CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ブリストル・マイヤーズ株式会社

1 緒言

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 は 4 つのポリペプチド鎖、すなわち 2 つの同一重鎖と 2 つの同一 κ 軽鎖で構成され、鎖間がジスルフィド結合によって結合している。Ipilimumab の構造と N-オリゴ糖類、主要末端及びジスルフィド結合の位置を図 1-1 に示した。

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。

薬理試験において、Ipilimumab は CTLA-4 の阻害により抗原特異的な免疫反応を増強し、また、腫瘍増殖を抑制した。すなわち、Ipilimumab はカニクイザルにおけるウイルス抗原（HBsAg）、細胞ワクチン（Sk-mel）及びキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に対する抗体反応を有意に増強させ、また、サル免疫不全ウイルス（SIV）DNA ワクチンに対する反応である T 細胞の増殖を亢進させた。更に、ヒト CTLA-4 を発現したトランスジェニックマウスに移植した MC38 腫瘍の増殖を抑制した。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果から、Ipilimumab の悪性腫瘍を適応とする CTLA-4 免疫チェックポイント阻害薬としての有効性が示された。

本申請における効能又は効果及び用法及び用量の案は以下のとおりである。

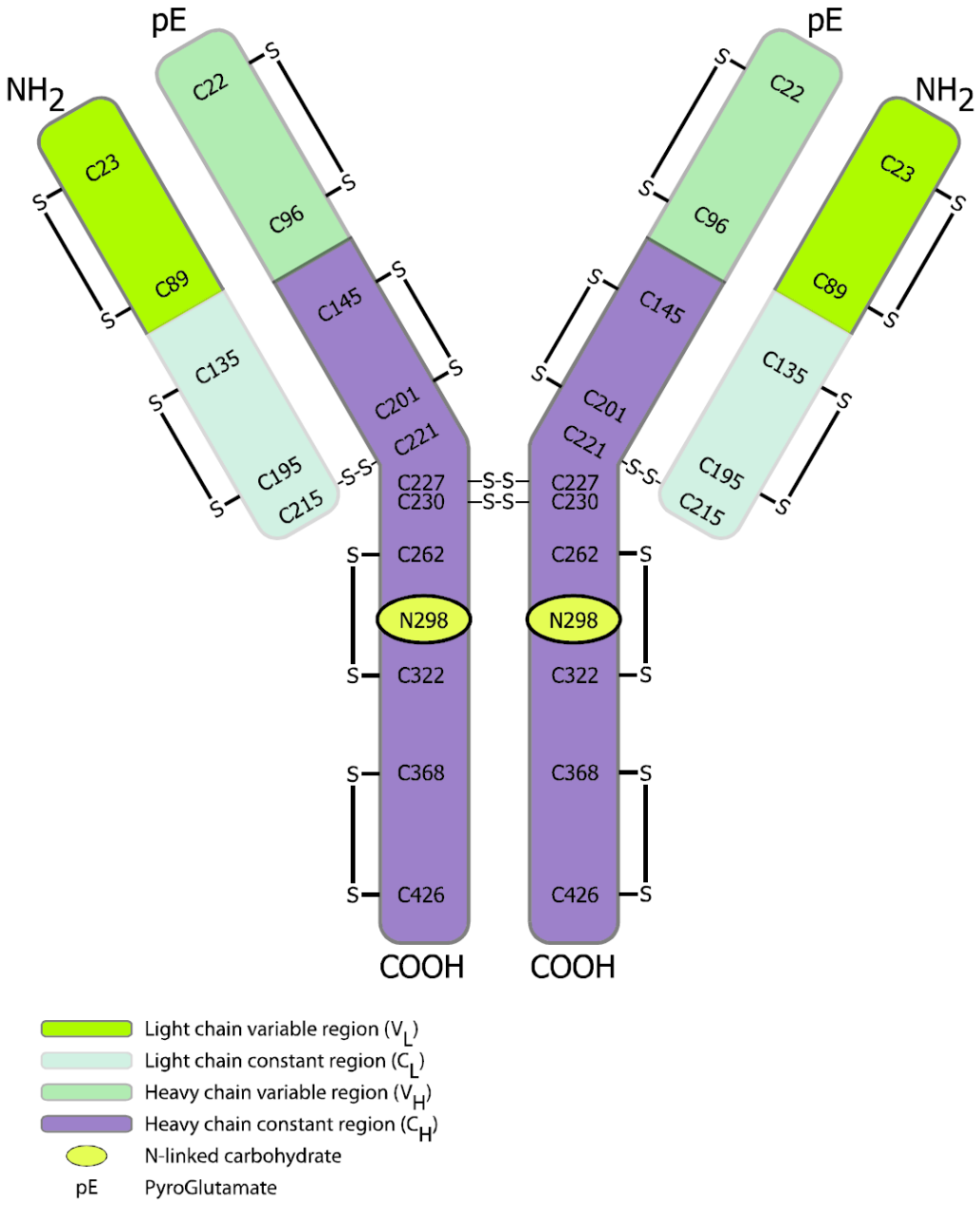
【効能又は効果】

切除不能又は転移性悪性黒色腫

【用法及び用量】

通常、成人には、イピリムマブ（遺伝子組換え）として 1 回量 3 mg/kg を点滴静注し、3 週間間隔で 4 回投与する。

図 1-1 Ipilimumabの構造



CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ブリストル・マイヤーズ株式会社

用語及び略語一覧

略号・用語	定　義	
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
B7-H3, B7-H4	a ligand belonging to the B7 family of molecules	B7 ファミリー分子のリガンド
BMS	Bristol-Myers Squibb	ブリストル・マイヤーズ スクイブ社
CD	cluster designation	クラスター分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester	カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル
CpG	oligonucleotide CpG	オリゴヌクレオチド CpG
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
EC_{50}	effective concentration required to induce a 50% effect	50%有効濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫吸着測定
ELISPOT	enzyme-linked immune spot	酵素免疫スポット法
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
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
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HBsAg	hepatitis virus B surface antigen	B 型肝炎ウイルス表面抗原
HLA-DR	human leukocyte antigen DR-1	ヒト白血球型抗原 DR-1
IV	intravenous	静脈内
IFN	interferon	インターフェロン
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL-2	interleukin-2	インターロイキン 2
IM	intramuscular	筋肉内

略号・用語	定　義	
IP	intraperitoneal	腹腔内
irAE	immune-related adverse event	免疫関連有害事象
K_D	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
K_{off}	dissociation rate	解離速度
K_{on}	association rate	結合速度
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
mAbRSV	monoclonal antibody to respiratory sincytial virus	呼吸器合胞体ウイルス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
NK	natural killer cells	ナチュラルキラー細胞
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核球
PD-1	programmed cell death-1 (CD279)	プログラム細胞死-1
PR	beginning of P wave to beginning of Q wave in the electrocardiogram	心電図における P 波の始点から Q 波の始点まで
QRS	beginning of the Q wave to end of S wave in the electrocardiogram	心電図における Q 群の始点から S 波の終点まで
QT	beginning of the QRS complex to end of T wave in the electrocardiogram	心電図における QRS 群の始点から T 波の終点まで
SC	subcutaneous	皮下
SCID	severe combined immunodeficient	重症複合型免疫不全
SIV	simian immunodeficiency virus	サル免疫不全ウイルス
SK-mel	a human melanoma cell	ヒト悪性黒色腫細胞
TCR	T cell receptor	T 細胞受容体
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子 α
Treg	regulatory T cells	制御性 T 細胞

目次

1 まとめ 6

2 効力を裏付ける試験 7

2.1 マウス腫瘍モデルにおける抗マウス CTLA-4 抗体の抗腫瘍効果 7

2.2 CTLA-4 阻害によるマウスの実験的自己免疫の発現増強 8

2.3 Ipilimumab の作用機序 9

2.3.1 ヒト CTLA-4 に対する結合 9

2.3.2 Ipilimumab による CTLA-4 の B7.1 及び B7.2 に対する結合阻害 11

2.3.3 Ipilimumab による活性化 T 細胞の補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）の in vitro 評価 12

2.3.4 Ipilimumab の in vivo 活性 14

2.3.4.1 ヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスにおける Ipilimumab の抗腫瘍活性 14

