc γ RIII と比べて Fc γ RI に対してより高い親和性で結合した (EC_{50} =0.27 μ g/mL)。Fc γ RIIA 及び Fc γ RIII への結合親和性は軽微から低度 (およそ 40%有効濃度= 800 μ g/mL) であったことから、本薬がヒトで予測される最高血清中濃度 (10 mg/kg 投与時で約 220 μ g/mL) では ADCC を発現させる可能性は低いことが示唆された。

Fc γ R の活性化を介した細胞毒性を評価するため、複数の提供者から入手した CTLA-4 の発現程度の異なる活性化 T 細胞を用いた試験を実施した。CTLA-4 は CD4+CD25+ Treg 細胞にも発現するが、本細胞の細胞毒性については、*in vitro* での解析に必要な十分な細胞数の入手が困難であったため検討しなかった。これらの活性化 T 細胞を用いた試験では、T 細胞を抗 CD3 及び抗 CD28 抗体で活性化した。これらの抗体により活性化された T 細胞の CTLA-4 発現は、*in vivo* での抗原刺激によって活性化された T 細胞の CTLA-4 発現より多いと考えられるが、ADCC 作用を評価しやすいことから両抗体で活性化し CTLA-4 を多く含む T 細胞を試験材料として用いた。以上の *in vitro* の ADCC 試験から、*in vitro* の条件下では、Ipilimumab による ADCC 作用には一貫性がないことが示された。

ADCCの機序解明の研究から、ADCCの反応の強度は、抗体の親和性及び標的細胞上に発現する抗原密度に依存することが示されている^{15,16,17}。また、IgG1 分子のフコシル化又はシアリル化はFcRに対する親和性を変化させ、その活性化機能を増強あるいは減弱させる^{18,19}。更に、内因性IgGとの競合などの他の要因も抗体製剤のADCC誘発能に影響を及ぼす²⁰。このように、ADCCに関する*in vitro*試験の結果から、*in vivo*におけるIgG Fcを介したADCC作用の可能性を示唆する情報が得られる。しかし、*in vitro*試験の*in vivo*への関連性は不確実であり、抗体製剤がエフェクター機能を誘導する可能性を*in vivo*試験において評価した。

*In vitro*試験とは対照的に、*in vivo*の非臨床試験及び探索的臨床試験 (CA184004 試験) におけるIpilimumabの反復投与は、末梢血のT細胞数又はT細胞サブセット数を減少させなかった。カニクイザルにおけるIpilimumabの反復投与では、末梢血の活性化T細胞 (CD25 又はHLA-DRの発現により検出した) の割合に大きな変化はみられず、メモリーT細胞 (CD3+CD45RO+, CD3+CD45RA-及びCD4+CD28+CD95+) 数の持続した増加が認められた。作用機序に合致し、臨床試験ではIpilimumab投与により活性化T細胞 (CD4+及びCD8+コンパートメント中のHLA-DR+) 及びメモリーT細胞 (CD45RO+) の割合が増加した^{10,21,22}。別の臨床試験ではIpilimumabの投与後 3 日以内に末梢血のCD4+CD25+CD62L+ Tregの割合が一過性に減少したが、Treg数はIpilimumab投与後 3 日目以降に回復

し、Ipilimumab存在下であってもDay 28までに投与前値を上回る量に達した¹¹。これらの臨床試験におけるフェノタイピングの結果、Ipilimumabは末梢血のCD4+CD25+ T細胞（Treg）の割合に軽微な影響を及ぼすことが示された^{10,11,21}。また、Ipilimumabは末梢血Tregの抑制活性を阻害せず、Treg内に高発現する転写因子であるFoxP3の発現を変化させなかった¹⁰。このように、非臨床及び臨床データのいずれにおいてもIpilimumabによる血中T細胞サブセットの減少は認められなかった。しかし、Tregに関しては腫瘍中のTreg数の有意な減少が膀胱癌患者による臨床試験で認められた¹⁴。

In vivo 試験での活性評価が可能な動物種を特定するため、様々な動物種のCTLA-4とIpilimumabとの交差反応性を検討した。その結果、IpilimumabはカンクイザルのCTLA-4に高い親和性で結合したが、マウス、ラット及びウサギのCTLA-4とは結合しなかった。BIAcoreシステムを用いた表面プラズモン共鳴によるカンクイザルの組換えCTLA-4への結合及び活性化T細胞への結合試験の結果より、非臨床薬理及び毒性試験に用いる動物種としてカンクイザルが選択された。

マウスCTLA-4との交差反応性の欠如により、マウス腫瘍モデルを用いた薬効薬理試験でのIpilimumabの評価が不可能であった。この問題を回避するため、ヒトCTLA-4を発現し、マウスCTLA-4を発現しないトランスジェニックマウスを作製した。導入されたヒトCTLA-4遺伝子は、内因性のマウスCTLA-4プロモーターによって発現の調節を受け、T細胞上に特異的に発現する。マウスCTLA-4ノックアウトマウスで生じる致死性リンパ増殖性状態は、ヒトCTLA-4を発現させることにより改善した。Ipilimumabの抗腫瘍活性を評価するため、低免疫原性の大腸癌細胞株MC38をヒトCTLA-4トランスジェニックマウスに移植した。腫瘍細胞移植日にIpilimumabの投与を開始し、10 mg/kgで3日又は4日に1回、計4～5回反復投与した。Ipilimumabの反復投与により、腫瘍増殖の完全阻害（投与終了後、約40日間持続）又は非結合性抗体の対照群と比較して著明な遅延が認められた。しかし、Ipilimumabを10 mg/kgで3日に1回、計3回投与した場合には、抗腫瘍活性は認められなかった。Ipilimumabは抗腫瘍免疫反応が増幅する期間のみに効果を有することから、腫瘍移植後の早期にIpilimumabの投与を終了した場合は、抗腫瘍免疫反応が発動しておらず抗腫瘍活性が観察されない可能性が考えられる。これらの試験ではこの可能性について検証されていない。しかし、Ipilimumabのより長い日数の投与に対し、短期の投与では抗腫瘍活性が認められなかったことは、本剤の追加投与により抗腫瘍反応が増強することを示唆している。以上のヒトCTLA-4トランスジェニックマウスに低免疫原性のMC38腫瘍を移植した試験より、Ipilimumabが腫瘍に対し有効で長期間持続する抗腫瘍活性を引き起こすことが明らかとなった。

マウス腫瘍モデルで示された抗腫瘍活性に加えて、カンクイザルにおいてもIpilimumabは数種のT細胞依存性抗原に対する抗体反応を増強した。これらの試験は非臨床毒性試験の一部として実施した。これらの試験を実施した目的は、CD4+及びCD8+ T細胞に対するT細胞反応の制御におけるCTLA-4の役割に基づいている。T細胞依存性抗原に対する抗体産生がCD4+ T細胞の援助を必要とすることはよく知られている。したがって、IpilimumabによるCTLA-4阻害が、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）及びキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）のようなT細胞依存性抗原並びに悪性黒色腫細胞ワクチン（SK-mel）に対する抗体反応を増強する可能性を静脈内投与試験で検討した。また、これらのうちの1試験では、DNP（2,4-dinitrophenyl）-Ficoll（T細胞非依存性抗原）を感作抗原の一つとして用いたが、本抗原は測定可能な液性免疫反応を引き起こさず、Ipilimumabの免疫反応増強作用はみられなかった。

Ipilimumab は HBsAg、KLH 及び SK-mel に対する抗体反応を増強させた。抗体反応の有意な増強は、主として Ipilimumab 10 mg/kg を約 4 週間間隔で 2～4 回投与した後に認められた ($p < 0.05$)。Ipilimumab 投与群と対照群との間に統計学的有意差がみられなかった試験でも ($p > 0.05$)、Ipilimumab 投与群の抗原に対する抗体価が対照群に比べて高かった。

Ipilimumab の臨床投与経路は静脈内であることから、薬理試験及び毒性試験では Ipilimumab を静脈内投与した。HBsAg 及び SK-mel と併用投与した試験では、Ipilimumab を 4 週毎に静脈内投与し、抗原は Ipilimumab と同時若しくは免疫反応中の血清 Ipilimumab 濃度が高くなるように、Ipilimumab 投与の 1 日後に投与した。また、1 試験で Ipilimumab 1 mg/kg の週 1 回投与と、0.1、1 及び 10 mg/kg の月 1 回投与を比較した。HBsAg 及び SK-mel に対する抗体反応は全投与群で変動が大きかったが、Ipilimumab 10 mg/kg の月 1 回投与でより強かった。しかし、10 mg/kg の用量は月 1 回投与スケジュールでしか評価していないことから、最適な抗体反応は他の投与間隔又は投与用量であった可能性も考えられる。

プロセス A () 及びプロセス B () によりそれぞれ製造された Ipilimumab の薬理活性を同用量 (10 mg/kg) で比較した。これらのプロセスで製造された Ipilimumab の試験抗原に対する抗体反応の程度は類似していたことから、機能的な同等性が示された。なお、プロセス B の () を用い、() したプロセス C で製造された Ipilimumab の薬物動態及び免疫原性は、プロセス B の Ipilimumab と同等であることがサルの探索的試験において示されている。また、() 及び () をより確実に除去するため、プロセス C の () のひとつを変更した承認申請製剤のプロセス C.1 については、生物学的特性の分析結果において、プロセス C の Ipilimumab との生物活性の同等性が示されている。

他の免疫学的パラメータの評価として、サルを用いて遅延型過敏 (DTH) 反応並びに免疫細胞の細胞性マーカー及び細胞内マーカーの発現を抗原刺激の有り又は無しの条件下で測定した。DTH 反応は変動が大きく、恐らく試験法がバリデーションされておらず再現性がないことによるものと考えられる。しかし、Ipilimumab 投与群では溶媒投与群に比較して SK-mel 細胞又は HBsAg 抗原に対する DTH 皮膚反応 (浮腫・硬結、紅斑及び反応部分の直径) がわずかに強かった。また、サルに Ipilimumab を 1 mg/kg で週 1 回又は 10 mg/kg で月 1 回投与し、細胞内サイトカイン量を測定した 2 試験 [3 ヶ月間 (79 日間) 投与試験及び 2 ヶ月間探索的毒性試験] では、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 又はインターフェロン γ (IFN- γ) を発現する抗原特異的活性化 T 細胞数あるいは発現率が軽度ではあるが用量依存的 (10 mg/kg) 又は投与スケジュール依存的 (週 1 回投与) に増加した。しかし、Ipilimumab を 10 mg/kg で月 1 回計 3 ヶ月間投与した探索試験では、抗原特異的 T 細胞の活性化に薬剤関連の変化は認められなかった。以上のように、免疫学的パラメータの変動の大きさや用いた研究方法の信頼性の程度にもかかわらず、これらの結果の全体的な傾向は Ipilimumab の T 細胞反応に及ぼす影響と合致する。

サルにおいて、Ipilimumab は末梢血の T 細胞又は T 細胞サブセットの割合を変化させなかったが、3 ヶ月間探索試験において、本薬投与後 2 週間以内に CD4+セントラルメモリー T 細胞の割合が増加した。これらの変化は、CTLA-4 の障害がメモリー T 細胞の産生に及ぼす影響と一致する。

以上、カニクイザルの薬理試験の結果より、Ipilimumab を 10 mg/kg で反復投与することにより T 細胞依存性抗原に対する抗体反応が増強することが示された。Ipilimumab がサルの DNA ワクチンに対する反応である CD4+及び CD8+ T 細胞増加を亢進させたことから、本作用は CD4+ T 細胞の B 細胞へのシグナル伝達を介したものであり、CTLA-4 の T 細胞依存性 B 細胞反応の調節における役割を支持するものと考えられる。また、Ipilimumab 投与の約 2 週間以内に CD4+セントラルメモリーT 細胞数の増加が認められた。更に、試験抗原に対して増強された抗体反応が、自己抗原に対する非特異的で無制限な反応又は明らかな自己免疫反応を伴わなかったことから、免疫反応の増強は、概してワクチン投与に用いた抗原に限定されることが示唆された。

大腸癌細胞を移植したヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスの試験及びカニクイザルに T 細胞依存性抗原を投与した試験の *in vivo* の結果から、Ipilimumab がヒトにおいて抗原特異的な免疫反応を増強させることが示唆され、また、本剤ががん患者の治療に有用であることが支持された。

2.3 副次的薬理試験

該当なし

2.4 安全性薬理試験

「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドライン（ICH S6）及び「安全性薬理試験ガイドライン」（ICH S7A）に記載されているように、モノクローナル抗体のような特異的受容体を標的としたバイオテクノロジー由来物質に対しては個別の安全性薬理試験は求められていない。Ipilimumab は選択的な標的と作用機序を有するモノクローナル抗体であり、心血管系への影響が疑われる医薬品及び化学物質のいずれにも該当しないことから、テレメトリー試験を含む安全性薬理試験は実施しなかった。ICH S7 ガイドラインに準拠して、Ipilimumab を静脈内投与したときの心血管系、中枢／末梢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を、GLP 適用のサルの反復投与毒性試験の一部として評価した。これらの試験で評価した投与用量及び投与間隔は、ヒトに 3 mg/kg で 3 週ごとに投与した場合に比べて約 3～10 倍の曝露量になるように設定した。その結果、Ipilimumab のサルにおける 6 ヶ月間までの反復投与毒性試験では、心血管系、呼吸系及び神経系機能に関する一般症状評価〔行動、姿勢、協調運動、神経学的検査（末梢及び脳神経系検査、末梢反射、自己受容性感覚及び眼運動）及び 1 ヶ月間投与試験における心電図検査〕に本剤投与に関連した変化は認められなかった。臨床試験では、心筋炎、肺炎及び感覚性又は運動性神経障害を含む、心血管系、呼吸系及び中枢神経系に影響を及ぼす免疫関連の重篤な有害事象の報告は稀であった。

2.5 薬力学的薬物相互作用試験

ヒト CD137 に対する免疫調節抗体である BMS-663513（2 試験）又はヒト PD-1 に対する免疫調節抗体である MDX-1106（1 試験）を Ipilimumab と併用投与した場合の薬理活性について、カニクイザルを用いて検討した。また、マウス腫瘍モデルを用いて、抗マウス CTLA-4 抗体をデキサメタゾンと併用した場合の抗腫瘍効果についても評価した。

カニクイザルの 1 ヶ月間間歇投与毒性試験（GLP 適用）の一部として、KLH に対する抗体反応に及ぼす Ipilimumab の単剤又は BMS-663513（抗 CD137 作動性抗体）との併用投与による影響を検討した。Ipilimumab の単剤投与又は BMS-663513 との併用投与時の C_{max} 及び AUC（0-48h）値に差はみられなかった。Ipilimumab 単剤投与群又は BMS-663513 との併用投与群の KLH に対する抗体反応は