2.3.4.2 カニクイザルにおける T 細胞依存性抗原に対する免疫反応の増強 15

2.3.4.3 B 型肝炎ウイルス表面抗原及び悪性黒色腫ワクチンに対する免疫反応の増強 18

2.3.4.4 Ipilimumab による KLH に対する抗体反応の増強 22

2.3.4.5 DNA ワクチンに対する免疫反応の調節 23

3 副次的薬理試験 27

4 安全性薬理試験 27

5 薬力学的薬物相互作用試験 28

6 考察及び結論 30

7 参考文献 31

表一覧

Table 2.1-1: 抗マウス CTLA-4 抗体を用いて実施した効力に関する試験 7
Table 2.3.1-1: Ipilimumab 標準品（[redacted]022 Ref Std）の結合キネティックパラメータ 9
Table 2.3.4.2-1: ヒト及びサルの CTLA-4 に対する Ipilimumab の結合性 15
Table 2.3.4.2-2: カニクイザルを用いた薬理試験の要約 16
Table 2.3.4.4-1: Ipilimumab 及び BMS-663513 を併用投与したサルにおける KLH 特異的抗体反応 22

図一覧

Figure 2.3.1-1: ELISA 法による Ipilimumab の組換えヒト CTLA-4 抗原に対する結合 10
Figure 2.3.1-2: Ipilimumab の T 細胞上にトランスフェクトした CTLA-4 に対する結合 11
Figure 2.3.2-1: Ipilimumab による CTLA-4 の B7.1（CD80）及び B7.2（CD86）に対する結合阻害 12
Figure 2.3.4.1-1: Ipilimumab のヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスにおける MC38 腫瘍に対する増殖阻害作用 14
Figure 2.3.4.3-1: カニクイザルにおける Ipilimumab による B 型肝炎ウイルス表面抗原ワクチンに対する抗体反応の増強 18
Figure 2.3.4.3-2: カニクイザルにおける Ipilimumab による SK-mel GM-CSF ワクチンに対する液性免疫反応の増強 20
Figure 2.3.4.5-1: SIV ペプチドに対する IFN-γ ELISpot 反応 24
Figure 2.3.4.5-2: SIV ペプチドに対する反応における CD8+ T 細胞の増殖 25
Figure 2.3.4.5-3: SIV ペプチドに対する反応における CD4+ T 細胞の増殖 26

1 まとめ

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 CTLA-4 に高い親和性を示し（K_D = 5.25 ± 3.62 nM）、また、*in vitro* 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 μg/mL で阻害した（最大阻害作用は、それぞれ 6～20 μg/mL 及び 1～3 μg/mL）。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。また、Ipilimumab は FcγRIIA 又は FcγRIII に比べ、FcγRI に対してより強力に結合し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）は軽度～中等度であったが、*in vivo* の非臨床試験及び臨床試験の結果では、活性化 T 細胞を減少させないことが示された。ヒト CTLA-4 を発現したトランスジェニックマウスにおいて、Ipilimumab は大腸癌細胞株の増殖を抑制した。カニクイザルを用いた試験では、Ipilimumab は B 型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）ワクチン、ヒト悪性黒色腫細胞ワクチン及びキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に対する抗体反応を増強させ、また、DNA ワクチンに対する CD4+及び CD8+T 細胞の増殖を亢進させた。本概要で示した試験結果は、Ipilimumab が *in vitro* 及び *in vivo* において CTLA-4 免疫チェックポイント阻害薬としての有効性を有することを示している。

免疫監視機構における T 細胞の役割とヒトにおけるがんの排除及び腫瘍免疫における CTLA-4 の機序については多くの論文で報告されている。また、CTLA-4 阻害抗体の抗腫瘍効果の概念実証（proof of concept）は、マウス特異的 CTLA-4 阻害抗体の複数の腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫反応の誘発効果に関する文献により示されている。これらの報告及び結果を以下に要約した。

- T 細胞は有効な抗腫瘍免疫反応の誘導において重要な役割を担う。
- 共刺激性及び共抑制性受容体を介したシグナル伝達は、抗原特異的 T 細胞反応の大きさを調節する。
- CTLA-4 は T 細胞を介した免疫反応の抑制性調節因子として重要な機能を有する。抗マウス CTLA-4 抗体による CTLA-4 の阻害は、実験的自己免疫疾患の症状を悪化させ、また、抗腫瘍免疫反応を増強させ、腫瘍増殖の遅延又は腫瘍の消失をもたらす。
- 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。
- Ipilimumab は CTLA-4 と B7.1 及び B7.2 との結合を阻害することによって CTLA-4 のシグナル伝達を阻害する。
- Ipilimumab による CTLA-4 の阻害は、ヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスモデルにおいて抗腫瘍免疫反応を誘導し、また、T 細胞依存性抗原に対する体液性免疫反応を増強させ、さらに、カニクイザルにおける DNA ワクチンに対する CD4+及び CD8+T 細胞の増殖を亢進させる。
- 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。

2 効力を裏付ける試験

2.1 マウス腫瘍モデルにおける抗マウスCTLA-4 抗体の抗腫瘍効果

Ipilimumab はマウス CTLA-4 とは結合しないことから、CTLA4 阻害による抗腫瘍活性は、マウス腫瘍モデルに抗マウス CTLA-4 mAb を用いた多くの試験によって裏付けられた。これらの試験には、マウス CTLA-4 受容体に特異的な 2 種類の CTLA-4 阻害 mAb を用いた複数の研究施設で実施された試験が含まれる [1),2)]。これらの抗体がマウス CTLA-4 の B7 分子への結合阻害により、インターロイキン 2（IL-2）の産生、IL-2 受容体の発現及び活性化 T 細胞の細胞分裂を亢進させることが *in vitro* 試験において示された [1),2),3),4)]。

In vivo 試験において、抗マウス CTLA-4 mAb は免疫原性の高い腫瘍に対して単剤治療で、あるいは免疫原性の低い又は無い腫瘍に対して他の治療法との併用で抗腫瘍活性を示した（Table 2.1-1）。抗マウス CTLA-4 mAb の投与は、皮下移植した腫瘍の増殖遅延又は腫瘍の完全な退縮をもたらした [5),6),7),8)]。初回移植の際に腫瘍を拒絶したマウスでは免疫記憶反応が生じ、2 回目の腫瘍移植では腫瘍の増殖は阻止される。

マウス腫瘍モデルにおける抗 CTLA-4 mAb の抗腫瘍反応は、概して腫瘍組織量が少ない場合に 100～200 μg/匹（約 5～10 mg/kg）の用量を 2～4 回投与した後に認められた。また、抗 CTLA-4 mAb の単剤投与では最小の活性しか示さなかった腫瘍モデルにおいて、本抗体をワクチン [9),10),11),12),13),14),15),16)]、他の免疫調節抗体【モジュール 4.2.1.1-22】【モジュール 4.2.1.1-15】【モジュール 4.2.1.1-16】【モジュール 4.2.1.1-17】【モジュール 4.2.1.1-18】[17),18),19)]、手術 [20)]、化学療法 [21)]及び放射線療法 [22)]等の様々な治療法と併用した場合、抗腫瘍活性の増大が観察された。免疫原性の無い腫瘍である B16 マウス悪性黒色腫瘍株は、抗 CTLA-4 mAb の単剤では有効性がみられず、他の治療法との併用でのみ効果が認められた [15),16)]。

CTLA-4 の阻害が慢性炎症中にしばしば発現する不応答性 T 細胞を応答性に変えるという仮説は、T 細胞免疫寛容（特定抗原に対する特異的免疫反応の欠如あるいは抑制状態のこと）における CTLA-4 の役割を示すデータによって裏づけられる。実際、抗 CTLA-4 mAb と GM-CSF ワクチンとの併用投与は、T 細胞免疫寛容状態にある前立腺癌自然発症トランスジェニックマウスモデルにおける腫瘍発生率を低下させた [13)]。

一方、CTLA-4 の阻害に関連した活性が、CD8+ T 細胞（数種のモデルでは CD4+ T 細胞及び IFN-γ）の増加に依存することが複数報告されている [8),22)]。また、CTLA-4 の阻害は CD4+ T 細胞及び IL-2 を介して CD8+ T 細胞の免疫寛容を解除した。本結果は免疫寛容状態の CD8+細胞傷害性 T 細胞（CTL）を CTLA-4 の阻害により再活性化させることの証拠となるものである [23)]。

Table 2.1-1: 抗マウスCTLA-4 抗体を用いて実施した効力に関する試験

腫瘍の種類	腫瘍株	抗腫瘍反応
線維肉腫	Sa1N, CSA1M	単剤又は免疫調節抗体との併用投与により増殖期の腫瘍を退縮させた【モジュール 4.2.1.1-17】【モジュール 4.2.1.1-22】[5),6),8)]。
大腸癌	51Blim	単剤投与で非増殖期及び増殖期の腫瘍に対して活性を示した [5)]。

	MC38, CT26	MC38：単剤投与で効果なし。CpG ODN とワクチン又は免疫調節抗体との併用投与で効果を示した【モジュール 4.2.1.1-15】[11),18)]。 CT26：単剤投与で有意な効果あり。免疫調節抗体又はワクチンとの併用投与で効果が増大した【モジュール 4.2.1.1-16】[9)]。
乳癌	SM1, 4T1	単剤投与で活性を示さなかったが、SM1/GM-CSF 又は放射線との併用投与で反応が増大した[12),22)]。
前立腺癌	TRAMP, TRAMP C1 (pTC1), TRAMP C2	単剤投与で腫瘍増殖を遅延又は腫瘍を消失させた[7)]。
	TRAMP	トランスジェニックマウスモデルにおいて TRAMP/GM-CSF ワクチンとの併用投与により腫瘍発生を阻害した[13)]。
	TRAMP C2	単剤投与で原発腫瘍の外科的切除後の転移を阻害した[20)]。
卵巣癌	OV-HM	単剤投与で非増殖期の腫瘍の消失、Day 3 又は Day 7 で増殖遅延、Day 14 で作用なし[6)]。
形質細胞腫	MOPC-315	単剤投与で非増殖期の腫瘍に活性を示さなかったが、melphalan との併用投与で生存期間を延長させた[21)]。
肉腫	Meth A	生存率：単剤投与で 20%、p53 を発現している牛痘ウイルス併用投与で 80%[14)]
	Meth A	抗 GITR 抗体との併用投与で相乗効果を示した[17)]。
悪性黒色腫	B16	単剤で活性を示さなかったが、B16/GM-CSF ワクチン[15)]又は Trp-2 ペプチドワクチン及び CpG との併用で増殖を遅延させた[16)]。

マウス腫瘍に対する抗マウス CTLA-4 抗体の有効性に加え、重症複合型免疫不全（SCID）マウスのヒトキメラモデルにおいて 2 種類の抗ヒト CTLA-4 抗体の有効性が示された[24)]。このモデルでは、ヒト腫瘍細胞を、健康成人又は腫瘍提供者由来の末梢血白血球と共に SCID マウスに移植した。これらのマウスに抗ヒト CTLA-4 抗体を投与すると、いずれの末梢血白血球の移植条件でも腫瘍増殖が抑制された。また、SCID マウスに健康成人の末梢血白血球を移植した同様の実験系においても、ヒト特異的 CTLA-4 阻害抗体は移植したヒト CD4＋及び CD8＋ T 細胞の増殖を介してウイルス誘発リンパ腫の増殖を阻害した[25)]。

以上、抗マウス又は抗ヒト CTLA-4 特異的 mAb を用いた試験結果から、選択的な CTLA-4 シグナル伝達阻害が腫瘍の増殖を抑制することが示され、その作用は内因性あるいは他の治療法による抗腫瘍免疫反応の増強によるものと考えられた。Ipilimumab は、抗マウス CTLA-4 抗体を用いた試験と同様に、CTLA-4 と B7.1 又は B7.2 との相互作用を阻害することにより抗腫瘍免疫反応を増強すると考えられる。

2.2 CTLA-4 阻害によるマウスの実験的自己免疫の発現増強

CTLA-4 は T 細胞免疫介在性反応及び末梢性免疫寛容の抑制性調節因子であることから、非臨床における CTLA-4 の免疫反応への関与はマウスの自己免疫疾患モデルで研究されてきた。抗 CTLA-4 mAb の投与は、実験的自己免疫性大腸炎、脳脊髄炎、神経炎及び糖尿病などの T 細胞を介した病態を促進・悪化させることが示されている【モジュール 4.2.1.1-21】【モジュール 4.2.1.1-19】【モジュール

4.2.1.1-20】[26),27),28),29)]。これらの動物モデルにおける抗 CTLA-4 mAb の作用機序として、IL-2、IFN-γ 及び TNF-α のような炎症誘発性サイトカインの産生増加又は Treg の機能調節が考えられる。これらの知見から、CTLA-4 の自己免疫疾患における異常な免疫反応への関与が示唆される。したがって、抗 CTLA-4 mAb の投与により、自己抗原に対する末梢性の免疫寛容が解除されると考えられる。非臨床モデルにおける CTLA-4 阻害による自己免疫の誘導は、特定の遺伝要因又はワクチン接種による疾患易発性動物において示されている。例えば、GM-CSF 悪性黒色腫ワクチンと抗 CTLA-4 抗体との併用投与ではマウスに自己免疫疾患の白斑を誘発したが、他の自己免疫疾患の症候は生じさせなかった[15)]。カニクイザルを用いた薬理試験（SUV00006 試験）における有害な免疫作用は 1 例のみに認められ、10 mg/kg の月 1 回静脈内投与を 2 回実施後に大腸炎により安楽死させた。その他、Ipilimumab 10 mg/kg のおおよそ月 1 回投与と別の免疫調節抗体（抗 CD137 作動性抗体、BMS-663513）及び SIV DNA ワクチンとを併用投与した試験（TIB-06-001 試験）において、3 ヵ月間投与の 4 週間後に、免疫関連の皮膚炎・発疹が発現した。また、Ipilimumab の 3 mg/kg 以上の用量と MDX-1106（PD-1 受容体に対する免疫賦活性 mAb）の 10 mg/kg 以上の用量を併用投与したカニクイザルの 1 ヵ月間（週 1 回計 4 回）投与試験（[redacted]00106）において免疫関連有害事象（irAE）が認められたが、これらの発現率は各被験物質の単剤を本試験と同用量で投与した試験の発現率に比べて増加した。認められた有害事象の詳細は、非臨床毒性試験の概要文【モジュール 2.6.6】に記載した。これらは有害な免疫作用と考えられ、本剤の薬理作用と関連する影響と考えられる。なお、カニクイザルに Ipilimumab を最高用量 30 mg/kg で 3 日に 1 回計 3 回（7114-100 試験）、1 mg/kg を週 1 回 10 週間（1416-128 試験）及び 10 mg/kg を月 1 回 6 ヵ月間静脈内投与した試験（01-3460 試験）では、毒性は認められなかった。

2.3 Ipilimumabの作用機序

2.3.1 ヒトCTLA-4 に対する結合

Ipilimumab は、CTLA-4 の細胞外領域と結合する。CTLA-4 とヒト IgG1 Fc 部分融合蛋白と Ipilimumab との結合キネティックパラメータは、BIAcore システムを用いた表面プラズモン共鳴により測定し、データの解析には BIA 評価用ソフト（bivalent モデル、global curve fit 分析）を用いた。その結果、4 試験の平均解離定数（K_D）は 5.25 ± 3.62 nM（$K_D = k_{off}/k_{on}$、Table 2.3.1-1）であった【モジュール 4.2.1.1-23】。追加試験でも同様な結合特性が報告された【モジュール 4.2.1.1-24】。

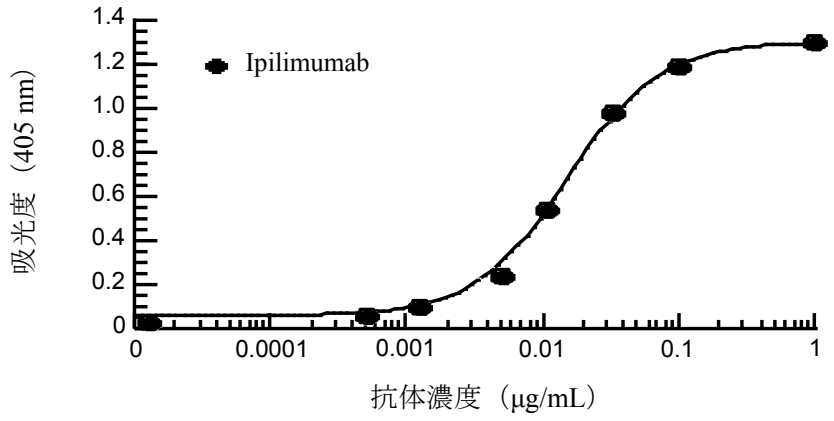
Table 2.3.1-1: Ipilimumab標準品（[redacted]022 Ref Std）の結合キネティックパラメータ

	結合速度 k_a (1/M.s)	解離速度 k_d (1/s)	結合定数 K_A (1/M)	解離定数 K_D (nM)
実験 1	2.58×10^5	7.12×10^{-4}	3.62×10^8	2.76
実験 2	1.83×10^5	4.93×10^{-4}	3.70×10^8	2.69
実験 3	1.70×10^5	8.75×10^{-4}	1.94×10^8	5.15
実験 4	1.89×10^5	1.96×10^{-3}	9.60×10^7	10.4
平均	2.00×10^5	1.01×10^{-3}	2.56×10^8	5.25
標準偏差	3.95×10^4	6.52×10^{-4}	1.34×10^8	3.62