対照群に比べて増大し、その程度は両群で類似していた。本試験では BMS-663513 の単剤投与群が設定されておらず、Ipilimumab の作用と直接的な比較ができないことから、BMS-663513 単剤の過去の試験結果を用いて比較した。BMS-663513 単剤の試験において、BMS-663513 の KLH 特異的抗体反応に対する影響は軽微であったことから、今回の Ipilimumab と BMS-663513 との併用投与群で認められた KLH 特異的抗体反応の増大は、主に Ipilimumab の週 1 回投与によるものであると考えられた。これらの結果に基づき、BMS-663513 との併用投与では Ipilimumab の T 細胞依存性抗原に対する抗体反応調節作用の変化はみられなかった。

Ipilimumab と BMS-663513 との併用投与が SIV DNA ワクチンに対する免疫反応に及ぼす影響についてもカニクイザルを用いて検討した。Ipilimumab の血清及び血漿中濃度は、Ipilimumab の単剤投与群及び BMS-663513 との併用投与群で同程度であり、1 ヶ月間間歇投与毒性試験の結果と一致した。Ipilimumab は SIV 特異的な T 細胞 (CD4+ 及び CD8+) の増加を亢進させたが、BMS-663513 は亢進させなかった。Ipilimumab と BMS-663513 との併用投与は抗原特異的 T 細胞の増殖を、Ipilimumab の単剤投与と同程度に亢進させた。一方、BMS-663513 は SIV 特異的な IFN- γ 反応を増大させたが Ipilimumab ではこのような作用はみられず、両抗体の併用投与では BMS-663513 の単剤投与で観察されたものと同程度の反応を示した。このように、BMS-663513 は Ipilimumab との併用投与でも SIV DNA ワクチンに対する Ipilimumab の薬理活性に影響を及ぼさなかった。

カニクイザルを用いた 1 ヶ月間 (週 1 回で計 4 回) 併用投与試験で、Ipilimumab 3 mg/kg 以上及び MDX-1106 (PD-1 受容体に対する免疫活性化 mAb) 10 mg/kg 以上の用量との併用における薬理作用及び免疫学的影響に関するバイオマーカー (免疫原性、KLH に対する T 細胞依存性抗体反応、末梢血リンパ球のフェノタイピング) を検討した。MDX-1106 及び Ipilimumab の血清中濃度は変動が大きかったが、各薬剤を単剤投与した過去の試験における濃度と同程度であった。19 例中 6 例 (32%) において、ADA が検出されたが、この発現率は Ipilimumab を単剤で投与した場合の割合に比べて高かった。Ipilimumab 及び MDX-1106 の併用投与群では抗 KLH 抗体量が対照群と比べて増加した (Day 24 において 1.5 倍～3.2 倍)。併用投与群では血中全 T リンパ球サブセットに変動の大きい増加がみられ、高用量投与群 (Ipilimumab 10 mg/kg 及び MDX-1106 50 mg/kg) のみで CD3+CD4+ T 細胞数及び CD3+CD8+ T 細胞数の有意な増加がみられた ($p < 0.05$)。すべての投与群において、単球及び NK 細胞の数及び割合に変化は認められなかった。T 細胞への作用の増強は、免疫活性化抗体である MDX-1106 の併用投与による結果であった可能性があるが、試験間で T 細胞作用に変動があることや、本試験では各薬剤の単剤投与群が設定されておらず直接的な比較ができないことから、薬物相互作用の可能性については明確にできなかった。しかし、本試験では T 細胞数又は T 細胞活性化の増強作用と一致して、irAE (一般症状の変化を伴う大腸炎並びに脾臓の濾胞増加及び辺縁帯の拡張) の発現頻度が Ipilimumab と MDX-1106 のそれぞれを同様な用量で単剤投与した試験の結果と比べて増加した。

更に、抗マウス CTLA-4 mAb の抗腫瘍活性に及ぼすデキサメタゾンの影響を評価した。Ipilimumab の臨床試験において、irAE を治療するためにコルチコステロイドの全身投与が必要となる可能性が考えられることから、Ipilimumab の初回投与時からのデキサメタゾンの同時投与又は逐次投与が抗 CTLA-4 mAb の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。その結果、抗 CTLA-4 mAb の抗腫瘍効果がデキサメタゾン同時投与により減弱したが、抗 CTLA-4 mAb の反復投与後にデキサメタゾンを逐次投与した場合には CTLA-4 阻害により誘導される抗腫瘍効果は消失しなかった。これらの結果から、抗

CTLA-4免疫治療中に発生する可能性のあるirAEの治療にコルチコステロイドが使用可能であることが支持された。

3 薬物動態試験

3.1 分析法

3.1.1 血漿中及び血清中Ipilimumab濃度測定法

開発初期の試験で血清中Ipilimumab濃度測定に用いたフローサイトメトリー法はバリデーションが実施されなかったが、その後、高感度で特異的な酵素免疫吸着測定（ELISA）法が開発され、BMV ガイダンス¹を基にバリデーションが実施された。最初に開発された ELISA 法は、3 ヶ月間（79 日間）間歇投与毒性・有効性試験及び6 ヶ月間間歇投与毒性試験での血漿中濃度測定に用いられたが、標準溶液及び品質管理（Quality Control: QC）試料は緩衝液を用いて調製された。本分析法の定量下限は1.2 µg/mL であり、Ipilimumab の血漿中での安定性を確認し、分析単位間の精度は11%~20%の範囲であった。次に、1 ヶ月間間歇投与毒性試験での血清中濃度測定のため、上述の ELISA 法に改良が施された。本分析法では精度・感度及び真度が向上し、血清を用いて調製した標準溶液及びQC 試料が使用され、BMV ガイダンス¹の推奨要件を満たした。バリデーションの際に、定量下限、精度、真度及び希釈直線性を繰り返し3回測定した。その結果、定量下限は0.8 µg/mL、分析単位内の精度は4.78%以下、分析単位間の精度は4.45%以下、真度は理論値の±9.11%以内であった。本分析法は、Ipilimumab と MDX-1106 を併用投与した1 ヶ月間間歇投与毒性試験で得られた血漿試料の分析でも用いられ、バリデーションを別途実施した。バリデーションの際には、真度及び精度を繰り返し2回測定し、マトリックス効果及び定量下限を1回測定し、血漿中での安定性を繰り返し3回測定した。その結果、分析単位間の精度は6.9%以下、分析単位内の精度は8.3%以下、真度は理論値の±12.9%以内、定量範囲は0.8~25.6 µg/mL で、血清中濃度測定法の定量範囲と同一であった。分析法の詳細は薬物動態試験の概要文に記載した。

血清中又は血漿中の Ipilimumab 濃度測定に及ぼす抗 Ipilimumab 抗体（ADA）の影響は、分析法のバリデーションの際に検討しなかったが、強い ADA 陽性反応を示したカニクイザルの血中 Ipilimumab 濃度は、ADA 陽性反応を示さなかったカニクイザルのそれよりも低かった。このことは、ADA による Ipilimumab の消失促進が関与している可能性を示唆するが、ADA が Ipilimumab の測定に干渉している可能性もあった。しかしながら、ADA 陽性反応は反復投与毒性試験での投与終了後まで検出されず、Ipilimumab の曝露は投与期間中維持された。

3.1.2 ADA測定法

3 ヶ月間（79 日間）間歇投与毒性・有効性試験及び6 ヶ月間間歇投与毒性試験で、血漿試料中の ADA を ELISA 法（XXXXXXXXXX 1699）により測定した。2 週間間歇投与毒性試験及び2 ヶ月間間歇投与毒性試験では、ADA を XXXXXXXXXX 1699 に準じた分析法により測定した。XXXXXXXXXX 1699 のバリデーションを実施するとき、ADA の標準品を用いることができなかったため、代わりに実試料を用いた。実試料の抗体価を1日2回、3日間測定し、その精度を調べた結果、本分析法により血漿試料中の ADA を測定可能であることが示された。

次に、血漿試料中の ADA を特異的かつ高感度で検出するためのブリッジング ELISA 法（XXXXXXXXXX 3022）を開発した。本分析法では、ウサギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗血清を陽性対照として用いた。また、

79 個のヒト血漿試料の分析から求めたカットオフ OD 値 0.090 を採用し、OD 値が 0.090 以下の試料は ADA 陰性で、OD 値が 0.090 を上回る試料は ADA 陽性であると判定した。ヒト血漿を用いて本分析法のバリデーションを行った結果、本分析法は血漿中の ADA を特異的かつ高感度で検出可能であることが示された。また、本分析法のバリデーションの結果から、血漿中の Ipilimumab が ADA の検出に干渉し、抗体陰性と判定される可能性のあることが示された。本分析法はヒト血漿中の ADA を特異的かつ高感度で検出可能であったことから、カニクイザル血漿中の ADA も検出可能であると判断し、3 ヶ月間間歇投与毒性・有効性試験（██████00006 試験）で得られた血漿試料中の ADA の検出に用いた。

Ipilimumab を単独投与した、又は Ipilimumab と BMS-663513（抗 CD137 抗体）を併用投与した 1 ヶ月間間歇併用投与毒性試験及び Ipilimumab と MDX-1106 を併用投与した 1 ヶ月間間歇投与毒性試験で得られた血清試料中の ADA を測定するため、電気化学発光（ECL）法を開発し、バリデーションを実施した。本分析法では、薬物未投与のカニクイザル由来のプール血清を陰性 QC 試料として用いた。また、アフィニティークロマトグラフィーにより精製されたサル ADA を添加したサル血清を陽性 QC 試料として用いた。シグナル対ノイズ比（陽性 QC 試料／陰性 QC 試料の比）は、薬物未投与のサルの血清 23 ロットを用いて評価した。その結果、反応を陽性とみなす判断基準（カットポイント）を陽性 QC 試料／陰性 QC 試料の比 1.6 以上に設定した。試料中に Ipilimumab が存在しない場合、ADA の測定感度は 78.1 ng/mL であった。一方、試料中に Ipilimumab が濃度 10 µg/mL で存在した場合、ADA の測定感度は 600 ng/mL であった。分析単位間、プレート間及び分析単位内の精度は、陽性 QC 試料で 11.7%～18.5%、陰性 QC 試料では 3.6%～13.3% であった。また、ADA と Ipilimumab との量的な反応だけでなく、ADA の Ipilimumab に対する特異性を確認するため、陽性反応を示した全試料を免疫除去の実験手法により再分析した。本試験では、陽性反応を示した試料中に Ipilimumab、精製 Ipilimumab F(ab')₂、HuCD40Ig 又は IgG1 をあらかじめ添加した後、試料を分析した。その結果、陽性反応は Ipilimumab に対して特異的であり、IgG1 を除き、Ipilimumab、精製 Ipilimumab F(ab')₂ 又は HuCD40Ig の添加による抗体陽性反応の低下が確認された。

初期の非臨床毒性試験をサポートするための ADA 測定法は、BMV ガイダンス¹に完全には準拠しなかったが、免疫反応（Ipilimumab の曝露量に影響を及ぼす反応）の検出に適すると考えられた。その後、本分析法は再検討され、BMV ガイダンス¹に準拠してバリデーションを実施した。

要約すると、最初の ADA 測定法（██████1699）のバリデーション時には、抗体の標準品を使用できなかったため、実試料の抗体価を測定し、その測定値の精度を調べた。その後、より特異的で高感度の ELISA 法（██████3022）が開発された。本分析法では、ウサギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗血清を陽性対照として用いた。本分析法のバリデーション試験結果から、低濃度の Ipilimumab が ADA の測定に干渉することが示された。また、ECL 法が開発され、BMV ガイダンス¹に準拠してバリデーションを実施した。本分析法を用いた 1 ヶ月間間歇投与毒性試験において、抗体陽性反応の発現がわずかであったことは、免疫原性に関するこれまでの知見と一致しており、完全ヒト型抗体がサル又はヒトで顕著な免疫原性を示さないことを裏付けている。

3.2 薬物動態及びトキシコキネティクス

Ipilimumab 分子内に IgG1 Fc が存在することから、新生児型 Fc 受容体（FcRn）が Ipilimumab の消失に関与していると考えられる。IgG は血液中に長期間残存し、健康なヒトの場合、その消失半減期は 7～

21 日である。Fcフラグメントの消失半減期はIgGと類似しており、Fabフラグメントよりも長いことから、FcフラグメントがIgGの長期間残存に関与していると考えられる。IgGが血液中に長期間残存するメカニズムは、リソソームによるIgGの分解を抑制し、IgGの血中濃度維持を担うFcRnの存在によって説明されている²³。ヒトにおけるIpilimumabの消失半減期は約 15 日で、ヒトのIgGのそれに類似していた。その他のIpilimumabの消失経路としては、FcγRIを介したファゴサイトーシス及び活性化T細胞上のCTLA-4 への特異的結合などが考えられる。しかしながら、FcRnは内皮細胞上に遍在的に発現し²⁴、FcRnを介した作用が発現し得る広い領域を形成していることから、FcRnがIpilimumabの血中濃度維持に関与していると考えられる。したがって、Ipilimumabは、FcRnを介したメカニズムにより内皮細胞に取り込まれた後、細胞内のFcRnに結合すると考えられる。FcRnに結合しないIpilimumabは、リソソームによって分解されると考えられる。また、FcRn・Ipilimumab複合体は、トランスサイトーシス後に血液中に放出されると考えられる。

カニクイザルに Ipilimumab を静脈内投与したときの TK 及び PK パラメータは、毒性試験の一環として検討された。1 ヶ月間間歇投与毒性試験（DS06064 試験）、3 ヶ月間（79 日間）間歇投与毒性・有効性試験及び Ipilimumab と MDX-1106 を併用投与した 1 ヶ月間間歇投与毒性試験では、Ipilimumab の TK 評価を GLP に準拠して行った。6 ヶ月間間歇投与毒性試験を含めた多くの試験では、採血時点が少なかったため、AUC や Cmax といった曝露量のパラメータを算出できなかった。3 ヶ月間（79 日間）間歇投与毒性・有効性試験の初回投与後及び 1 ヶ月間間歇投与毒性試験の初回及び最終投与後の採血時点だけが Cmax 及び AUC を求めるのに適していた。残りの試験は採血時点が少なかったものの、得られた血中濃度データから、包括的な PK 試験と同様の曝露量で試験期間中維持されることが示された。

カニクイザルにIpilimumabを 10 mg/kgの用量で単回静脈内投与したとき、平均滞留時間（MRT=233 ± 55.5 ~ 458 ± 128 時間）と同様に、消失半減期（ $t_{1/2}$ = 203 ± 62.8 ~ 339 ± 112 時間）は長かった。他のヒトモノクローナル抗体についても、同様の長い消失半減期が観察された^{25,26}。消失半減期が長かったのに対して、総クリアランス（CLT = 0.196 ± 0.0372 ~ 0.181 ± 0.0249 mL/h/kg）は小さかった。定常状態分布容積（Vss = 44.1 ± 6.05 ~ 80.9 ± 13.8 mL/kg）はサルの血漿容量と類似していたことから、Ipilimumabは主に血管内に分布することが示唆された。

概して、カニクイザルに Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの PK は、CA184007 試験及び CA184008 試験で被験者に Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの PK と類似していた。

カニクイザルに Ipilimumab を反復投与したとき、全身曝露量は投与に伴って増加した。1 ~ 10 mg/kg 又は 3 ~ 30 mg/kg の 10 倍の用量範囲で、曝露量は用量比を上回って増加したが、3 及び 10 mg/kg の 3.3 倍の用量範囲では、用量に比例して増加した。概して、Ipilimumab を 1 mg/kg 以上の用量かつ 1 ヶ月未満の間隔で投与したとき、Ipilimumab の蓄積傾向が認められた。この Ipilimumab の蓄積傾向は長い消失半減期と関連がある。Ipilimumab の PK に性差はみられなかった。

概して、Ipilimumabはカニクイザルに対して顕著な免疫原性を示さなかった。免疫原性試験でADA陽性反応を示した 9 匹（8%）のうちの 7 匹において、Ipilimumabの投与頻度は 1 ヶ月に 1 回以上（3、7 又は 28 日に 1 回、又は各月の最初の週に 2 回）であったが、蛋白医薬品の投与頻度が多いと免疫原性の発現を増加させ得るため²⁷、1 ヶ月に 1 回以上のIpilimumab投与頻度とADA陽性反応の発現とは

関連性があると考えられた。ADAの抗体価が増加した9匹のうちの4匹で、血中Ipilimumab濃度が低下した。これらの結果から、Ipilimumabの曝露量に影響を及ぼす可能性があるADAとの反応が起こり得ることが示唆された。

試験ごとに異なるADA測定法が異なる試験で用いられたため、免疫原性の直接比較はできなかった。更に、IpilimumabとADAとの反応は、ADA測定法に干渉する可能性がある、試料中の比較的高濃度のIpilimumabにより隠されるため、検出されなかった可能性がある。試料中の薬物が抗薬物抗体の検出に影響を及ぼす(抗薬物抗体が薬物によって捕獲される)可能性があるため²⁸、薬物濃度が低いとき、すなわち消失半減期の6~7倍の時間経過後に採血することが推奨される²⁹。TK及びPK試験のうちの4つの試験では、Ipilimumabの最終投与後から消失半減期の2倍以内の時間経過後に採取した試料について免疫原性を評価した。カニクイザルを用いた1、2及び6ヵ月間間歇投与試験では、血清中又は血漿中Ipilimumab濃度(7.3 µg/mL以上)が抗体分析に理論上干渉し得る範囲内にある、消失半減期の5倍以内の時間経過後に免疫原性を調べた。したがって、これらの試験ではいくつかの抗体反応は検出されず、また、検出された抗体反応は検出された程度以上であった可能性がある。しかしながら、免疫原性反応を示した試験においてIpilimumabの曝露に及ぼす明らかな影響はみられず、Ipilimumabの曝露は試験期間中維持された。

プロセス A () で製造された Ipilimumab の PK とプロセス B () で製造された Ipilimumab の PK は類似していた。また、プロセス B で製造された Ipilimumab の PK とプロセス C () 及び () を高めるため改良された製造方法) で製造された Ipilimumab の PK は類似していた。なお、プロセス C.1 () 及び () をより確実に除去するためプロセス C の () を変更した製造方法) 及びプロセス C でそれぞれ製造された Ipilimumab の生物活性は同等であったことから、PK の比較検討は行わなかった。

3.3 吸収及びバイオアベイラビリティ

ヒトにおける Ipilimumab の投与経路は静脈内のみであったため、動物を用いた吸収に関する試験は実施しなかった。

3.4 分布

蛋白は他の蛋白やペプチドに取り込まれて再利用される小さな分子へと分解されるため、放射能測定又はオートラジオグラフィーのデータに基づく薬物の組織内分布の解釈は困難であることから、Ipilimumab についてもその分布に関する検討は行わなかった。

雌雄のカニクイザルにIpilimumabを10 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときのVss値($44.1 \pm 6.05 \sim 80.9 \pm 13.8$ mL/kg)はサルの血漿量³⁰と類似していたことから、Ipilimumabは血管外には分布しないことが示唆された。このことはIpilimumabの分子量が大きいことと合致しており、IpilimumabのVss値は他のモノクローナル抗体や高分子蛋白のVss値と同程度であった^{31,32}。

妊娠カニクイザルに Ipilimumab を 10 又は 30 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回、妊娠 20~22 日から分娩時まで静脈内投与した結果、出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は分娩後 3 ヶ月までの母動物のそれと類似しており、母動物血清中濃度に対する出生児血清中濃度の比は $1.1 \pm 0.6 \sim 1.7 \pm 1.1$ の範囲であった。授乳中の母動物の乳汁中 Ipilimumab 濃度は低く、母動物血清中濃度の 0.5%未満であったことから、

Ipilimumab の乳汁への移行はほとんどないことが示された。また、乳汁中 Ipilimumab 濃度が著しく低かったことから、出生児血清中の Ipilimumab は出生前の胎盤通過を介した曝露が原因であり、出生後の乳汁摂取が原因ではないことが示唆された。

3.5 代謝

「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドライン（ICH S6）において、「バイオ医薬品の期待される代謝は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解である。したがって、その代謝経路は一般によく分かっている。一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ない」と記載されており、Ipilimumab についてもその代謝に関する検討は行わなかった。

3.6 排泄

ICH S6 ガイドラインにおいて、「物質収支を評価するための画一的な試験からはあまり有益な情報は得られない」と記載されている。排泄試験は放射性同位体で標識された薬物を用いて実施されるが、放射性同位体で標識された蛋白は小さな分子や分解物へと代謝されることからデータの解釈は困難と考えられるため、排泄試験は通常実施されない。以上の理由から、Ipilimumab についてもその排泄に関する検討は行わなかった。

3.7 薬物動態学的薬物相互作用

Ipilimumab は蛋白であり、チトクローム P450 酵素による代謝は受けないため、Ipilimumab と他の化合物との薬物動態学的薬物相互作用を検討するための試験は実施しなかった。Ipilimumab のような典型的なモノクローナル抗体は、チトクローム P450 酵素により代謝される化合物との相互作用を引き起こさないと考えられる。

なお、Ipilimumab を単独投与又は Ipilimumab と BMS-663513（抗 CD137 抗体）を併用投与したときの毒性を検討するための 1 ヶ月間間歇投与毒性試験（GLP 準拠）において、Ipilimumab を単独投与したサルと Ipilimumab と BMS-663513 を併用投与したサルの C_{max} 又は AUC(0-48 h)値に違いが認められなかった。試験デザインは BMS-663513 の PK に及ぼす Ipilimumab の影響を評価するものではないが、試験結果から BMS-663513 が Ipilimumab の PK に影響を及ぼさないことが示された。

更に、カニクイザルに Ipilimumab 及び MDX-1106（完全ヒト型抗 PD-1 抗体）をそれぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で週 1 回、1 ヶ月間併用投与した結果、Ipilimumab の C_{max} 又は血漿中濃度は、これまでに実施した Ipilimumab 単剤投与試験と比較して顕著な違いがみられなかった。しかしながら、本試験で用いたサルの 32%（19 匹中 6 匹）に ADA 陽性反応が検出された。この発現率は他の試験の発現率 8% よりも高値であったことから、MDX-1106 の免疫活性化作用が Ipilimumab に対する体液性免疫応答の増加の原因であると考えられた。

4 非臨床毒性試験

進行期悪性黒色腫患者を対象とした Ipilimumab の臨床使用の安全性を担保する非臨床試験として、反復投与毒性、組織結合性及び生殖発生毒性試験を実施し、免疫原性、免疫毒性及び局所刺激性を検討した（表 4-1）。Ipilimumab はサルの CTLA-4 に特異的に結合したが、その他の一般的に毒性試験で用いられる動物種（マウス、ラット及びウサギ）の相同 CTLA-4 には特異的に結合せず、薬理作用

はカニクイザルのみで認められたため毒性試験にはカニクイザルを用いた。毒性試験の投与経路は臨床投与経路である静脈内投与とした。重要な試験はいずれも GLP 適合下で ICH ガイドラインに準拠して実施した。

表 4-1: 非臨床毒性試験一覧

試験の種類及び投与期間	投与経路	試験系
反復投与毒性試験		
2 週間投与	静脈内	カニクイザル
1 ヶ月間投与	静脈内	カニクイザル
6 ヶ月間投与	静脈内	カニクイザル
併用投与毒性試験		
1 ヶ月間投与 [± BMS-663513 (抗 CD137 抗体)]	静脈内	カニクイザル
1 ヶ月間投与 [± MDX-1106 (抗 PD-1 抗体)]	静脈内	カニクイザル
生殖発生毒性試験		
ヒト以外の霊長類に対してデザインされた単一試験 [拡充型出生前及び出生後の発生に関する試験 (ePPND 試験)]	静脈内	妊娠カニクイザル
<i>In vitro</i> 増殖活性及びサイトカイン放出試験	<i>In vitro</i>	ヒト細胞
製剤同等性試験		
単回投与 (プロセス B 及び C)	静脈内	カニクイザル
3 ヶ月間 (79 日間) 投与 (プロセス A 及び B)	静脈内	カニクイザル
組織結合性試験	<i>In vitro</i>	マウス、ラット、ウサギ、カニクイザル、ヒト組織
探索的薬理・毒性試験		
2 ヶ月間投与 (ワクチン併用)	静脈内	カニクイザル
3 ヶ月間投与 (ワクチン併用)	静脈内	カニクイザル
4 ヶ月間投与 (BMS-663513 併用)	静脈内	カニクイザル

サルにおける重要な反復投与毒性試験 (最長 6 ヶ月間) では、Ipilimumab 投与 (単剤又は多様な抗原との併用投与) に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった。しかし、探索的毒性試験及び薬理試験でそれぞれ Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で月 1 回 (q4w) 又は 2 回 (2q4w) 投与した各 1 例 (合計 2 例) に臨床試験で報告されている症状と類似した毒性変化 (大腸炎又は皮膚炎及び発疹) が認められた。大腸炎を認めたサルは安楽死させたが、発疹を認めたサル (Ipilimumab 及び BMS-663513 を併用投与) には抗ヒスタミン薬とステロイド薬による治療を施し、症状は処置後 2 ヶ月間のうちに回復した。これらの免疫関連の有害事象 (irAE) は CTLA-4 の機能阻害に起因し、本剤の薬理作用に関連する変化と考えられた。Ipilimumab 及び MDX-1106 (免疫調節薬: 抗 PD-1 完全ヒトモノクローナル抗体) を 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で併用投与した 1 ヶ月間試験 (週 1 回計 4 回投与: qw×4) で同様の irAE の発現頻度増加 (下痢、摂餌量減少及び体重減少を伴う大腸の炎症性変化、脾臓辺縁帯の拡張及び脾臓及びリンパ節の胚中心の減少) が認められたが、これらはそれぞれの単剤を同様の用量で投与した試験でも認められている変化であった。更に、サル 4 ヶ月間探索的薬理試験で 10 mg/kg の Ipilimumab 及びサル免疫不全ウイルス (SIV) DNA ワクチン (gag、env 及び pol を発現している SIV 蛋白質の一部) をケタミン沈静下で間歇併用投与 (2q4w) した 1 例で Day 58 の Ipilimumab 投与約 5 分後に infusion reaction が認められた。約 5 ヶ月後、本例に投与速度を制御して Ipilimumab

の投与を再度実施しても同様の症状は再現されなかったことから、本症状と投与との関連は不明であった。更に、探索的薬理試験において安定化抗体アッセイ系を用い、Ipilimumab を数例の提供者より採取したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) に曝露してその増殖及びサイトカイン放出への影響を評価した結果、Ipilimumab は陽性対照である抗 CD28 抗体と比較して PBMC に対し、軽微な増殖及び一部のサイトカイン [インターロイキン (IL) -2、腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、IL-6、IL-8] の放出を誘導したのみであり、インターフェロン (IFN) - γ の放出はみられなかった。しかし、他の蛋白質医薬品の静脈内投与と同じく、Ipilimumab が急性のサイトカイン放出に関連する infusion reaction を誘導する可能性を完全に否定することはできなかった。

Ipilimumab はサルにとって異種蛋白であるが、試験で Ipilimumab を投与したサル 106 匹のうち ADA 反応陽性の動物は 9 匹 (約 8%) であり、顕著な免疫原性は示さなかった。ADA は Ipilimumab の速やかな消失に関連すると考えられたが、ADA 反応の発現は低頻度で、また、投与期間終了後 (薬物濃度の低下後) に発現する傾向があり、すべての反復投与試験で投与期間中の Ipilimumab 曝露量は維持されていた。Ipilimumab は選択的免疫調節作用を有するため、免疫機能へ影響を及ぼすことが予測された。Ipilimumab の免疫機能への影響は、サルの反復投与毒性試験で評価した。これらの試験では、反復投与毒性試験で実施する標準的な血液学的検査 (白血球数及び分類)、血液生化学的検査 (グロブリン測定)、リンパ系組織の剖検及び病理組織学的検査に加え、免疫学的評価として末梢血リンパ球フェノタイピング (活性化 T 細胞及び制御性 T 細胞サブセット)、脾臓、鼠径部リンパ節及び大腸上皮のリンパ球フェノタイピング、T 細胞依存性抗体反応 (TDAR) 検査、遅延型過敏 (DTH) 反応検査、抗核抗体 (ANA) 測定並びに末梢血 T 細胞の *ex vivo* 刺激によるサイトカイン (IL-2、TNF- α 及び IFN- γ) 産生の細胞内染色を実施した。更に、Ipilimumab による複数の抗原に対する TDAR への影響及び臨床用量における抗原特異的 T 細胞活性化についても評価した。試験の結果、Ipilimumab による広範囲の非特異的免疫活性化や自己免疫毒性はおおむね認められなかった。ヒトで臨床的に報告されている大腸炎及び発疹 (CTLA-4 の重要な役割である自己免疫寛容の維持に関連する症状に類似した irAE) は低頻度に認められた。また、Ipilimumab の免疫機能への影響を ePPND 試験においても全般的に評価した。子宮内曝露を受けた出生児について、標準的な血液学的検査 (白血球数・分類)、血液生化学的検査、リンパ系組織の剖検及び病理組織学的検査に加え、免疫学的検査として末梢血リンパ球フェノタイピング (制御性 T 細胞サブセット)、血清 Ig 量測定、TDAR 検査及び ANA 検査を実施した。妊娠中から分娩後 6 ヶ月までの母動物血清中 IgA、IgM 及び ANA 量並びにリンパ球分類に Ipilimumab 投与に関連した影響は認められなかった。10 及び 30 mg/kg 群双方の母動物で妊娠 125 ~127 日の投与 72 時間後に血清中 IgG 量の増加 (対照群と比較して 1.2~1.4 倍) がみられたが、分娩後の休薬期間中に回復した。10 及び 30 mg/kg 群でみられた血清中 IgG 量の増加は、Ipilimumab の作用機序 (免疫賦活) 及びその作用である持続的な T 細胞活性化に一致した。しかし、これらの影響は軽度であり、母動物には関連した有害な所見を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