出典：【モジュール 4.2.1.1-23】

また、Ipilimumab の精製組換えヒト CTLA-4 抗原への結合を ELISA 法により示した（Figure 2.3.1-1）。Ipilimumab は用量依存的な結合を示した。50%結合濃度は 15 ng/mL であり、Ipilimumab の CTLA-4 に対する結合能は高かった。飽和結合は、およそ 0.1 μg/mL で観察された [30)]。ヒト CD28（T 細胞上に恒常的に発現し、T 細胞の活性化と免疫寛容において重要な役割を担う分子）に対する交差反応は認められなかった【モジュール 4.2.1.1-24】。

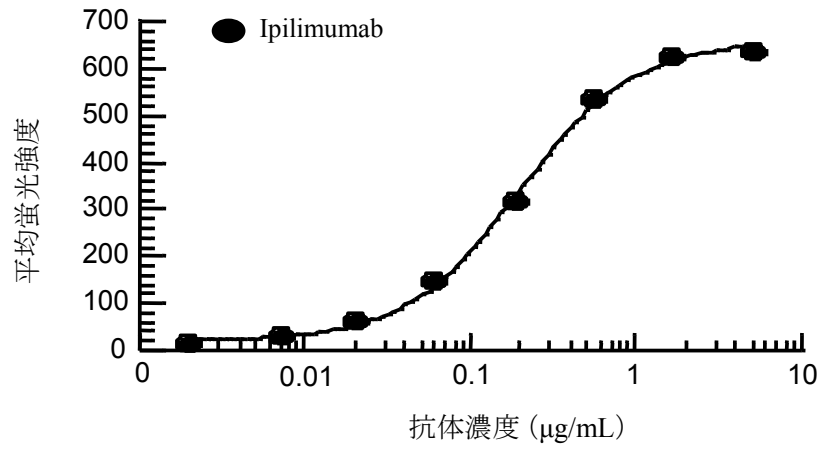
Figure 2.3.1-1: ELISA法によるIpilimumabの組換えヒトCTLA-4 抗原に対する結合



出典：US patent 2005/0201994A1[30)]

T 細胞の細胞膜上に発現している CTLA-4 に対する Ipilimumab の結合を示すため、蛍光標識した各種濃度の Ipilimumab を、ヒト CTLA-4 を恒常的に過剰発現するようにトランスフェクトしたマウスの T 細胞ハイブリドーマ（58 α-β CTLA-4 細胞）とインキュベートし、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した [30)]。精製した CTLA-4 を用いた試験結果と同様に、Ipilimumab は濃度依存的に CTLA-4 発現細胞に結合し（Figure 2.3.1-2）、その反応曲線は 4 パラメータ関数曲線と高い相関性を示した（相関係数= 0.999）。50%結合濃度は 190 ng/mL で、結合の飽和は 1～10 μg/mL で認められた。

Figure 2.3.1-2: IpilimumabのT細胞上にトランスフェクトしたCTLA-4 に対する結合



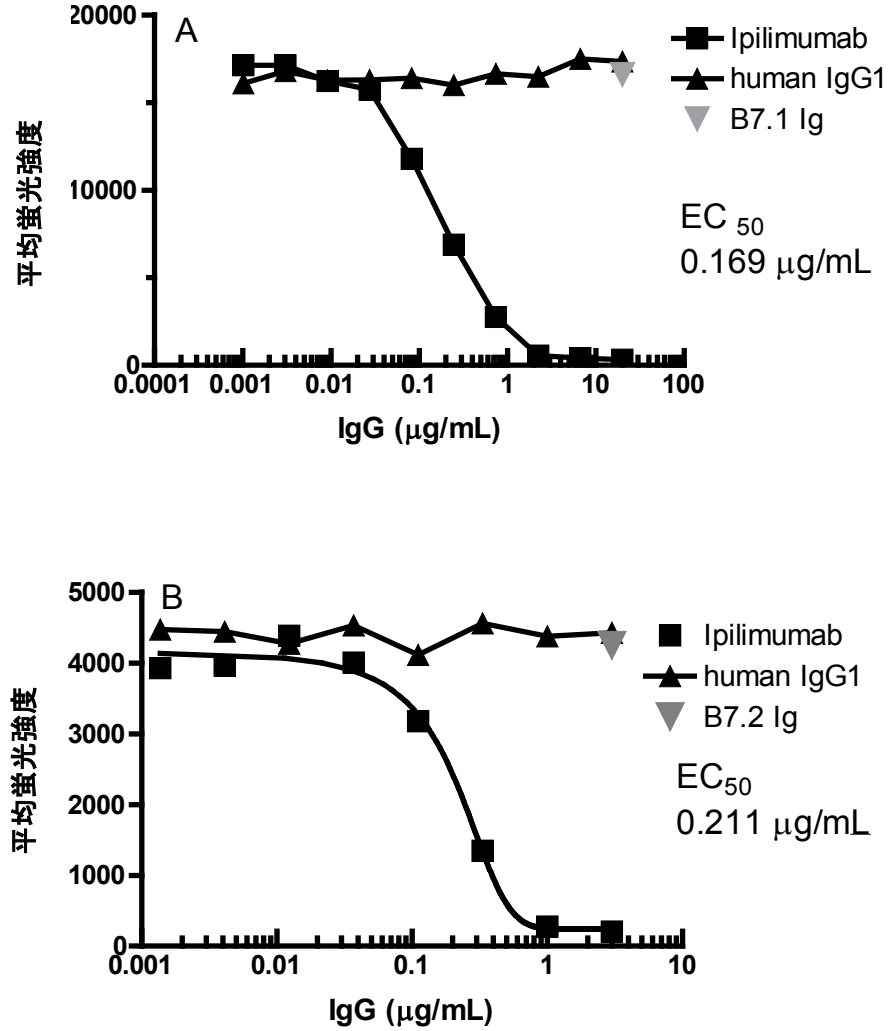
出典：US patent 2005/0201994A1[30)]

Ipilimumab は、マウス、ラット及びウサギの非活性又は活性化免疫細胞【モジュール 4.2.1.1-11】、並びにトランスフェクトされた細胞株上に発現したマウス及びラットの CTLA-4【モジュール 4.2.1.1-12】に対して交差反応性を示さなかった。また、生化学的分析でもマウス CTLA-4 又はラット CTLA-4 に結合しないことが示された【モジュール 4.2.1.1-13】【モジュール 4.2.1.1-14】[31)]。一方、カニクイザルの組換え CTLA-4 及び活性化 T 細胞に対して特異的結合を示した【モジュール 4.2.1.1-11】【モジュール 4.2.1.1-24】。

2.3.2 IpilimumabによるCTLA-4 のB7.1 及びB7.2 に対する結合阻害

Ipilimumab の CTLA-4 との結合が、CTLA-4 とその生体内リガンドである B7.1 及び B7.2 との相互作用を阻害することを示すため、フローサイトメトリーによる競合分析を実施した【モジュール 4.2.1.1-1】。ヒト CTLA-4 を発現した細胞株（58 α-β CTLA-4 CD3ζ 細胞）を、各種濃度の Ipilimumab 又はアイソタイプの対照 mAb 存在下で蛍光物質標識ヒト B7.1 Ig（Hu-B7.1 Ig）融合蛋白又はヒト B7.2 Ig（Hu B7.2 Ig）融合蛋白と反応させた。Ipilimumab の細胞表面上に発現した CTLA-4 との結合は、可溶性ヒト B7.1 又は B7.2 融合蛋白の結合を阻害した（Figure 2.3.2-1）。本剤の CTLA-4/B7.1 又は CTLA-4/B7.2 結合を阻害する EC_{50} 値は、それぞれ 0.169 μg/mL 及び 0.211 μg/mL であった。これらの競合分析の結果、CTLA-4 と B7.1/B7.2 との結合に対する Ipilimumab の最大阻害作用は、B7.1 の場合は 6～20 μg/mL で、B7.2 の場合は 1～3 μg/mL の濃度で認められた。

Figure 2.3.2-1: **IpilimumabによるCTLA-4 のB7.1（CD80）及びB7.2（CD86）に対する結合阻害**



Ipilimumab による細胞上に発現した CTLA-4 に対する B7.1 Ig（A）又は B7.2 Ig（B）の結合阻害
出典：【モジュール 4.2.1.1-1】

2.3.3 Ipilimumabによる活性化T細胞の補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）のin vitro評価

Ipilimumab は IgG1 mAb であることから、補体と結合しそれらを活性化する可能性が考えられる。また、マクロファージのような免疫エフェクター細胞の表面上に発現する IgG Fc 受容体（FcγR）は、Ipilimumab 結合細胞と結合する可能性がある。いずれの機序でも、CTLA-4 発現細胞の減少がもたらされる。したがって、Ipilimumab の機能的特徴の一部として、本剤が補体の活性化又は免疫エフェク