4.1 単回投与毒性試験

Ipilimumab の単回投与毒性試験は、反復投与毒性試験の初回投与で急性毒性を評価できると考えられたため実施していない。サルに最高用量 30 mg/kg の Ipilimumab を投与しても急性毒性は認められなかった。更に、プロセス B 又はプロセス C の Ipilimumab を単回投与して実施した探索的薬物動態比較試験においても有害な毒性変化は認められていない。

4.2 反復投与毒性試験

サル2週間、1ヵ月間、3ヵ月間（79日間）及び6ヵ月間間歇投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）における曝露量（定常状態の雌雄平均 AUC）を臨床用量 3 mg/kg（3週間に1回 90分間静脈内投与を4回）におけるヒト曝露量と比較した（表 4.2-1）。

表 4.2-1: サル及びヒトにおける Ipilimumab の曝露量比較

試験	無毒性量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC (0-T) ^a (µg·h/mL)	AUC (3週間) ^b (µg·h/mL)	ヒト投与量 (3 mg/kg) との比	ヒト曝露量 ^c との比	
					mg/kg	Cmax	AUC
2週間（投与 日：Day 1, 4 及 び 7）	30	682 ^d	N/A	N/A	10	6.8	N/A
1ヵ月間 (qw×4) ^e 投与	10	339	31600 (0-7 日)	94800 ^f	3.3	3.4	6.1
79日間（投与 日：Day 1, 29 及び 57）	10	486 ^g	52600 ^h AUC (INF)	39450 ⁱ	3.3	4.9	2.5
6ヵ月間（投与 日：Day 0, 28, 56, 84 及び 140）	10	261 ^g	N/A	N/A	3.3	2.6	N/A

^a 特記する場合を除き、最終投与後の雌雄平均値（T は AUC 算出の期間）。

^b ヒトの3週間曝露量に換算。

^c 予定臨床用量 3 mg/kg/q3w における Cmax : 100 µg/mL、AUC(0-21d) : 15654 µg·h/mL。ヒト曝露量は、MDX010-15 試験 (n=13) 及び CA184007/CA184008 試験 (n=16) において、それぞれ 10 mg/kg の4回投与後及び3回投与後の平均 Cmax 及び AUC (0-21d) を 3 mg/kg に換算した。被験者への投与（10 mg/kg）は 1, 4, 7 及び 10 週に行われ、AUC 比は非臨床試験の AUC をヒトの3週間曝露量に換算して算出した。

^d 最終投与直前の採血試料中濃度又はトラフ濃度。本試験ではトキシコキネティクスの採血時点が少なく、Cmax を推定できなかった。

^e 併用投与試験において Ipilimumab の PK に影響がみられなかったことから、Ipilimumab 単剤及び Ipilimumab と他の免疫調節薬の併用投与したときの血中濃度の合算平均値を示す。

^f 1ヵ月間間歇投与毒性試験における Day 22 の投与後 AUC (0-7 日) を3週間曝露量に換算。

^g 最終投与後約 24 時間後の濃度。本試験ではトキシコキネティクスの採血時点が少なく、Cmax を推定できなかった。

^h プロセス A 及び B の間に PK パラメータの差がみられなかったことから、プロセス A 及びプロセス B の合算平均値を示す。

ⁱ 79 日間試験の初回投与後無限時間までの AUC [AUC (INF) : 定常状態の AUC (0-T) と同等] に 0.75 を乗じ、3週間曝露量として示す。

N/A : 該当なし又は AUC の算出をしていない試験

サルにおける反復静脈内投与毒性試験では、最高用量 30 mg/kg の Ipilimumab を q3d×3 投与（最高血清中濃度 : 682 µg/mL）、10 mg/kg（体重換算の臨床使用量の約 3 倍）を qw×4 投与 [AUC (0-168h) : 31600 µg·h/mL、AUC (0-63 日) : 90600 µg·h/mL]、1 mg/kg を qw×10 及び 10 mg/kg を q4w×5 投与しても有害な影響はみられず、忍容性が認められた。6ヵ月間の重要な間歇投与毒性試験では、投与に関

連した所見として病理組織学的変化を伴わない甲状腺重量の減少（対照群と比較して-44%～-21%）及び精巣重量の減少（-49%～-27%）が認められたのみであり、本試験における無毒性量は 10 mg/kg と推定された。反復投与毒性試験では、Ipilimumab の薬理作用（抗原特異的液性免疫応答の亢進及び T 細胞の活性化）は全身性の非特異的な免疫細胞の活性化を引き起こすことなく発現することが示唆された。また、試験では 10 mg/kg を長期間投与したが、末梢血及びリンパ系組織に増殖性、前腫瘍性及び腫瘍性の変化は認められなかった。

カニクイザルに予定最高臨床用量である 3 mg/kg の 3～10 倍の用量（最高用量 30 mg/kg を q3d×3 及び最高用量 10 mg/kg を q4w×5 投与）を投与して臨床使用の投与頻度及び血中濃度を超える Ipilimumab の毒性を評価した重要な反復静脈内投与毒性試験では、毒性学的に意義のある変化は認められなかった。ヒト推奨臨床投与頻度（約 21 日に 1 回）に基づく、2 週間間歇投与（q3d、ヒト推奨臨床投与頻度の約 7 倍）毒性試験の無毒性量（30 mg/kg）は、ヒトでは約 7 倍に相当すると推定された。更に、10 mg/kg の Ipilimumab を 1 ヶ月間間歇投与した毒性試験の投与間隔を臨床の投与間隔に合わせて換算した場合の曝露量は、ヒトの 6.1 倍であった。非臨床毒性の試験成績は臨床安全性データベース情報とあわせて、対象とする患者集団における予定臨床投与量及び用法の安全性を担保していると考えられた。

カニクイザルに Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab を複数の抗原、DNA ワクチン又は抗 CD137 抗体（BMS-663513）と併用して投与した合計 100 例以上のうち探索的試験の 2 例において、ヒトで報告されている irAE と類似する重篤な影響が認められた。これらのうち 1 例は 3 ヶ月間探索的試験で 10 mg/kg の Ipilimumab を 3 種のワクチン抗原（HBsAg、SK-mel 及び DNP-Ficoll）と併用投与した 6 例中 1 例に認められた大腸炎であり、本例は Day 42 に安楽死させた。他の 1 例では、4 ヶ月間探索的薬理試験で 10 mg/kg の Ipilimumab 及び BMS-663513 を SIV DNA ワクチンと併用投与（2q4w）した群で Day113 に持続的な皮膚炎と発疹が末梢リンパ節周囲の腫脹を伴って鼠径部に認められた。大腸炎を認めたサルは病理組織学的検査では、急性～亜急性の炎症、陰窩の膿瘍、びらんが結腸から直腸にいたるまでみられた。これに加えて、副腎、肝臓及び腎糸球体の混合細胞浸潤、糸球体メサンギウムの肥厚、副腎皮質索状帯の過形成及び胸腺、脾臓及び腸管系リンパ組織（GALT）のリンパ球数減少が認められた。これらの所見は一般状態の悪化に関連した二次的影響及び消化管内膜の障害に起因する感染症による影響と考えられた。

皮膚炎は Ipilimumab 及び BMS-663513 の併用投与終了の 4 週間後に認められた。この症状を抗ヒスタミン薬による処置で一時的に治療したが再発し、最終的にプレドニゾンの処置で治癒した。所見を認めた皮膚のバイオプシー検査の結果、軽度の真皮層下部の血管周囲浮腫及びリンパ球（大部分は CD8+）、マクロファージ（CD68+）及び肥満細胞の浸潤を伴う軽度の表皮の肥厚・細胞増殖（核増殖抗原 Ki67 陽性の増加）が認められた。病因となる感染症はみられなかった。これらのサルで認められた炎症性変化は、CTLA-4 の重要な役割と予想される自己免疫寛容の調節に関連すると考えられ、臨床的にヒトで報告されている主な有害事象と類似していた。発疹は同様に T 細胞の活性を亢進させる BMS-663513 でも臨床的に報告されており、Ipilimumab 及び BMS-663513 を併用投与したサルに発現した皮膚炎は、これらの薬剤の投与に関連していると考えられた。Ipilimumab と MDX-1106 の併用投与では、それぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量の 1 ヶ月間試験（qw×4 投与）で同様の irAE の発現頻度増加（下痢、摂餌量減少及び体重減少を伴う大腸の炎症性変化、脾臓における濾胞の増加、辺縁帯の拡張及び脾臓・リンパ節の胚中心の減少）が認められたが、これらはそれぞれの単剤を同様の用量で投与した場合でも認められている変化であった。

臨床試験では主に消化管、皮膚、肝臓、内分泌及び中枢神経系（感覚性又は運動性神経障害、臨床的安全性の概要参照）における Ipilimumab 投与に関連した irAE が報告されている。下部消化管の irAE 発現割合は高く、下痢の徴候として現れた。Ipilimumab 投与に関連した下痢の症状は軽度～極めて重度の範囲で報告された。また、Ipilimumab を投与された患者において腸壁の穿孔により結腸切除手術を必要とする出血性の大腸炎が、発現割合は高くないものの報告され、死亡に至る場合もあった。Ipilimumab は GALT に発現した CTLA-4 と結合することがヒト及びサル組織を用いた結合性試験で確認されており、これらの組織のリンパ球（T 細胞）は活性化状態で存在し、Ipilimumab による CTLA-4 阻害への感受性が高いことが示唆された。臨床的に報告されている殆どの事例では、大腸炎の症状を副腎皮質ステロイド薬の高用量短期間使用などで抑制することが可能であった。

最も多く認められた irAE は皮膚の irAE（発疹、そう痒症）であり、多くは軽度から中等度であった。白斑及び3例で認められた表皮の壊死も Ipilimumab 投与に関連した影響と考えられた。その他、眼炎、下垂体炎/下垂体機能低下症、一次副腎機能低下症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺機能低下症、自己免疫性肝炎が irAE として臨床的に報告されている。詳細については臨床的安全性概要に記載した。これらに類似した影響はサルの毒性試験では認められなかった。なお、irAE は概して炎症性の変化であり、治療によりほとんどの事例で回復が認められた。

治験薬と関連のある死亡は、進行期悪性黒色腫を対象に Ipilimumab 3 mg/kg を投与した海外第3相試験（試験番号 MDX010-20）において、Ipilimumab 3 mg/kg 群で 3.1%、Ipilimumab 3 mg/kg + gp100 群で 2.1%に認められた。また、進行期悪性黒色腫を対象に Ipilimumab 3 mg/kg を投与した2つの第2相試験（CA1840041 及び CA184022 試験）の統合データでは、1.8%に認められた。

複数の *in vitro* 試験で、CTLA-4 が B7.1 及び B7.2 と直接的に結合することにより細胞周期が停滞し、サイトカインの発現及び T 細胞の増殖が抑制される一方で、可溶性抗 CTLA-4 モノクローナル抗体により T 細胞の活性化が誘導されることが示された^{33,34,35,36}。サルの毒性試験では、抗原（SK-mel 細胞、HbsAg 及び KLH）及び Ipilimumab の併用投与による TDAR の亢進（全試験を通して対照群の 2～7 倍）が示された。免疫寛容が生じる状態下のペプチド抗原接種において CTLA-4 と B7 の相互作用の阻害が末梢 T 細胞寛容の誘導を阻害することは、CTLA-4 がアレルギーの誘導に関わっていることを示唆していた³⁷。更に、CTLA-4 は活性化されたエフェクター T 細胞上での発現に加え、Treg 表面上に恒常的に発現しており、Treg は免疫応答を抑制する³⁸。10 mg/kg の Ipilimumab を投与（q4w×3）したサルの末梢血 Treg（CD4+CD25+、CD4+CD25+CTLA-4+、CD4+CD25+FoxP3+）には、投与に関連した影響は認められなかった。

CTLA-4 ノックアウトマウスにおいて致命的なリンパ球増殖症が認められることから、CTLA-4 は T 細胞反応の重要な負の制御因子と考えられる^{39,40,41}。しかし、Ipilimumab による CTLA-4 の機能阻害は、サルの反復投与試験で T 細胞サブセットの変化、非特異的 T 細胞活性化及び自己免疫を示す病理所見に影響を及ぼさず、多臓器における全身性の非特異的 T 細胞活性化・増殖を誘導しないことが示された。更に、投与頻度の高いサル 1 ヶ月間試験（10 mg/kg を qw×4 投与）において ANA 量への影響はみられなかった。また、特異的自己免疫疾患易発生マウスにおいて、抗 CTLA-4 抗体は自己免疫応答を増大させた²。したがって、Ipilimumab 投与に関連して認められた irAE は、CTLA-4 阻害作用に関連したものと考えられたが、進行期悪性黒色腫患者において概して管理可能な症状と考えられた。

Ipilimumabは悪性腫瘍治療を目的とした新規の作用機序を有するT細胞活性化抗体薬であり、主な毒性変化はその薬理作用（CTLA-4受容体への結合及び機能阻害）に起因する。したがって、上市されている類似医薬品の非臨床及び臨床における毒性情報と比較することはできなかった。しかし、同じ受容体（CTLA-4）を標的とした他の開発中薬剤であるTremelimumabは、サル毒性試験において薬理作用に関連した毒性変化をIpilimumabと同様に又は更に高頻度に誘導した⁴²。Tremelimumabをサルに投与した試験では、皮膚の発疹、体重減少と食欲不振を伴う持続的な下痢（最高用量の50 mg/kgをqw投与した数例では、最終的に投与中止又は安楽死処分）、循環血中リンパ球の増加（主にT細胞）、好酸球の増加、赤血球系パラメータの減少、リンパ系器官の過形成、甲状腺の萎縮及び幾つかの器官における単核細胞の浸潤及び炎症発現頻度及び程度の増加が認められた。また、Tremelimumabはサルで生殖発生毒性及び催奇形性を示さなかった。Ipilimumabと同様に、Tremelimumabの投与に関連して認められた影響はその作用機序と一致しており臨床的に報告されている症状と類似していた。

その他のモノクローナル抗体抗悪性腫瘍治療薬を調査した結果、これらの薬物の非臨床毒性は薬理作用又は標的の発現する組織に関連するものに限られていた^{43,44,45,46}。これらの所見は薬理作用に関連しているにもかかわらず、これらの抗体薬について臨床的に報告されている毒性症状のすべて（トラスツズマブで認められた心筋症及び肺毒性及びセツキシマブで認められた肺毒性）を非臨床試験で予測することはできなかったが、これは動物とヒトでの標的結合親和性及び免疫原性の違いに起因していると考えられた。しかし、完全ヒト型抗体であるIpilimumabはサルで顕著な免疫原性を示さなかった（陽性率8%）。したがって、サルの反復投与毒性試験では投与間にも十分な曝露が得られ、薬理作用に関連した影響が認められたと考えられた。

サルでは最も一般的なIpilimumabによる毒性変化を予測できた。Ipilimumabの結合親和性はヒト及びサルのCTLA-4の間で10倍未満（BIAcoreシステムを用いた表面プラズモン共鳴による測定において2倍超～約4倍の範囲、表4.2-2）であった。

表 4.2-2: 表面プラズモン共鳴によるIpilimumabとヒト及びカニクイザルCTLA-4の結合

BIAcore チップ上に安定化した Ipilimumab			
動物種	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$K_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	$K_{off} \times 10^{-3}$ (1/s)
カニクイザル	8.24	1.25	1.05
ヒト	4.51	2.09	0.94
BIAcore チップ上に安定化した CTLA-4 抗原			
動物種	$K_D \times 10^{-9}$ (M)	$K_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	$K_{off} \times 10^{-3}$ (1/s)
カニクイザル	20.1	0.87	1.74
ヒト	4.79	1.3	0.64

Ipilimumabは*in vitro*で検出可能な補体依存性細胞傷害（CDC）活性を示さなかったが、陽性対照である抗MHCクラスI抗体と同様に、Ipilimumabは一定の条件下で活性化ヒトT細胞に抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を誘導した。認められたADCC活性には試験間及び試料提供者間で差があり、ほとんどADCC活性を示さない例も認められた。また、ADCC誘導の鍵となる受容体CD16（FCγRIII）に対するマウス抗体によって、IpilimumabによるADCC作用は完全に阻害された。これにより、Ipilimumab自身のFCγRIIIへの結合は弱いものの、Ipilimumabの殺細胞作用にはCD16（FCγRIII）への抗体結合が

必要であることが示された。プロセス A 及びプロセス B によって製造した Ipilimumab による *in vitro* ADCC 活性を測定した別の試験では、いずれの製造工程による Ipilimumab でも ADCC 活性は認められなかった。これらの測定では、IL-2 による前処理を行わずに直接単離した自家移植単核細胞を用いたという点で活性の認められた系と異なっていた。また、休止状態の T 細胞では Ipilimumab による ADCC 活性はいずれの試験でも認められなかった。Ipilimumab による ADCC 活性の個体差は、量的な CTLA-4 発現に関連していると考えられた (2.2 項)。 *In vitro* の細胞分裂性刺激に対する反応及び細胞毒性作用に対する耐性には個体差があると考えられた。CD4+CD25+ Treg 上の CTLA-4 発現は少ないと考えられるが、この T 細胞サブセットの ADCC 活性は、十分な量の細胞を用意することが困難であることから評価しなかった。

*In vitro*におけるIpilimumabのADCC活性への影響には個体差があったが、最高用量 10 mg/kgで実施した重要な 1 ヶ月間、79 日間及び 6 ヶ月間のサル毒性試験及び 2 ヶ月間探索的毒性試験の末梢血リンパ球サブセットフェノタイピングでは、T細胞の枯渇を示す結果は認められなかった。3 ヶ月間の探索的毒性試験における拡張フェノタイプ分析ではIpilimumabを投与したサルの末梢血CD4セントラルメモリーT細胞サブセット (CD4+CD28+CD95+) の減少ではなく、増加 (対照群と比べて+77%) が認められた。CTLA-4 を恒常的に発現している Treg (CD4+CD25+、CD4+CD25+CTLA-4+、CD4+CD25+FoxP3+) 数は、この試験では影響を受けなかった。更に、臨床試験では数例のIpilimumab投与患者でIpilimumabによる腫瘍の増殖抑制が認められ、免疫反応が顕著な炎症細胞 (多数の活性化T細胞) の浸潤として認められた。これは、CTLA-4 発現の免疫抑制作用を阻害することがIpilimumabの主な作用機序であり、*in vitro*におけるADCCへの影響の個体差に関わらず臨床的意義のあるCTLA-4+エフェクターT細胞及びT細胞サブセット (Treg) の枯渇が*in vivo*では発生していないことを示唆していた。Ipilimumabの臨床試験でも、Tregを含む循環血中T細胞サブセットの枯渇は認められなかった^{10,21,47,48}。これらの結果は、Ipilimumabの抗腫瘍作用がT細胞の活性化によるものという前提を担保するものであった。

静脈内投与される他の蛋白質医薬品と同じく、Ipilimumabは急性のサイトカイン放出に繋がるinfusion reactionを誘導する可能性があった。4 ヶ月間薬理試験でIpilimumabを急速静脈内投与した 1 例にみられたinfusion reactionは有害な症状と考えられるが、投与との関連性は不明であった。Ipilimumabの投与速度が不明であること、ケタミンによる沈静下での投与であったこと、SIV DNAワクチンとの併用投与であったこと及び高濃度のADAが存在していたことが交絡因子として関与していた可能性が考えられた。急性反応は急速な投与速度によるものと考えられ、投与速度を緩徐にすることにより解決した。Infusion reactionが発現した日の投与速度を厳密に測定していなかったため確かではないが、このサルには免疫グロブリンの急速静注による非特異的反応が起こった可能性が考えられた。更に、この急性反応には麻酔による血圧低下に関連している可能性が考えられた。ケタミンなどの麻酔薬には動物やヒトで血圧低下及びアナフィラキシー様反応などの異常症状を引き起こす可能性があることが報告されている^{49,50,51,52}。また、特にその投与速度が速い場合、蛋白質治療薬の免疫原性はinfusion reactionとして発現し易いことが知られている⁵³。免疫複合体の形成と溶解性は抗原及び抗体の濃度に大きく依存しており、低速度の静脈内投与では可溶化免疫複合体の生成が大幅に減弱される⁵⁴。約 5 ヶ月後に投与速度を制御して実施したIpilimumab単独投与による再惹起では、同じ麻酔薬による沈静下でADAの存在が確認されていたにも関わらず同様の症状はみられなかった。再惹起の際にADAが同様に高濃度であってもinfusion reactionを示唆する変化が発現しなかったのは、制御された投与速度が十分低かったために免疫複合体が生成しなかったあるいは生成量が低下したためと考えられた。また、この反応がワクチンによって引き起こされた可能性も考えられた。なお、infusion reactionは無

麻酔下で投与速度を制御して実施したサルにおけるIpilimumabの毒性試験及び薬理試験（合計サル 88 例）では認められなかった。進行期悪性黒色腫を対象とした第2相及び第3相試験において、Ipilimumab 3 mg/kgを 90 分静脈内投与された 696 例のうち、Grade 2 以上のInfusion reactionの可能性が高い事象と判定されたのは5例であった。サルで認められた急性反応の原因は明らかではないが、この反応は薬物の投与によって再惹起されなかったため、Ipilimumabの標的受容体（CTLA-4）への結合による直接的な影響ではないと考えられた。Infusion reactionは上市されている様々な標的及び作用機序の抗腫瘍モノクローナル抗体医薬品（セツキシマブ、トラスツズマブ及びペバシズマブ）において頻度 3%～86%の範囲で認められている^{43,45,46}。これらと比較すると、Ipilimumabの投与に関連するinfusion reactionの発現頻度は低いと考えられた。

4.3 遺伝毒性試験

「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドライン（ICH S6）に記載されているとおり、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく、このような成分がDNAや他の染色体成分に直接相互作用するとは考えにくい必要とされない。したがって、Ipilimumabの遺伝毒性試験は実施しなかった。また、標準的な*in vivo*又は*in vitro*変異原性評価が実施されたバイオ医薬品（アバタセプト、セツキシマブ、エタネルセプト、インフリキシマブ及びアダリムマブ）では、いずれも遺伝毒性は認められなかった^{43,55,56,57,58}。

4.4 がん原性試験

がん原性試験ガイドライン（ICH S1A）によると、進行した全身性疾患の治療を目的とした抗腫瘍剤などでは通常、がん原性試験を必要としない。また、がん原性試験データを伴わなくても、本適用の患者においては利益がリスクを上回ると考えられた。したがって、Ipilimumab のがん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

妊娠カニクイザル（各群 19～20 匹）に Ipilimumab を 0（溶媒対照）、10 及び 30 mg/kg の用量で妊娠 20～22 日から分娩まで 3 週間に 1 回（q3w）間歇静脈内投与した。溶媒対照群には生理食塩水を同様に投与した。母動物について一般状態観察、摂餌量測定、体重測定、超音波による妊娠状態の検査、血液生化学的検査及び血液学的検査、リンパ球フェノタイピング、ADA 及びトキシコキネティクス測定を実施し、自然分娩させた。また、出生児について、新生児期（生後 1 ヶ月間以内）に外表検査、理学検査、骨格検査及び神経行動学的検査を行い、出生後 6 ヶ月間に一般状態観察、体重測定、形態測定、血液生化学検査、血液学的検査、リンパ球フェノタイピング、TDAR 検査（HBsAg 及び破傷風毒素に対する反応）、血清中免疫グロブリン測定（IgM、IgG 及び IgA）及び ANA 測定（免疫機能発達の評価）を実施した。これらの用量による曝露量（AUC）は、3 mg/kg を q3w で投与したヒト曝露量のそれぞれ 3.2 倍（10 mg/kg）及び 7.3 倍（30 mg/kg）に相当した。

妊娠期間中の反復投与終了後、妊娠サルの平均全身曝露量 [AUC (0-T)] は、10～30 mg/kg で概して用量に比例して増加し、蓄積は認められなかった。各投与時における血清中 Ipilimumab のトラフ値は概して同程度であった。分娩後における母動物の平均血清中 Ipilimumab 濃度は 10～30 mg/kg の間で用量に比例して増加し、哺育期間中に減少して分娩 182 日後の濃度は分娩後 3 日目の 1.1%未満であった。出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は出生後 3 ヶ月まで母動物と同等であった（出生児と母動物

の血清中 Ipilimumab 濃度比：1.1 ± 0.6～1.7 ± 1.1）。母動物の乳汁中には微量の Ipilimumab が検出された（平均乳汁／血清中 Ipilimumab 濃度比：0.002～0.004）。妊娠の第 1 三半期及び第 2 三半期では、妊娠への影響はみられなかった。一方、妊娠第 3 三半期では Ipilimumab 投与群に母動物体重の減少、流産、早産（出生時体重の低値と関連）及び死産の発生頻度増加がみられ、胎児死亡率（10 及び 30 mg/kg で 21%及び 30%）が対照群（0%）及び施設背景値（17.6%）と比較して上昇した。妊娠第 3 三半期（妊娠 101 日～分娩）の全出産において、Ipilimumab の 30 mg/kg 投与により妊娠期間が軽度短縮（30 mg/kg 群：151 日、対照群：160 日、10 mg/kg 群：156 日）し、未熟児の増加もみられた。また、30 mg/kg 群の出生児 2 例に泌尿生殖器の奇形が認められた。更に、30 mg/kg 群の出生児では平均出生時体重の低値（対照群と比較して-15%）が認められた。しかし、これらの動物では体重増加亢進が生後 3 ヶ月までみられ、生後 6 ヶ月の出生児平均体重は対照群と同等であった。出生後 6 週及び 18 週に実施した出生児における HBsAg に対する TDAR 検査では、Ipilimumab 投与による有害な影響は認められなかった。また、出生児の一般症状、形態測定、神経行動学的検査、骨格検査、臨床病理学的検査、リンパ球フェノタイピング、ANA 測定及び血清中免疫グロブリン測定では、生後 6 ヶ月まで Ipilimumab の投与に関連した有害な影響はみられなかった。

以上より、妊娠サルの器官形成期から分娩までに Ipilimumab を 10 及び 30 mg/kg の用量で 3 週間に 1 回投与した結果、胎児発生への影響が認められた。母動物で認められた変化は、10 mg/kg 以上での薬理作用を介した妊娠第 3 三半期の血清中 IgG の増加、30 mg/kg での妊娠期間の短縮のみであった。出生児においては、妊娠第 3 三半期の流産及び死産の増加、出生児の早期死亡及び出生児体重の低値が認められた。これらの結果より、母動物の一般状態に関する無毒性量は 30 mg/kg（母動物 AUC：115000 µg・h/mL）と推定され、胎児発生に関する無毒性量は決定できなかった[最小無毒性量(LOAEL)は 10 mg/kg、母動物 AUC：50500 µg・h/mL]。Ipilimumab は胎盤関門を通過して母動物から発達中の胎児へ移行する可能性があり、出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は出生後 3 ヶ月まで母動物と同等であった（出生児と母動物の血清中 Ipilimumab 濃度比：1.1 ± 0.6～1.7 ± 1.1）。サル生殖毒性試験の結果に基づき、Ipilimumab の妊娠中における使用は、治療上の有益性が胎児への危険性を上回らない限り避けるべきである。

4.6 局所刺激性

Ipilimumab の臨床投与経路は静脈内投与である。多くの臨床試験で使用された製剤（プロセス B）の局所刺激性をサルの反復静脈内投与試験で評価した。投与速度は臨床使用での投与時間 90 分（体重 60 kg の成人で 180 mg 投与の場合、最大 2 mg/分）より速い約 3～10 mL/min（最大 50 mg/min）で評価した。その結果、概して臨床投与速度の 25 倍まで安全性が確認された。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 抗原性／免疫原性

すべての重要な毒性試験及び一部の探索的試験において Ipilimumab 特異的抗体の産生を測定し、Ipilimumab の免疫原性を評価した。Ipilimumab を単剤及び数種の抗原、DNA ワクチン又は BMS-663513（抗 CD137 抗体）と併用投与したサルにおける ADA 抗体価陽性率は 8%（106 例中 9 例）であった。Ipilimumab 及び MDX-1106（抗 PD-1 抗体）の併用投与では、ADA 反応が 19 例中 6 例（32%）で認められ、サルにおいて MDX-1106 の免疫賦活作用により Ipilimumab に対する体液性免疫が増強されることが示唆された。反復投与毒性試験においては、抗体反応が認められたのは概して投与期間終了後であった。抗 Ipilimumab 抗体が存在すると、循環血液中の薬物クリアランスが上昇する傾向がみら