ター細胞上に発現した FcγR の活性化を介して標的細胞に対する細胞傷害を示すか否かを検討するため、*in vitro* 試験を実施した。

Ipilimumab の CDC に及ぼす影響を検討するため、CTLA-4 を発現した活性化 T 細胞をウサギ新生児又はヒトの補体の存在下で本剤と培養した。その結果、Ipilimumab はいずれの補体の存在下でも 50 μg/mL までの濃度で活性化 T 細胞の細胞傷害を引き起こさなかった【モジュール 4.2.1.1-3】【モジュール 4.2.1.1-4】。陽性対照の抗体（抗 CD3 抗体、抗 CD45RO 抗体又は抗 MHC-1 抗体）では、同じ実験条件下で細胞溶解が観察された。これらの結果は、*in vitro* において Ipilimumab が活性化 T 細胞の CDC に関与しないことを示している。

Ipilimumab の FcγR に対する結合性を測定し、また、活性化 T 細胞の ADCC における関与を検討した。FcγR を介した細胞毒性を誘導するための最初の必要条件は、免疫エフェクター細胞上に存在する FcγR との結合であることから、Ipilimumab の高親和性及び低親和性の FcγR に対する結合を ELISA 法により測定した。Ipilimumab は高親和性受容体の FcγRI と平均 EC_{50} 値 0.27 μg/mL で結合した。これに対して、低親和性受容体の FcγRII 又は FcγRIII への結合は弱く、800 μg/mL までの濃度では EC_{50} 値は求められなかった【モジュール 4.2.1.1-2】。次に、Ipilimumab の FcγR を介した細胞傷害性の誘導作用に関し、複数の提供者からのエフェクター細胞（12 例の提供者からの PBMC）及び標的細胞（6 例の提供者からの活性化 T 細胞）を用いて評価した。Ipilimumab 10 μg/mL の ADCC は 0.1%～43.3%の範囲であり、中央値は 6.5%であった。陽性対照のクラス I 抗体（10 μg/mL）では、試験したすべての提供者の細胞で ADCC を示し、その範囲は 9.4%～42.5%、中央値は 20.6%であった。これに対して、ヒト IgG1 対照抗体はいずれの提供者の細胞でも 1%を上回る細胞傷害性を示さなかった【モジュール 4.2.1.1-5】。別の試験で、プロセス A により製造された[redacted]の Ipilimumab とプロセス B により製造された[redacted]の Ipilimumab の ADCC 活性を *in vitro* で比較した。その結果、陽性対照であるマウス IgG_{2a} 抗 CD3 抗体では ADCC がみられたが、いずれの製造法の Ipilimumab でも ADCC は観察されなかった【モジュール 4.2.1.1-6】。これらの試験では、エフェクター細胞として自己由来の単核細胞を用いた点が先の ADCC を示した試験【モジュール 4.2.1.1-5】と異なっていた。更に、エフェクター細胞として IL-2 で刺激した PBMC を用いた試験を実施した【モジュール 4.2.1.1-3】。本試験（n = 9）の結果、IL-2 に刺激された PBMC が存在する場合、Ipilimumab は活性化 T 細胞を低度（8%未満、n = 5）から中程度（13%～55%、n = 4）溶解させることが示された。陽性対照抗体では、すべての試験において一貫した標的細胞（13%～45%）の溶解を惹起した。このように、*in vitro* 条件下では、Ipilimumab は CTLA-4 の発現量に相関しない一貫性のない ADCC を示し、本剤の処置が CTLA-4+T 細胞の減少を引き起こす可能性のあることを示唆している。IL-2 で刺激した PBMC を用いた試験では CTLA-4 の発現が最大となるように T 細胞の活性化が行われており、*in vivo* での CTLA-4 の誘導を正確に反映したものではない。*In vitro* 試験とは対照的に、非臨床 *in vivo* 試験及び臨床試験では末梢血 T 細胞の減少は認められなかった。カニクイザルでは、活性化 T 細胞のサブセット（CD25+CD4+、CD25+CD8+、HLA-DR+CD3+）の発現頻度に減少は認められず、Ipilimumab 投与の 2 週間後にメモリーT 細胞ポピュレーション（CD3+CD45RO+、CD3+CD45RA−及び CD4+CD28+CD95+）の一貫した増加が、認められた【モジュール 4.2.3.2-6】。Ipilimumab を反復投与した臨床試験でも、T 細胞サブセットの減少は生じなかった【モジュール 2.7.2】[32),33)]。しかし、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、Ipilimumab は 2 回目投与の 4 週間後において、無処置の患者と比較して腫瘍における Treg の割合を有意に減少させた[34)]。

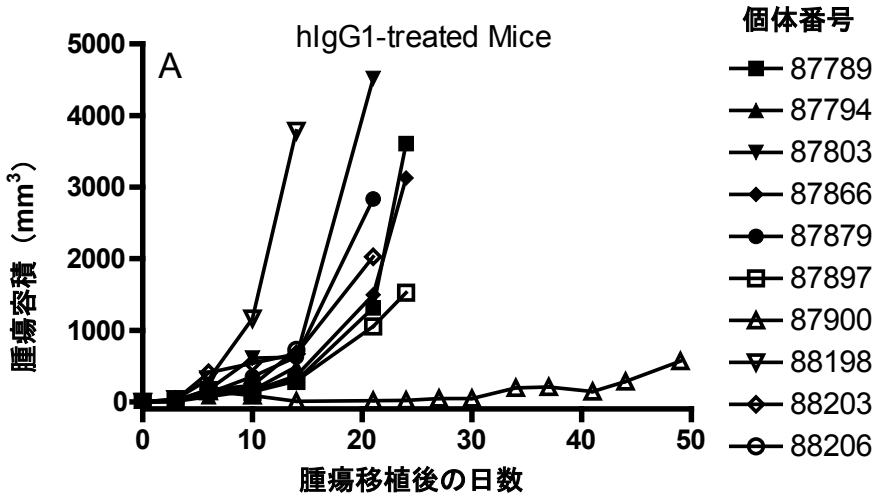
2.3.4 Ipilimumabのin vivo活性

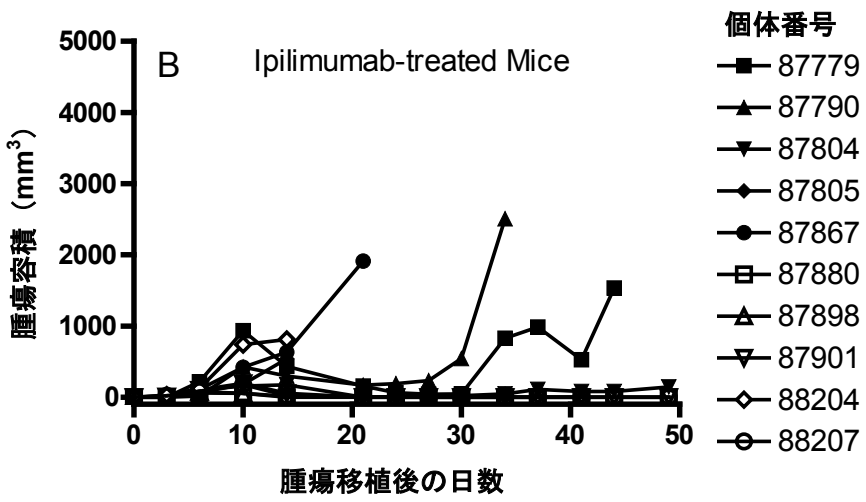
2.3.4.1 ヒトCTLA-4 トランスジェニックマウスにおけるIpilimumabの抗腫瘍活性

Ipilimumab はマウス CTLA-4 と交差反応を示さないことから【モジュール 4.2.1.1-12】【モジュール 4.2.1.1-13】、その活性はげっ歯類の腫瘍モデルでは評価できない。そこで、C57BL/6 系マウスを用いてヒト CTLA-4 を発現し、マウス CTLA-4 を発現しないヒト CTLA-4 トランスジェニックマウス（hCTLA-4 C57BL/6 マウス CTLA-4 ノックアウト）を作製した【モジュール 4.2.1.1-7】。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。ヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスでは、マウス CTLA-4 ノックアウトマウスにみられた致死性リンパ増殖症状を発現しなかった。

抗マウス CTLA-4 抗体が、野生型 C57BL/6 マウスに移植した大腸癌細胞株 MC38 に対して極めて弱い活性しか示さなかったことから、本腫瘍株の免疫原性は低いことが示された [18)]。Ipilimumab の抗腫瘍活性を評価するため、ヒト CTLA-4 トランスジェニック MC38 モデルにおける Ipilimumab の効果を評価した。Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で 3 日又は 4 日に 1 回、計 4 又は 5 回腹腔内投与した場合、腫瘍増殖の遅延あるいは完全な阻害が認められたが、3 日に 1 回で計 3 回投与したのみでは、抗腫瘍活性は認められなかった【モジュール 4.2.1.1-7】。代表的な試験結果を Figure 2.3.4.1-1（A, B）に示す。Ipilimumab 又は対照の IgG 抗体を 10 mg/kg の用量で、Day 0（腫瘍細胞移植日）、3、6 及び 10 に腹腔内投与した。その結果、Ipilimumab 投与により 10 例中 4 例で腫瘍が消失し、他の 6 例では腫瘍が一定の大きさに達するまでの期間が延長した。一方、対照の IgG 抗体では、10 例中 9 例のマウスに進行性の腫瘍増殖が認められた。別に実施した同モデル動物を用いた試験では、Ipilimumab の反復投与によりマウスの 10%～50%で腫瘍の消失又は腫瘍増殖の遅延が認められたが、対照の IgG 抗体を投与したマウスでは急速な腫瘍増殖が認められ、腫瘍の消失は生じなかった【モジュール 4.2.1.1-7】。これらの試験結果は、Ipilimumab の反復投与による CTLA-4 の阻害が、低免疫原性腫瘍の増殖を阻止したことを示している。

Figure 2.3.4.1-1: **IpilimumabのヒトCTLA-4 トランスジェニックマウスにおけるMC38 腫瘍に対する増殖阻害作用**





ヒト IgG_1 対照抗体（A）又は Ipilimumab（B）を 10 mg/kg の用量で Day 0、3、6 及び 10 に投与した場合の各マウスにおける腫瘍増殖曲線（n = 10）。

出典：【モジュール 4.2.1.1-7】

2.3.4.2 カニクイザルにおけるT細胞依存性抗原に対する免疫反応の増強

Ipilimumab はカニクイザルの CTLA-4 に結合し、また、カニクイザルの活性化 T 細胞上の CTLA-4 を認識する【モジュール 4.2.1.1-11】【モジュール 4.2.1.1-24】。Ipilimumab のヒト及びカニクイザルの CTLA-4 への結合定数を以下の 2 つの手法を用いて表面プラズモン共鳴分析法により算出した。その 1 つは固相を Ipilimumab で覆い、ヒト又はカニクイザルの CTLA-4 を液層とする方法であり、他の 1 つは、固相を CTLA-4 で覆い、Ipilimumab を液層とする方法である。固相表面を Ipilimumab で被覆し、液層の各種 CTLA-4 と反応させた場合の結合親和性は、カニクイザル及びヒトで同等であったが、固相表面を各種 CTLA-4 で被覆し、液層の Ipilimumab と反応させた場合は、カニクイザル CTLA-4 に対する親和性はおよそ 1/4 であった（Table 2.3.4.2-1）【モジュール 4.2.1.1-24】。また、カニクイザルの T 細胞のフェノタイプにおいて、Ipilimumab は活性化 T 細胞には特異的結合を示したが、非活性化 T 細胞には結合しなかった【モジュール 4.2.1.1-11】。これらの試験結果は、Ipilimumab がヒト CTLA-4 に対する結合親和性と類似した親和性でカニクイザル CTLA-4 と結合し、カニクイザルの活性化 T 細胞のサブセットを認識することを示している。

Table 2.3.4.2-1: ヒト及びサルのCTLA-4 に対するIpilimumabの結合性

	結合速度定数 $\times 10^5$ 1/Ms	解離速度定数 $\times 10^{-3}$ 1/s	平衡解離定数 $\times 10^{-9}$ M
表面が抗体の場合			
ヒト CTLA-4	2.09	0.94	4.51
カニクイザル CTLA-4	1.25	1.05	8.24
表面が抗原の場合			

ヒト CTLA-4	1.3	0.64	4.79
カニクイザル CTLA-4	0.87	1.74	20.1

出典：【モジュール 4.2.1.1-24】

Ipilimumab がカニクイザルの CTLA-4 と反応することから、本剤の T 細胞依存性抗原に対する免疫反応を明らかにする薬理試験では、本動物種を用いた。本項に示す試験は、毒性試験の概要文【モジュール 2.6.6】に記載した反復投与毒性試験の一部並びに DNA ワクチンとの併用投与薬理試験（TIB-06-001 試験）【モジュール 4.2.1.1-8】として実施されたものである。試験では、HBsAg ワクチン、ヒト悪性黒色腫細胞（SK-mel）ワクチン、DNP (2,4-dinitrophenyl)-Ficoll（T 細胞非依存性抗原）及びサル免疫不全ウイルス（SIV）の gag（pSIVgag）、env（pSIVenv）及び pol（pSIVpol）部分蛋白を発現させる SIV DNA ワクチン又は KHL を抗原として用いた。これらの試験のうち、1 試験では SK-mel 腫瘍株に GM-CSF をトランスフェクトした。これらの抗原に対する免疫反応を、2.3.4.3、2.3.4.4 及び 2.3.4.5 項に記載した様々な方法で測定した。試験の要約と特記すべき所見を Table 2.3.4.2-2 に示した。

Table 2.3.4.2-2: カニクイザルを用いた薬理試験の要約

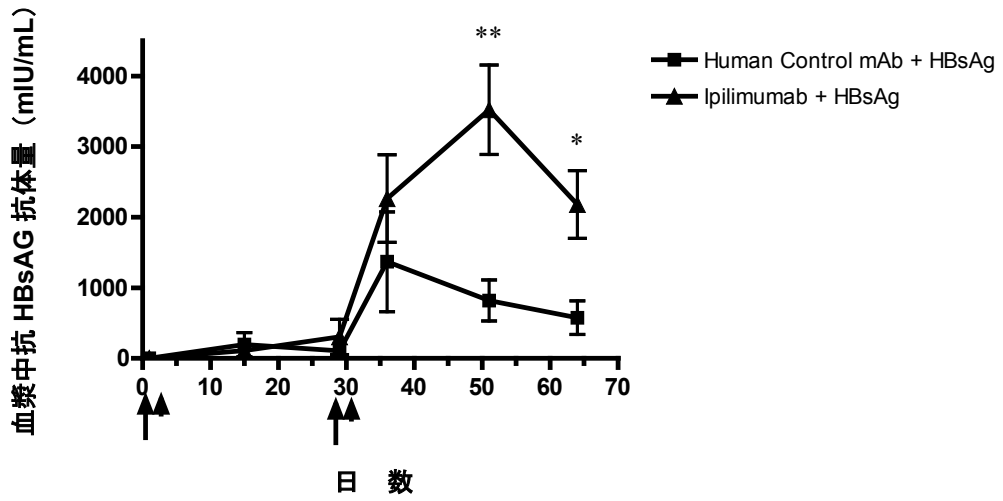
試験の種類	Ipilimumab の用量、投与経路、投与スケジュール	試験抗原の種類、用量、投与経路、投与スケジュール	特記すべき所見	参考文献
HBsAg ワクチンに対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	10 mg/kg、IV、Day 1 及び 29	HBsAg ワクチン、10 µg、IM、Day 2 及び 30	Ipilimumab は Day 51 及び 64 において HBsAg に対する抗体反応を有意に増強させた（$p < 0.05$）。	【モジュール 4.2.3.2-5】（0992-128 試験）
SK-mel（GM-CSF 分泌）ワクチンに対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	10 mg/kg、IV、Day 0、28、56、84 及び 140	SK-mel GM-CSF ワクチン、細胞 5×10^6 個、SC、Day 0、28、56、84 及び 140	Ipilimumab は Day 41 以降において GM-CSF 分泌 SK-mel ワクチンに対する抗体反応を有意に増強させた（$p < 0.05$）。 Ipilimumab と SK-mel を投与したサルから採取した血漿は、3 種の悪性黒色腫細胞株に対して、対照群のサルから採取した血漿よりも強力な ADCC を惹起した。	【モジュール 4.2.3.2-8】（01-3460 試験）[35]
HBsAg 及び SK-mel ワクチンに対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	プロセス A：10 mg/kg、IV、月 1 回 3 カ月間 プロセス B：0.1, 1, 10 mg/kg、IV、月 1 回 3 カ月間 プロセス B： 1	HBsAg ワクチン、10 µg、IM SK-mel ワクチン、細胞 5×10^6 個、SC 両ワクチンを月 1 回 3 カ月間、抗体と同日投与	プロセス A 又は B で産生された Ipilimumab は 10 mg/kg 投与で対照群のサルに比べてより強力な HBsAg 又は SK-mel に対する抗体反応を惹起した。	【モジュール 4.2.3.2-7】（1416-128 試験）