れた。[redacted] Ipilimumab（プロセス A）及び [redacted] Ipilimumab（プロセス B）、又はプロセス B 及びプロセス B の [redacted] を用い [redacted] して製造した Ipilimumab（プロセス C）の間に、免疫原性の差は認められなかった。

重要な毒性試験では、ADA の検出に関連した急性毒性や標的器官毒性はみられなかった。しかしながら、探索的薬理試験において 10 mg/kg の Ipilimumab 及び SIV DNA ワクチンをケタミン沈静下でおおよそ 2 回併用投与したサルのうち 1 例で Day 58 の Ipilimumab 投与後に infusion reaction が発現した。本例の infusion reaction は免疫原性（ADA 免疫複合体の形成）及び急速静注との関連性が考えられるが、その他の因子として麻酔による血圧低下及び併用投与したワクチンとの関連する可能性も考えられた。ヒト型蛋白質のヒトにおける免疫原性を動物試験によって予測することは困難であり、ヒトでの評価を必要とする。なお、ヒトでの評価では、Ipilimumab の免疫原性は低かった。

サルの ePPND 試験では、妊娠中～分娩後の期間で母動物の Ipilimumab に対する免疫原性陽性率は最大 26%であった。10 及び 30 mg/kg 群の母動物各 5 例に持続的な ADA 陽性反応が認められた。このうち、10 mg/kg 群の 5 例中 3 例及び 30 mg/kg 群の 5 例中 4 例に母動物の血清中 Ipilimumab 濃度への影響がみられ、その程度は軽微から顕著まで多様であった。ADA の生成と妊娠転帰との間に明らかな関連性はみられなかった。出生児では 2 例に ADA 陽性反応が認められたが、これらの出生児の母動物には ADA が同様に認められ、また、出生児の ADA 量及びその動態（薬物のクリアランスに一致した速やかな消失）から、これらの出生児でみられた ADA は母動物に由来し、出生前に移行したものであると考えられた。母動物由来の抗体は出生児に有害な影響を及ぼさなかった。

4.7.2 免疫毒性試験

Ipilimumab は選択的免疫調節作用を有するため、免疫機能へ影響を及ぼすことが予測された。Ipilimumab の免疫機能への影響は、サルの反復投与試験で評価した。反復投与毒性試験で実施する標準的な血液学的検査（白血球数及び分類）、血液生化学検査（グロブリン測定）、リンパ系組織の剖検及び病理組織学的検査に加え、免疫学的評価として末梢血リンパ球フェノタイピング（活性化 T 細胞及び制御 T 細胞サブセット）、脾臓、鼠径部リンパ節及び大腸上皮のリンパ球フェノタイピング、TDAR 検査、DTH 反応検査、ANA 測定並びに末梢血 T 細胞の *ex vivo* 刺激によるサイトカイン（IL-2、TNF- α 及び IFN- γ ）産生の細胞内染色を実施した。これらの評価の結果は反復投与毒性試験の項に記載した（4.2 項）。

また、Ipilimumab の免疫機能への影響をサルの ePPND 試験においても全般的に評価した。子宮内曝露を受けた出生児の標準的な血液学的検査（白血球数及び分類）、血液生化学的検査（グロブリン測定）、リンパ系組織の剖検及び病理組織学的検査に加え、免疫学的評価として末梢血リンパ球フェノタイピング（制御性 T 細胞サブセット）、血清中 Ig 測定、TDAR 評価及び ANA 評価を実施した。妊娠中から分娩後 6 ヶ月間の母動物の血清 IgA、IgM 及び ANA 量並びにリンパ球分類検査には Ipilimumab 投与に関連した影響は認められなかった。妊娠 125～127 日の投与 72 時間後に血清中 IgG 量の増加（対照群と比較して 1.2～1.4 倍）がみられたが、分娩後の休薬期間中に回復した。10 及び 30 mg/kg 群でみられた血清中 IgG 量の増加は、Ipilimumab の作用機序（免疫賦活）及びその作用である持続的な T 細胞活性化に一致した。しかし、これらの影響は軽度であり、母動物に関連した有害な所見を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

出生児における HBsAg に対する TDAR に Ipilimumab 投与による有害な影響はみられなかった。10 及び 30 mg/kg 投与群では、生後 6 週及び 18 週の抗原感作後、軽度な HBsAg 特異的抗体反応の亢進（1.6～1.8 倍）及び破傷風毒素特異的抗体反応の亢進（1.6～2.3 倍）が認められた。TDAR 反応の亢進は、Ipilimumab の作用機序（免疫賦活）及びその作用である持続的な T 細胞活性化と一致した変化であった。出生児のリンパ球フェノタイピング、ANA 測定及び血清中免疫グロブリン測定では、生後 6 ヶ月まで Ipilimumab の投与に関連した有害な影響はみられなかった。

4.7.3 依存性

Ipilimumab の標的特異性、結合プロファイル及びその分子サイズにより、通常の生理条件下では血液脳関門を通過しないと考えられ、薬物依存を誘発する中枢神経系への直接的な影響はないと判断したため、Ipilimumab の依存性試験は実施しなかった。

4.7.4 代謝物の毒性試験

Ipilimumab のようなモノクローナル抗体は、生態内で小さなペプチド分子やアミノ酸に P450 酵素に依存しない生物化学的な経路で分解されると考えられる。これらの代謝物は新規の物質ではなく、ヒトの生体中に存在する一般的な分子であるため、Ipilimumab の代謝物の毒性試験は実施しなかった。

4.7.5 不純物及び原薬関連分子種の安全性評価

Ipilimumab の毒性試験では、原薬と製剤の毒性を同時に評価した。品質に関する概括評価に記載した通り、Ipilimumab は純度の高い製剤である。原薬には製造工程の残留不純物又は通常の測定では検出不可能な未知の不純物が含まれると考えられるが、プロセスバリデーションにおいて、DNA、組み換えヒトインスリン、メトトレキサート、エンドトキシン及び宿主細胞由来蛋白質のような Ipilimumab の製造工程で生成したすべての不純物の含量が一様に低下したことを検証した。これらの結果より、製造工程由来不純物は安全性評価が必要な閾値（ICH-Q3A）未満であった。また、原薬及び製剤の出荷に際し、分解物や凝集物の存在を日常的に分析・検査している。以上より、不純物の毒性試験は実施しなかった。したがって、Ipilimumab の毒性試験で認められた毒性変化を、原薬及び製剤による総合的な所見として評価した。

4.7.6 *In vitro*細胞増殖及びサイトカイン放出評価

Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab と BMS-663513（抗 CD137 抗体）又は MDX-1106（抗 PD-1 抗体）との併用における末梢血単核細胞（PBMC）の増殖及びサイトカイン放出への影響を評価した。Ipilimumab 単剤又は BMS-663513 と併用した試験では安定化抗体アッセイとして、乾燥固定アゴニストアッセイ及び抗体結合アゴニストアッセイの 2 試験を実施した。また、Ipilimumab 単剤又は MDX-1106 と併用した試験では可溶化抗体アッセイで評価した。それぞれの試験では 10 例ずつの健康成人より提供された PBMC を試料として用いた。乾燥固定アゴニストアッセイでは、被験抗体を直接プレート上で乾燥して安定化し、抗体結合アゴニストアッセイでは被験抗体を抗ヒト Ig であらかじめ処理したプレートに結合させて安定化した。抗ヒト CD28 マウスモノクローナル抗体スーパーアゴニスト（5.11A1）又は抗 CD3 マウスモノクローナル抗体（UCHT-1）を陽性対照として使用し、試験法の比較に用いた。CD28 特異的モノクローナル抗体スーパーアゴニストであった TGN1412 は、ヒト白血球に加えてもその Fc 領域を溶液中でクロスリンクさせてもサイトカイン放出や細胞増殖作用を示さなかったが、健康

成人に重篤な炎症性サイトカイン放出を誘発したため、ヒトPBMCを用いた新規の*in vitro*試験法によってサイトカイン放出がレトロスペクティブに検証された^{59,60}。

Ipilimumab は、試料個別に実施した安定化抗体アッセイ系において PBMC の軽微な増殖誘導 [培養液のみの場合と比較した平均最大刺激指数 (SI) : 12] 及びサイトカイン放出作用 (IL-2、TNF- α 、IL-6 及び IL-8 ; 平均最大 SI : 2~6) を示した。これと比較して陽性対照である抗 CD28 抗体は顕著な増殖誘導 (平均最大 SI : 139) 及び比較的強いサイトカイン放出 (IFN- δ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 及び IL-8 ; 平均最大 SI : 4~124) をすべての試料で示した。可溶化アッセイ系における評価では、Ipilimumab はヒト PBMC のサイトカイン放出に影響を与えず、BMS-663513 及び MDX-1106 との併用により、可溶化・安定化アッセイ系いずれの評価でも相加・相乗作用を示さなかった。これらの結果は臨床試験において Ipilimumab 及び MDX-1106 がヒトで有害なサイトカイン放出を誘導しないという結果と一致していた。

4.7.7 併用投与毒性試験

カニクイザルに Ipilimumab を単剤又は BMS-663513 との併用により 1 ヶ月間間歇投与して毒性を評価した。Ipilimumab 単剤の 10 mg/kg/dose [AUC (0-63 日) : 102100 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$] 及び BMS-663513 の 100 mg/kg/dose [AUC (0-63 日) : 81900 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$] との併用において、毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

カニクイザルに Ipilimumab をおおよそ月 2 回 (投与日 : Days 4、9、30、32、58、60、86 及び 88) の頻度で BMS-663513 及び SIV DNA と併用投与した薬理試験で、各 10 mg/kg の Ipilimumab 及び BMS-663513 を SIV DNA と併用投与した 6 例中 1 例に DTH と考えられる鼠径部の皮膚炎及び発疹並びに末梢リンパ節周囲の腫脹が最終併用投与から約 4 週間後に認められた。発疹は抗ヒスタミン薬及びコルチコステロン薬により治療され、併用投与終了後 4 ヶ月以内に回復した。所見を認めた皮膚のバイオプシー検査の結果、真皮層下部の軽度の血管周囲浮腫及びリンパ球 (大部分は CD8+)、マクロファージ (CD68+) 及び肥満細胞の浸潤を伴う軽度の表皮の肥厚及び細胞増殖 (核増殖抗原 Ki67 陽性の増加) が認められた。バイオプシー検査の結果、病因となる感染症はみられなかった。これらの所見は DTH 反応の結果と相関していた。発疹の症状は Ipilimumab 及び BMS-663513 の双方においてヒトで臨床的に報告されていることから、これら薬剤の投与との関連性が考えられた。これらの試験の詳細は Ipilimumab 単剤の毒性評価として 4.2 項に記載した。

カニクイザル (1 群雌雄各 5 匹) に Ipilimumab 及び MDX-1106 (Ipilimumab/MDX-1106) を 0/0 (対照群)、3/10 (低用量併用群) 及び 10/50 mg/kg (高用量併用群) の用量で 4 週間 (qw $\times$ 4、投与日 : Day 1、8、15 及び 22) 静脈内投与した。血清中薬物濃度は Ipilimumab 又は MDX-1106 単剤の投与と同様であった。

低用量及び高用量併用群で、投与に関連した所見として、液状便発現頻度の増加 (高用量併用群では摂餌量の減少及び体重減少を伴う)、脾臓重量の増加、胸腺重量の減少、大腸 (粘膜固有層又は粘膜下組織) の用量依存性の炎症 (回復傾向あり) 及びその 2 次的変化と考えられるアルブミンの減少並びにグロブリン及び好中球数の増加、脾臓におけるごく軽微～軽度なリンパ濾胞の大きさ及び数の増加並びに辺縁帯の拡張、脾臓及びリンパ節 (鼠径部、下顎、腸管膜、大腸及び腋窩) のごく軽微～顕著な胚中心の大きさ及び細胞数の減少が認められた。また、リンパ系器官では、濾胞の崩壊、外套帯

の不整、濾胞全体のリンパ球の成熟化及び胚中心の胚中心芽球・リンパ球の減少（濾胞の不定形）が認められた。これらのリンパ系組織の変化の生物学的意義については、機能的には Ipilimumab 及び MDX-1106 の T 細胞活性化作用と一致した KLH に対する TDAR の軽度な亢進がいずれの用量群でも認められたことから、明らかでない。

高用量併用群では、フローサイトメトリーで循環血中総 T リンパ球及びヘルパー T 細胞の個体差の大きい増加が認められた。更に、Day 23 に死亡発見された雄 1 例では、顕著な胃内のガス貯留、急性の胃拡張に関連すると考えられる中等度の十二指腸、空腸、回腸、盲腸及び結腸のガスによる膨張（鼓脹）が認められた。鼓脹はサル其自然発生性の変化として知られており、Ipilimumab 又は MDX-1106 の投与との関連性はないと考えられるが、本例の死亡と Ipilimumab 又は MDX-1106 投与との因果関係の可能性は否定できなかった。

以上より、Ipilimumab 及び MDX-1106 をそれぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で併用投与した結果、それぞれの単剤を同様の用量で投与した試験で認められた所見と同様の irAE の発現頻度増加が認められた。これらの irAE はそれぞれの薬剤の薬理作用である免疫亢進作用による変化と考えられ、Ipilimumab を MDX-1106 と併用したときの免疫原性発生率（32%）は、Ipilimumab 単剤又は抗原ワクチン、DNA ワクチン若しくは BMS-663513 と併用投与した試験における発生率（8%）よりも高かった。

4.7.8 異なる製造工程による原薬（製剤）の比較試験

カニクイザルに [REDACTED] Ipilimumab（プロセス B）又は [REDACTED] Ipilimumab（プロセス A）を間歇静脈内投与し、薬物動態、免疫原性、生物活性（抗原特異的 T 細胞活性化）及び毒性プロファイルの同等性を確認する 79 日間間欠静脈内投与毒性試験を実施した。プロセス A は第 1 相及び第 2 相の一部の臨床試験に使用し、プロセス B は第 2 相の一部及び第 3 相の臨床試験に使用した。本試験では 1 群雌雄各 3 例のサルにプロセス A を 10 mg/kg の用量で Day 1、29 及び 57 に静脈内投与し、プロセス B を 0.1、1 及び 10 mg/kg の用量で Day 1、29 及び 57 に、1 mg/kg の用量で週 1 回 10 週間静脈内投与した。評価した項目において、両プロセスの Ipilimumab は同等の成績を示した。

更に、カニクイザルにプロセス B の [REDACTED] を用い、[REDACTED] して製造した Ipilimumab（プロセス C）又はプロセス B の Ipilimumab をそれぞれ単回静脈内投与し、薬物動態及び免疫原性プロファイルを評価した。その結果、両プロセスは毒性学的及び薬物動態学的に同等であることが示された。なお、予定市販製剤に用いられるプロセス C.1（[REDACTED] 及び [REDACTED] をより確実に除去するため、プロセス C の [REDACTED] のひとつを変更した製造工程）は、生物学的特性の分析結果からプロセス C による Ipilimumab との生物活性の同等性が示されている。

4.7.9 組織交差反応性

Ipilimumab のヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの細胞又は組織における交差反応性を免疫組織学的結合試験で評価した。Ipilimumab の組織への結合は、蛍光又はビオチン標識抗体を用いた 2 試験及びビオチン標識抗体を用いた別の試験で合計 36 種のヒト組織により評価し、試験間で概して一致した結果が得られた。ビオチン結合抗体は、合計 23 種のカニクイザル組織及びマウス、ラット及びウサギのリンパ組織を用いて動物種間の交差反応性を評価する試験にも利用した。

Ipilimumabはサル及びヒトのCTLA-4に特異的結合を示したが、通常毒性試験に用いられる動物種（マウス、ラット及びウサギ）のCTLA-4には特異的結合を示さなかった。特異的結合はカニクイザル及びヒトの胎盤の結合組織、消化管、リンパ系組織及び皮膚及びカニクイザルの卵巣組織に認められた。Ipilimumabがその他のヒト及びカニクイザルの組織と特異的結合を示さなかったことは、CTLA-4は主として活性化した単核細胞上に発現しているという報告と一致した⁶¹。

以上より、Ipilimumabはマウス、ラット及びウサギの組織には特異的に結合せず、カニクイザル及びヒトの一部の組織に特異的に結合し、カニクイザルとヒトに対する薬理作用の種特異性を示した。

4.7.10 新添加物の安全性評価

Ipilimumab 製剤の添加物のうち、 $\blacksquare$ mol/L 水酸化ナトリウム溶液、 $\blacksquare$ mol/L 塩酸溶液及びジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）は本邦において使用前例として認められている各添加物の規格に適合しないため、新添加物として安全性を評価した。また、DTPAの重金属試験の規格値（ $\blacksquare$ %）が比較的高値であることから、ICH 合意ドラフトガイドライン（Q3D ステップ 2b）「医薬品の金属不純物ガイドライン（2013年7月26日公開）」を参考に金属不純物についての安全性評価も実施した。なお、Ipilimumabの重要な反復投与毒性試験の一部及びePPND試験はこれらの添加物を含む調製済バイアルを用いた。

$\blacksquare$ mol/L水酸化ナトリウム溶液はpH調節剤として使用され、体重 60 kgの患者に対する1回の投与量はこれまでの製造実績より 3 mg（ $\blacksquare$ mol/L水酸化ナトリウム溶液として $\blacksquare$ mL）であり、これは医薬品添加物事典 2007に収載されている静脈内投与での最大使用量 600 mgを超えていない⁶²。

$\blacksquare$ mol/L塩酸溶液は緩衝液調製時にpH調節剤として使用される。 $\blacksquare$ mol/L塩酸溶液は同じくpH調節剤として使用される $\blacksquare$ mol/L水酸化ナトリウム溶液を過剰に加えた場合に使用され、これまでの製造実績より体重 60 kgの患者に対する1回の投与量は塩酸として最大で 0.7 μ Lである。 $\blacksquare$ mol/L塩酸溶液を使用する場合は非常に少量であり、医薬品添加物事典 2007に収載されている静脈内投与での塩酸の最大使用量である 0.256 mLを超えることはないと考えられる⁶³。

添加物として用いる DTPA の金属不純物については、 $\blacksquare$ の方法に準じた $\blacksquare$ により、規格値を $\blacksquare$ %以下と規定している。Ipilimumab 50 mg バイアル（10 mL）には DTPA が 0.39 mg 添加されており、金属不純物の規格値より DTPA 由来金属不純物含有量は最大 $\blacksquare$ μ g/g と推測される。これは ICH 合意ドラフトガイドライン（Q3D ステップ 2b）「医薬品の金属不純物ガイドライン（2013年7月26日公開）」の“1日投与量が 10 g 以下の注射剤製剤中の不純物濃度限度値”に規定されているすべての元素の限度値を下回る値であり、Ipilimumab 製剤に含有される DTPA の1回静脈内投与量において臨床使用上問題となる毒性は発現しないと考えられる。

DTPAの毒性は、公開されている文献情報^{64,65,66}により評価した。DTPAの毒性は、薬力学的作用である金属元素に対するキレート作用によりもたらされると推定されるが、Ipilimumab製剤に含有されるDTPA量は評価した毒性試験で用いられている用量と比較して十分に低く、金属が結合していないDTPAとカルシウム又は亜鉛錯体であるCa-DTPA及びZn-DTPAとの毒性の差（腹腔内投与のLD50値を指標とするとDTPAの毒性はCa-DTPAの約 11 倍）を考慮しても、十分な安全域があると考えられた。なお、臨床推奨用量である 3 mg/kgのIpilimumab製剤を3週間に1回投与した場合のDTPA摂取量は、体

重 60 kg のヒトで 1.40 mg/dose である。これは、静脈内投与での DTPA の使用実績 (8 mg) を超えていない⁶⁷。

以上の評価結果から、Ipilimumab 製剤に含有される $\blacksquare$ mol/L 水酸化ナトリウム溶液、 $\blacksquare$ mol/L 塩酸溶液及び DTPA の 1 回静脈内投与量において臨床使用上問題となる毒性は発現しないと考えられ、安全性は確認されたものと判断した。

5 総括及び結論

進行期悪性黒色腫は概して致死性の疾患であり、Ipilimumab の承認前には、進行期悪性黒色腫患者における生存期間中央値は 6～9 ヶ月であった。海外ではこれまでの標準薬 (DTIC、fotemustine) に代わり、Ipilimumab をはじめとした新規薬剤が生存期間の延長を示したことにより承認されている。国内では、進行期悪性黒色腫に対して DTIC が唯一の治療薬として高い頻度で使用されている。国内において、DTIC を対照群としたランダム化二重盲検比較試験はこれまで実施されておらず、DTIC 単独療法と比較して生存期間の延長が示されたものはない。既治療の進行期悪性黒色腫においても、生存期間の延長を示す治療薬は承認されておらず、緩和治療などにより治療されている現状である。このように、海外に比べ、国内では進行期悪性黒色腫に対する治療の選択肢も限られており、アンメットメディカルニーズは高く、進行期悪性黒色腫患者の長期の生存に寄与できる治療薬が望まれている。

Ipilimumab は、選択的に T 細胞を活性化させる新規機序を有する悪性腫瘍治療薬である。本薬は完全ヒト型モノクローナル抗体であり、活性化 T 細胞上に発現する CTLA-4 と APC 上に発現する B7.1 又は B7.2 分子間の相互作用を遮断する。その結果、CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 の結合によって誘発される T 細胞活性化の抑制性調節を阻害する。腫瘍特異的 T 細胞を介した適応免疫は、腫瘍の進行を妨げる免疫系の主要な機能の 1 つと考えられることから、抗腫瘍 T 細胞反応の増強は、がん治療の新規治療法となる。また、CTLA-4 の阻害は、Treg の機能を低下させ、腫瘍免疫反応を亢進させる^{6,7}。更に、Ipilimumab では、腫瘍組織における Treg 数を選択的に減少させ、その結果、腫瘍内の活性化 T 細胞数と Treg 数の比 (エフェクター T 細胞/Treg) が増加し、腫瘍細胞死を誘導すると考えられる^{12,13,14}。

エフェクター T 細胞の産生には、反応の大きさや持続性を調節する複数のシグナルの調整を必要とする。抗原刺激経験のないナイーブ T 細胞及び抗原刺激を受けた T 細胞の完全な活性化には CD28 の共刺激が必要である。CD28 の APC 上に存在する B7.1 又は B7.2 への結合は、T 細胞の増殖、サイトカインの産生を増加させ、T 細胞の生存性を亢進させる。続いて、T 細胞の反応を調節するために他の受容体が発現する。T 細胞反応の重要な抑制性調節因子としての CTLA-4 の役割は良く知られている。T 細胞が一度活性化されると、Treg 以外のナイーブ T 細胞の細胞内に局在していた CTLA-4 は細胞膜に移動し、CD28 と B7.1 及び B7.2 との結合に対して直接的に競合する。CTLA-4 は CD28 に比べてこれらリガンドに対してより高い親和性を有することから、CTLA-4 の発現が少なくとも CD28 と競合可能である。Treg 上の CTLA-4 は恒常的に発現しており、これら CTLA-4 の消失あるいは阻害により Treg の機能が低下することが知られている^{6,7,8}。また、近年、腫瘍組織内においてはエフェクター T 細胞上の CTLA-4 に比べて Treg 上の CTLA-4 数の方が著しく多いことから、FcγR との結合能力を有する抗 CTLA-4 抗体により Treg が選択的に減少し、更に、腫瘍の微小環境におけるエフェクター T 細胞/Treg の比が大きいほど抗腫瘍効果が高いことが報告されている^{12,13}。

In vivo 試験において、Ipilimumab による CTLA-4 の阻害は、サル及びヒトにおける T 細胞依存性抗原に対する抗原特異的抗体の産生増加及び SIV DNA ワクチンに対する T 細胞の増殖を亢進させ、これは無制限な CD28 の共刺激並びに CTLA-4 の B7.1 及び B7.2 分子への結合によって誘導される抑制性シグナルの除去によると考えられる。マウス腫瘍モデルにおいて、CTLA-4 阻害 mAb の投与は、腫瘍の増殖を遅延させ、また、定着した腫瘍を消失させる抗腫瘍免疫反応を誘導した。抗 CTLA-4 治療で効果がみられない腫瘍モデルにおいて、手術、ワクチン、放射線及び免疫調節薬などの様々な治療法と併用した場合、腫瘍増殖抑制における相乗効果が認められた。抗 CTLA-4 mAb の投与は、自己免疫疾患モデルマウスにおける自己抗原に対する免疫反応の増強にも関与していた。

腫瘍免疫における T 細胞の役割、T 細胞反応の抑制性調節における CTLA-4 の中心的機能、CTLA-4 mAb の非臨床腫瘍モデルにおける活性を示した多くの試験結果及び本項で紹介した *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果は、Ipilimumab がヒトのがん治療に対して有効であることを支持するものである。

カニクイザルにおける Ipilimumab の受容体及び組織との結合並びに薬物動態学的特性は、ヒトのそれらと類似していたことから、カニクイザルは Ipilimumab の毒性評価のための動物種として適切であることが示された。カニクイザルとヒトの両方において、Ipilimumab は主に血管内に分布し、半減期が長く、クリアランスの小さい薬物である。全身曝露量は用量に依存し、性差がなく、反復投与後の蓄積傾向はわずかであった。

CA184007 試験及び CA184008 試験で被験者に Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で静脈内投与したときの消失半減期は 227 ± 76.1 時間であり、サルにおける消失半減期 ($203 \pm 62.8 \sim 339 \pm 112$ 時間) と類似していた。したがって、カニクイザルに Ipilimumab をヒトと同様の投与間隔で投与したときの PK 評価は容認できると考えられた。

異なる製造方法（プロセス A、B 及び C）で製造された Ipilimumab の PK に違いはみられなかった。免疫原性試験で用いたカニクイザルの 8% が ADA 陽性反応を示し、一部の例では、ADA の発現と血液中 Ipilimumab 濃度減少との間に関連性が認められた。ADA の測定に Ipilimumab が干渉したことから、測定結果はカニクイザルにおける ADA 陽性反応の発現率の評価のみに用いられた。動物におけるヒト蛋白の免疫原性の発現はヒトに当てはまらないことから、ヒトにおける Ipilimumab の免疫原性の発現は、臨床試験で被験者から得られた血液試料を用いて検討された。

出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は分娩後 3 ヶ月までの母動物のそれと類似しており、母動物血清中濃度に対する出生児血清中濃度の比は $1.1 \pm 0.6 \sim 1.7 \pm 1.1$ の範囲であった。授乳中の母動物の乳汁中 Ipilimumab 濃度は低く、母動物血清中濃度に対する乳汁中濃度の比は $0.002 \sim 0.004$ の範囲であった。

サル 6 ヶ月間間歇投与毒性試験及び組織結合性を含む非臨床試験を実施した。これらの試験で最長 6 ヶ月間の投与を実施したすべての用量において Ipilimumab の忍容性は良好であり、標的器官毒性及び自己免疫を示唆する変化は概して認められなかった。非臨床試験では irAE と考えられる変化として、Ipilimumab を投与した 100 例以上のうち 2 例に大腸炎及び皮膚炎が認められた。Ipilimumab の薬理作用（CTLA-4 の自己免疫寛容調節の阻害）に関連した影響と考えられ、臨床的にヒトで報告されている主要な有害事象とも類似していた。また、Ipilimumab 及び MDX-1106 併用投与（qw×4）のそれぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で、それぞれの単剤を同様の用量で投与した試験結果と比較して irAE の発現頻度が増加していた。

カニクイザルにおける 6 ヶ月間間歇投与毒性試験で、Ipilimumab 投与に関連した毒性は認められなかった。更に、CTLA-4 ノックアウトマウスでは致死的なリンパ球増殖症が認められるが^{39,40,41}、サルで明確に免疫亢進作用が認められる用量である 10 mg/kg で長期間投与を行っても、末梢血及びリンパ系組織における過形成性、前過形成性及び悪性新生性の変化は認められなかった。

サルと同様に、ヒトでも Ipilimumab 投与に関連した irAE として主に消化管と皮膚の事象が報告されている。その他に報告されている臨床的な irAE（ブドウ膜炎、白斑、眼炎、下垂体炎/下垂体機能低下症、一次副腎機能低下症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、甲状腺機能低下症及び自己免疫肝炎）はサルの毒性試験では認められなかった。認められた irAE は概して炎症性の変化であり、大多数の患者で治療により回復した。臨床試験では下部消化管の irAE が多く報告され、下痢の徴候として現れた。Ipilimumab は GALT に発現した CTLA-4 と結合することがヒト及びサルの組織を用いた結合性試験で確認されており、これらの組織のリンパ球（T 細胞）は活性化状態で存在し、Ipilimumab による CTLA-4 阻害への感受性が高いことが示唆された。しかし、抗体による CTLA-4 機能の阻害は、末梢血の T 細胞サブセット（Treg）、非特異的 T 細胞活性化、ANA 量及び自己免疫を示唆する病理所見（2 例のサルに認められた大腸炎と皮膚炎を除く）に意義のある影響を及ぼさず、全身性の多臓器にわたる非特異的 T 細胞活性化及び増殖をサル反復投与試験で示さなかった。