	mg/kg、IV、週1回10週間			
HBsAg、SK-mel ワクチン及び DNP-Ficoll に対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	10 mg/kg、IV、Day 1、29、57及び140	HBsAg ワクチン、10 µg、IM 及び SK-mel ワクチン、細胞 5×10^6 個、SC、Day 1、29 及び 57 DNP-Ficoll、100 µg、Day 1 及び 29	Ipilimumab 投与群は対照群のサルに比べ HBsAg 及び SK-mel ワクチンに対してより高い抗体価を示した。 DNP-Ficoll は対照群及び Ipilimumab 投与群のいずれのサルにおいても抗体反応を示さなかった。 メモリーT 細胞ポピュレーション（CD3+ CD45RO+又は CD3+CD45RA−と定義）の一貫した増加が、各ワクチンと Ipilimumab 投与 2 週間後に認められた。 Ipilimumab を投与したサルでは Day 71 及び 154 に CD4 セントラルメモリー細胞（CD4+CD28+CD95+）の比率が増大した。 対照群のサルではこれらの T 細胞比率の有意な変化は観察されなかった。	【モジュール 4.2.3.2-6】（SUV00006 試験）
KLH に対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	10 mg/kg、IV、週1回4週間	KLH、10 mg、IM、Day 10	Ipilimumab は KLH 特異的抗体反応を Day 23 より有意に増大させた（$p < 0.05$）。	【モジュール 4.2.3.2-4】（DS06064 試験）
SIV DNA ワクチン単独又は BMS-663513 との併用に対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響	Ipilimumab：10 mg/kg、IV、Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88 BMS-663513：10 mg/kg、IV、Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88	SIV DNA ワクチン（SIV gag, SIV pol 及び SIV env）、各 1 mg、IM、Day 1, 2；29, 30；57, 58 及び 85, 86	SIV DNA ワクチンは、CD4+及び CD8+ T 細胞の抗原特異的増加並びに IFN-γ 反応を誘発させた。 Ipilimumab 単剤又は BMS-663513 との併用により、Day 44 において、抗原特異的な CD4+及び CD8+ T 細胞の有意な増加が認められた（$p < 0.05$）。 Ipilimumab を投与したサルの抗原特異的な IFN-γ 反応は対照群のサルと同等であった。	【モジュール 4.2.1.1-8】【モジュール 4.2.1.1-9】【モジュール 4.2.1.1-10】（TIB-06-001 試験）[36]

2.3.4.3 B型肝炎ウイルス表面抗原及び悪性黒色腫ワクチンに対する免疫反応の増強

2ヵ月間探索試験（0992-128 試験）【モジュール 4.2.3.2-5】において、HBsAg に対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の薬理学的影響を検討した。Ipilimumab 又は同じアイソタイプの対照ヒト IgG（mAbRSV、RS ウイルスに対するモノクローナル抗体）を 10 mg/kg の用量で Day 1 及び 29 にそれぞれ静脈内投与した（1 群雌雄各 2 例）。また、免疫賦活物質併用投与群（1 群雌雄各 2 例）を設け、Ipilimumab 又は mAbRSV に加え CpG オリゴ核酸 500 µg を Day 2 に筋肉内投与した。全例に 10 µg の HBsAg ワクチンを Day 2 及び 30 に筋肉内投与した。薬物動態解析の結果、Ipilimumab の平均血漿中濃度は、Day 15 で 97 µg/mL、Day 29 の投与前で 40 µg/mL、Day 36 で 138 µg/mL、Day 64 で 33 µg/mL であった。各時点における血漿中濃度はすべての動物で類似していた。Ipilimumab と CpG を投与されたサルの Ipilimumab の血漿中濃度は Ipilimumab のみを投与されたサルと同等であった。全例が Ipilimumab の投与に対し忍容性を示した。薬理学的評価として、末梢血リンパ球のフェノタイピング、*ex vivo* における試験抗原によるリンパ球刺激後の細胞内サイトカインの検出及び HBsAg に対する抗体産生を検討した。フェノタイピングの結果、Ipilimumab 投与群の CD4+又は CD8+ T 細胞数並びに CD69、CD25 又は HLA-DR 活性化マーカーを発現した T 細胞のサブポピュレーション数は、対照群と比較して変化はみられなかった。*Ex vivo* における HBsAg に特異的な T 細胞活性化の測定では、Ipilimumab 投与群の 1 例のみで、Day 51 及び 64 に CD8+及び CD8−の両 T 細胞における TNF-α と IL-2 が持続的に上昇し、特異的反応が認められた。これらのパラメータの変化は軽微であったが、Ipilimumab を投与されたサルの抗原特異的な抗体反応には有意な増強が認められた（Figure 2.3.4.3-1、$p < 0.05$）【モジュール 4.2.3.2-5】。HBsAg ワクチン投与による初回免疫に対する反応は概して弱かったが、Ipilimumab 投与群のサル 2 例では対照群と比べてより多い抗 HBsAg 抗体量を示した。一方、Day 30 のワクチン投与によるブースト後では、Ipilimumab 投与群の HBsAg 特異抗体量は Day 51 及び 64 において対照群と比較して有意に高かった（各々 $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$）。血清型解析の結果、Day 51 及び 64 に認められた抗体の大部分は IgG サブクラスであった。

Figure 2.3.4.3-1: **カニクイザルにおけるIpilimumabによるB型肝炎ウイルス表面抗原ワクチンに対する抗体反応の増強**

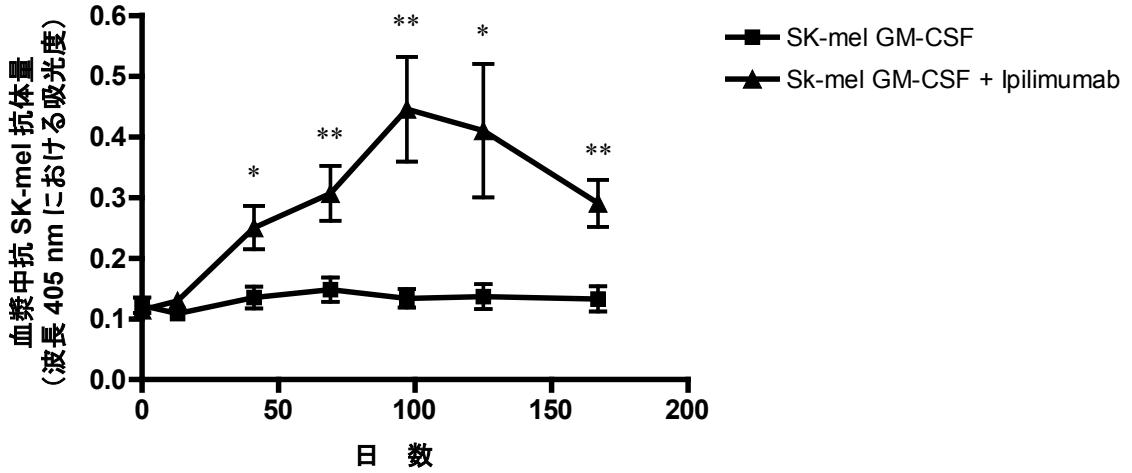


矢印は Ipilimumab 又は対照抗体の投与日、矢頭は HBsAg ワクチンの接種日を示す。抗体価の統計学的有意差検定には Student's t-test を用いた（$*p < 0.05$, $**p < 0.01$）。エラーバーは標準誤差を示す。