カニクイザルの ePPND 試験では、妊娠サルに Ipilimumab を 21 日間隔で器官形成期開始から分娩まで、臨床用量 3 mg/kg におけるヒト曝露量（AUC）と比較して 3.2 倍（10 mg/kg）及び 7.3 倍（30 mg/kg）の用量で投与した。出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は出生後 3 ヶ月まで母動物と同等であった（出生児と母動物の血清中 Ipilimumab 濃度比：1.1 ± 0.6～1.7 ± 1.1）。母動物の乳汁中には微量の Ipilimumab が検出された（乳汁中と血清中 Ipilimumab 濃度比：0.002～0.004）。妊娠中～分娩後の期間で母動物の Ipilimumab に対する免疫原性陽性率は最大 26%であった。10 及び 30 mg/kg 群の母動物各 5 例に持続的な ADA 陽性反応が認められた。これらの動物における血清中の Ipilimumab 濃度への影響の程度は軽微から顕著まで多様であった。ADA の生成と妊娠転帰との間に明らかな関連性はみられなかった。出生児では 2 例に ADA 陽性反応が認められたが、これらの出生児の母動物には ADA が同様に認められ、また、出生児の ADA 量及びその動態（薬物のクリアランスに一致した速やかな消失）から、これらの出生児でみられた ADA は母動物に由来し、出生前に移行したものであると考えられた。母動物由来の抗体は出生児に有害な影響を及ぼさず、HBsAg 及び破傷風毒素に対する TDAR にも影響しなかった。

妊娠中から分娩後 6 ヶ月間の母動物の一般状態、摂餌量、体重、臨床病理学的検査、血清 IgA、IgM 及び ANA 量並びにリンパ球分類検査には Ipilimumab 投与に関連した影響は認められなかった。以前に実施したサルの反復投与試験で低頻度（全試験を通して 2 例）に認められた大腸炎や皮膚炎などの炎症性毒性変化は、本試験でより高い用量（30 mg/kg）を投与された母動物にも認められなかった。10 及び 30 mg/kg 群双方の母動物で妊娠 125～127 日の投与 72 時間後に血清中 IgG 量の増加（対照群と比較して 1.2～1.4 倍）がみられたが、分娩後の休薬期間中に回復した。10 及び 30 mg/kg 群でみられた血清中 IgG 量の増加は、Ipilimumab の作用機序（免疫賦活）及びその作用である持続的な T 細胞活性化に一致した。しかし、これらの影響は軽度であり、母動物に関連した有害な所見を伴わなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

妊娠の第 1 三半期及び第 2 三半期では、妊娠への影響はみられず、妊娠転帰には対照群と Ipilimumab 投与群との間で差はみられなかった。一方、主に妊娠の第 3 三半期（妊娠 100 日以降）では、胎児死

亡率（10 及び 30 mg/kg で 21% 及び 30%）が対照群（0%）及び施設背景値（17.6%）と比較して上昇し、その多くは分娩の予定日に近い時期に（妊娠 140 日以降）に認められた（10 及び 30 mg/kg で 16% 及び 20%、施設背景値 10.6%）。妊娠後期（妊娠 101 日～分娩）の全出産において、Ipilimumab の 30 mg/kg 投与により妊娠期間が軽度に短縮（30 mg/kg 群：151 日、対照群：160 日、10 mg/kg 群：156 日）し、早産が増加した。

妊娠第 3 三半期に妊娠損失した母動物及び死亡した出生児について、胎盤、臍帯及び胎児・出生児自体を病理学的に検査したが、Ipilimumab に関連した死亡及び流産の原因は解明できなかった。新生児死亡は、母動物の哺育行動低下及び全般的な新生児のストレスが重要な要因と考えられ、これらの死亡例のうち、対照群の 2 例中 2 例、10 mg/kg 群の 3 例中 1 例及び 30 mg/kg 群の 4 例中 1 例では、哺育拒否がみられた。しかし、哺育行動の問題のみで新生児死亡の全例及び多数の妊娠損失について説明できなかった。妊娠第 3 三半期の胎児死亡及び出生児死亡の病理学的検査結果から、非特異的な発育障害の可能性が考えられた。また、本試験で認められた妊娠第 3 三半期の妊娠損失、妊娠期間の短縮、早産、出生児の死亡、Ipilimumab の作用機序（CTLA-4 の阻害による免疫賦活化）及び胎盤での標的の局在を併せて考慮すると、本試験でみられた胎児・出生児死亡の増加は Ipilimumab の母動物における薬理作用の 2 次的な影響と関連している可能性があった。

更に、泌尿生殖器の奇形が 30 mg/kg 群の出生児 2 例に認められた。1 例（雌）では左側腎臓及び尿管の片側性欠損、他の 1 例（雄）では尿路閉塞及び皮下の陰嚢浮腫と関連した尿道無開口が認められた。これらの 2 例以外に泌尿生殖器の影響は認められず、出生児の器官重量、心臓、病理組織学的検査所見及び骨格検査所見に Ipilimumab に関連した影響はみられなかった。

30 mg/kg 群の出生児に出生時体重の低値（対照群と比較して-15%）がみられた。しかし、本群では体重増加率が生後 3 ヶ月まで対照群を上回り、生後 6 ヶ月では 30 mg/kg 群の出生児の平均体重は対照群と同等となった。

出生児の生後 6 週及び 18 週における HBsAg に対する TDAR に Ipilimumab 投与による有害な影響はみられなかった。また、出生児の一般症状、形態測定、神経行動学的検査、骨格検査、臨床病理学的検査、リンパ球フェノタイピング、ANA 測定及び血清中免疫グロブリン量測定では、生後 6 ヶ月まで Ipilimumab の投与に関連した有害な影響はみられなかった。

CTLA-4 ノックアウトマウスにおいて致死的なリンパ球増殖症が認められることから、CTLA-4 は T 細胞反応の主要な抑制性制御因子と考えられる。しかし、妊娠サルにおいて、妊娠期間中の Ipilimumab 投与による CTLA-4 機能の阻害は、出生児を 6 ヶ月齢まで検査した全身性の多臓器自己免疫病変や T 細胞サブセットの変化を引き起こさなかった。出生時の免疫応答性は正常であり、6 週齢までに TDAR を示した。また、ANA 量にも影響はみられなかった。したがって、CTLA-4 阻害の影響は、受胎時の遺伝子の完全な消去（ノックアウト）とは異なると考えられた。

以上より、これらの非臨床毒性試験の結果は、進行期悪性黒色腫患者を対象とした Ipilimumab の静脈内投与治療の安全性を担保するものである。サル生殖毒性試験の結果に基づき、Ipilimumab の妊娠中又は妊娠の可能性のある女性における使用は、治療上の有益性が胎児への危険性を上回らない限り避けるべきであり、妊娠の可能性のある女性への投与では、適切な避妊法を実施するべきである。

6 参考文献

- ¹ Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, May-2001. US Food and Drug Administration.
- ² Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: New insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol.* 2002; 3(7):611-618.
- ³ McGaha T, Murphy JW. CTLA-4 down-regulates the protective anticytotoxic cell-mediated immune response. *Infect Immun.* 2000; 68(8):4624-4630.
- ⁴ Gomes NA, Barreto-de-Souza V, Wilson ME, et al. Unresponsive CD4+ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *J Infect Dis.* 1998; 178(6):1847-1851.
- ⁵ Riley JL, Schlienger K. Modulation of susceptibility to HIV-1 infection by the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 costimulatory molecule. *J Exp Med.* 2000; 191(11):1987-1997.
- ⁶ Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008; 322(5899):271-275.
- ⁷ Read S, Greenwald R, Izcue A, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol.* 2006; 177(7):4376-4383.
- ⁸ Birebent B, Lorho R, Lechartier H, et al. Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol.* 2004; 34(12):3485-3496.
- ⁹ Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, et al. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 2009. 206(8):1717-1725.
- ¹⁰ Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol.* 2005; 175(11):7746-7754.
- ¹¹ O'Mahony D, Morris JC, Quinn C, et al. A pilot study of CTLA-4 blockade after cancer vaccine failure in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3):958-964.
- ¹² Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res.* 2013; 1:32-42
- ¹³ Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013; 210(9):1695-1710.
- ¹⁴ Liakou CI, Kamat A, Tang DN, et al. CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4+ICOS^{hi} cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(39):14987-14992.

- 15 Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, et al. The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas. *Br J Cancer*. 1998; 78:478-483.
- 16 Tang Y, Lou J, Alpaugh RK, et al. Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. *J Immunol*. 2007; 179(5):2815-2823.
- 17 Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, et al. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(18 Pt 1):6248-6255.
- 18 Shields RL, Lai J, Keck R, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002; 277(30):26733-26740.
- 19 Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006; 313(5787):670-673.
- 20 Preithner S, Elm S, Lippold S, et al. High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol Immunol*. 2006; 43(8):1183-1193.
- 21 Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(14):8372-8377.
- 22 Attia P, Phan GQ, Maker AV, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anticytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol*. 2005; 23(25):6043-6053.
- 23 Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:739-766.
- 24 Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 5512-5516.
- 25 Lin YS, Nguyen C, Mendoza J-L, et al. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. *J Pharm Exp Ther*. 1999; 288(1): 371-378.
- 26 Adams CW, Allison DE, Flagella K, et al. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:717-727.
- 27 Working PK. Potential effects of antibody induction by protein drugs. In: Ferraiolo BL, Mohler MA, Gloff CA, eds. *Protein Pharmacokinetics and Metabolism*. New York: Plenum Press, 1992, pp 73-92.

- ²⁸ Tang L, Persky AM, Hochhaus G, et al. Pharmacokinetic Aspects of Biotechnology Products. *J Pharmaceut Sci.* 2004; 93:2184-2204.
- ²⁹ Guideline on the Clinical Investigation of the Pharmacokinetics of Therapeutic Proteins. (CHMP/EWP/89249/2004), 24 Jan 2007. European Medicines Agency.
- ³⁰ Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993; 10:1093-1095.
- ³¹ Humira® (adalimumab) Product Label. Abbott Laboratories, North Chicago, IL 60064. 2008.
- ³² Zenapax® (daclizumab) Product Label. Roche, Nutley, NJ. 2005.
- ³³ Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, et al. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4⁺ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J Immunol.* 1995; 155(3):1032-1036.
- ³⁴ Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 1995; 182(2):459-465.
- ³⁵ Krummel MF, Sullivan TJ, Allison JP. Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo. *Int Immunol.* 1996; 8(4):519-523.
- ³⁶ Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994; 1(5):405-413.
- ³⁷ Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, et al. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 1997; 6(4):411-417.
- ³⁸ Korman A, Yellin M, Keler T. Tumor immunotherapy: Preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; 6(6):582-591.
- ³⁹ Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4⁺ T cells. *Immunity.* 1997; 7(6):885-895.
- ⁴⁰ Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995; 3(5):541-547.
- ⁴¹ Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science.* 1995; 270(5238):985-988.
- ⁴² Finch G, Hanson D, Wang F, et al. Toxicology studies to support clinical development of tremelimumab, a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) blocking monoclonal antibody (abstr 2322). Society of Toxicology, Seattle, WA; 2008. *The Toxicologist.* 2008; 102(No. S-1): 478.
- ⁴³ アービタックス®注射液 100mg (セツキシマブ) 添付文書, 第 6 版. 2013.

- 44 リツキサン®注 10mg/mL (リツキシマブ) 添付文書, 第 17 版. 2013.
- 45 アバスチン®点滴静注用 100mg/4mL, アバスチン®点滴静注用 400mg/16mL (ベバシズマブ) 添付文書, 第 15 版. 2013.
- 46 ハーセプチン®注射用 60, ハーセプチン®注射用 150 (トラスツズマブ) 添付文書, 第 24 版. 2014.
- 47 Sanderson K, Scotland R, Lee P, et al. Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23:741-750.
- 48 Maker AV, Yang JC, Sherry RM, et al. Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2006; 29:455-463.
- 49 Soetens FM. Anaphylaxis during anaesthesia: diagnosis and treatment. *Acta Anaesthesiol Belg.* 2004; 55(4):229-237.
- 50 Mertes PM, Laxenaire MC. Allergic reactions occurring during anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol.* 2002; 19(4):240-262.
- 51 Yoshizawa K, Oishi Y, Matsumoto M, et al. Ischemic brain damage after ketamine and xylazine treatment in a young laboratory monkey (*Macaca fascicularis*). *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2005; 44(5):19-24.
- 52 Ochsner AJ. Cardiovascular and respiratory responses to ketamine hydrochloride in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Lab Anim Sci.* 1977; 27(1):69-71.
- 53 Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, et al. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(12):3782-3789.
- 54 Mayer L, Young Y. Infusion reactions and their management. *Gastroenterol Clin N Am.* 2006; 35:857-866.
- 55 ヒュミラ®皮下注 20mg シリンジ 0.4mL, ヒュミラ®皮下注 40mg シリンジ 0.8mL (アダリムマブ) 添付文書, 第 18 版. 2014.
- 56 オレンシア®点滴静注用 250mg (アバタセプト) 添付文書, 第 4 版. 2013.
- 57 エンブレル®皮下注 25mg シリンジ 0.5mL, エンブレル®皮下注 50mg シリンジ 1.0mL (エタネルセプト) 添付文書, 第 14 版. 2014.
- 58 レミケード®点滴静注用 100 (インフリキシマブ) 添付文書, 第 28 版. 2014.
- 59 Stebbings R, Findlay L, Edwards C, et al. "Cytokine Storm" in the Phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: Better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol.* 2007; 179:3325-3331.

- ⁶⁰ Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a Phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006; 355:1018-1028.
- ⁶¹ Alegre ML, Noel PJ, Eisfelder BJ, et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol*. 1996; 157:4762-4770.
- ⁶² 水酸化ナトリウム. In, 医薬品添加物事典 2007. 日本医薬品添加剤協会 ed. 薬事日報社, Tokyo. 2007; 146-147.
- ⁶³ 塩酸. In, 医薬品添加物事典 2007. 日本医薬品添加剤協会 ed. 薬事日報社, Tokyo. 2007; 45.
- ⁶⁴ ジトリペントートカル静注 1000 mg／アエントリペントート静注 1055 mg に関する資料. 非臨床試験の概要文及び概要表 (NDA154-342), 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA); July, 2011 (CTD 2.6.6).
- ⁶⁵ Srivastava RC, Dwivedi PP, Behari JR, et al. Evaluation of LD₅₀ some polyaminocarboxylic acids used as chelating drugs in metal intoxication. *Toxicol Lett*. 1986; 32:37-40.
- ⁶⁶ Tandon SK, Srivastava L. Chelation in metal intoxication XVII: Antidotal efficacy of polyaminocarboxylic acids on acute chromate toxicity. *Arch Toxicol*. 1985; 57:212-213.
- ⁶⁷ ジエチレントリアミン五酢酸. In, 医薬品添加物事典 2007. 日本医薬品添加剤協会 ed. 薬事日報社, Tokyo. 2007; 123-124.