出典：【モジュール 4.2.3.2-5】

サル 6 ヵ月間毒性試験（01-3460 試験）【モジュール 4.2.3.2-7】において、GM-CSF を分泌していた腫瘍細胞を基にしたワクチン（SK-mel GM-CSF）に対する Ipilimumab の薬理学的作用を検討した。マウスにおいては、抗マウス CTLA-4 mAb とマウス腫瘍 GM-CSF 分泌ワクチンとの併用で相乗効果が認められている [12),15)]。1 群 6 例（雌雄各 3 例）のカニクイザル 2 群に、Ipilimumab（10 mg/kg）又は生理食塩水を Day 0、28、56、84 及び 140 に静脈内投与した。すべてのサルに Ipilimumab 又は生理食塩水投与日に SK-mel GM-CSF ワクチン（細胞 5×10^6 個）を皮下投与した。全例のサルが Ipilimumab と SK-mel GM-CSF ワクチンとの併用投与に忍容性を示した。薬物動態解析の結果、Ipilimumab の平均血漿中濃度は、Day 1 及び Day 28 においてそれぞれ 184 μg/mL 及び 32 μg/mL（2 回目投与前のトラフ濃度）であった。抗体投与後の血漿中抗体濃度は、試験期間中を通して同程度であった。本試験では薬理学的パラメータとして、末梢血リンパ球のフェノタイピング、遅延型過敏（DTH）及び SK-mel GM-CSF ワクチンに対する抗体反応を評価した。感作の約 2 週間後に血漿を採取し、試験抗原に対する抗体反応を ELISA 法によって解析した（Figure 2.3.4.3-2）。Day 1、29、57 及び 141 に実施したフェノタイピングの結果、Ipilimumab 投与群の活性化マーカー（CD25+、CD69+及び HLA-DR+）発現 T 細胞数又は T 細胞サブセット（CD4+及び CD8+）数は対照群と差がなかった。DTH 陽性反応の発現率は、ワクチン単独群及びワクチン+ Ipilimumab 併用群で同等であった。すなわち、DTH 陽性反応はワクチン単独群の雄で 3 例中 3 例、雌で 3 例中 1 例に認められ、Ipilimumab 併用群では雌雄ともに 3 例中 2 例で認められた。Ipilimumab は SK-mel GM-CSF 腫瘍細胞に対する抗体反応を対照群に比較して有意に増強させた。有意な増強は Day 41 からみられ、試験期間中継続して認められた（$p < 0.05$、Figure 2.3.4.3-2）。Ipilimumab 投与群の 6 例中 5 例で SK-mel 特異的抗体反応の増強がみられたが、対照群では 1 例のみで増強が認められた。また、本試験動物由来の血漿が悪性黒色腫細胞株に対して ADCC 活性を誘導する可能性を検討した Keler らの報告 [35)]では、3 種の悪性黒色腫細胞株を用いた試験の結果、いずれの細胞株に対しても Sk-mel GM-CSF ワクチンと Ipilimumab を投与されたサルの血漿はワクチンのみを投与されたサルの血漿に比べてより強力な ADCC 活性を示したことから、悪性黒色腫細胞株に対する T 細胞依存性抗体の交差反応性の存在が示唆された。ワクチンに対する抗体反応がメラニン細胞上に存在する抗原の少なくとも一部を標的とすると考えられることから、更に、本試験の血漿標本がサルのメラニン細胞と交差反応を示すか否かを調べる試験を実施した。試験にはメラニン細胞が豊富なカニクイザルの虹彩組織を用いた。対照組織として、脳、腎臓及び胃を用いた。Ipilimumab と SK-mel GM-CSF との併用投与では、カニクイザルのメラニン細胞抗原が認識されることにより抗体反応が誘導された。この抗体反応は 2 例のサルで特に顕著であった [35)]。

Figure 2.3.4.3-2: **カニクイザルにおけるIpilimumabによるSK-mel GM-CSFワクチンに対する液性免疫反応の増強**



測定値は血漿標本（6 例/群）から得られた抗 SK-mel 抗体量の平均値±標準誤差を示す。統計学的有意差検定には Student's t-test を用いた（*$p < 0.05$, **$p < 0.01$）。

出典：【モジュール 4.2.3.2-8】

試験抗原に対する免疫反応の評価は [redacted] プロセス A）の Ipilimumab 又は [redacted]（プロセス B）の Ipilimumab の比較試験（1416-128 試験）の一部でも実施した【モジュール 4.2.3.2-7】。本試験において、プロセス B の Ipilimumab を、0.1、1 及び 10 mg/kg で月 1 回 3 ヵ月間又は 1 mg/kg で週 1 回 10 週間投与した。プロセス A の Ipilimumab は、10 mg/kg で月 1 回 3 ヵ月間投与した。HBsAg（10 μg、筋肉内投与）と SK-mel（細胞 5×10^6 個、皮下投与）は、抗体投与と同日に月 1 回 3 ヵ月間投与した。全例が Ipilimumab の投与に対して忍容性を示した。薬物動態学的解析の結果、プロセス A 及びプロセス B の Ipilimumab を 10 mg/kg で投与した平均血漿中濃度は類似していた。薬理学的パラメータとして、末梢血リンパ球のフェノタイピング、*ex vivo* におけるリンパ球刺激後の細胞内サイトカインの検出、DTH 及び試験抗原に対する抗体反応を評価した。

Ipilimumab を投与したいずれの群でも、CD69、CD25 又は HLA-DR 活性化マーカー発現 T 細胞サブポピュレーションに対照群との間に差は認められなかった。活性化 CD69+ T 細胞による抗原特異的サイトカイン（TNF-α 及び IFN-γ）産生割合の用量又は投与スケジュール依存的な軽微な増加が、プロセス B の 1 mg/kg で週 1 回投与又は 10 mg/kg で月 1 回投与の Day 43 及び 79 に認められた。プロセス A 及び B によって製造された Ipilimumab の 10 mg/kg 投与群では、Day 41 及び 71 において対照群に比較して HBsAg に対するより強力な DTH 反応が発現した。すべての投与群において HBsAg 及び SK-mel ワクチンに対する抗体反応に一貫性はみられなかったが、プロセス A 及び B によって製造された Ipilimumab の 10 mg/kg を投与された動物の反応は、他の投与群の動物に比べて大きかった。本結果からプロセス A 及び B で製造された Ipilimumab の機能的同等性が確認できた【モジュール 4.2.3.2-7】。

なお、プロセス B の[redacted]を用い、[redacted]を変更して製造されたプロセス C の Ipilimumab の薬物動態、及び免疫原性プロファイルは、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【モジュール 2.6.6】。また、[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【モジュール 2.3】。

3 ヵ月間投与探索的毒性・生物活性試験（SUV00006 試験）【モジュール 4.2.3.2-6】において、GM-CSF 非分泌型 SK-mel 腫瘍細胞、HBsAg 及び DNP-Ficoll の 3 種の試験抗原に対する免疫反応に及ぼす Ipilimumab の影響を評価した。Ipilimumab を 10 mg/kg で雌雄各 3 例のサルに SK-mel 及び HBsAg ワクチン接種と同日（Day 1、29 及び 57）に静脈内投与した。DNP-Ficoll のみは Day 1 及び 29 に投与した。ワクチン対照群として雌雄各 3 例のサルに 0.9%生理食塩水を 2 mL/kg で投与し、また、3 種の抗原（ワクチン）は上記と同じ用量及びスケジュールで投与した。Ipilimumab の液性免疫反応に及ぼす影響の評価に加えて、第 2 の目的として、Day 140 における本剤の再投与が抗原非存在下でも免疫反応を再活性化させることが可能か否かを検討した。薬理学的評価として、T 細胞の免疫フェノタイピング、*ex vivo* におけるリンパ球刺激後の末梢血 T 細胞の細胞内サイトカインの測定、試験抗原の皮内接種に対する DTH 反応並びに SK-mel、HBsAg 及び DNP-Ficoll に対する抗体産生を検討した。Ipilimumab 初回投与の 24 時間後の平均血漿中濃度は 239 μg/mL であった。2 回目（238.7 μg/mL）及び 3 回目（231.8 μg/mL）の投与後も同様な血漿中濃度が観察された。

DTH を評価するため、Day 42 にすべてのサルに HBsAg（2 μg）、SK-mel（細胞 1×10^6 個）又は 0.9%生理食塩水をそれぞれ 0.1 mL 皮内投与した。Ipilimumab とワクチンの併用投与により、HBsAg に対する DTH 反応がワクチンと生理食塩水を投与した対照群の約 2 倍に増強されたが、SK-mel の皮内投与部位では類似の作用はみられなかった。一方、Ipilimumab 投与群では Day 43～100 まで対照群に比較して SK-mel に対する強い抗体反応が認められ、この結果は本試験より以前に実施した試験でも観察されていた。しかし、本試験では Ipilimumab 投与群の T 細胞依存性抗体価が相対的に対照群のサルに比べて常に高かったが、Ipilimumab 投与群の HBsAg に対する抗体反応は変動が大きく一定の傾向はみられなかった。DNP-Ficoll に対する反応は、Ipilimumab 投与群及び対照群でいずれも一様に弱かったことから、ワクチンが測定可能な免疫反応を誘導できなかったことが示された【モジュール 4.2.3.2-6】。

末梢血のフェノタイピングの結果、Ipilimumab 投与群ではメモリーT 細胞（CD3+CD45RO+又は CD3+CD45RA−）数が一貫して増加したが、対照群ではみられなかった。これらの増加は、各 Ipilimumab 投与の約 2 週間後に認められた。Day 71 に、T 細胞メモリーサブセットのフェノタイピングを実施した。Ipilimumab 投与群では対照群と比較して CD4 セントラルメモリーT 細胞（CD4+CD28+CD95+）の割合が増加したが、CD4 エフェクターメモリーT 細胞、CD8 エフェクターメモリーT 細胞及び CD8 セントラルメモリーT 細胞の割合に変化は認められなかった。他の細胞集団である、総 T 細胞、CD4+及び CD8+ T 細胞、Treg（CD4+CD25+）、総 B 細胞（CD20+）、活性化 T 細胞及び B 細胞、$CD11c^{Hi}$ 樹状細胞、CD14+単球並びに *ex vivo* での抗原刺激（特異的及び非特異的）に応答する T 細胞内の IFN-γ 又は TNF-α 量に変化は認められなかった【モジュール 4.2.3.2-6】。

試験の第二段階における Day 140 での Ipilimumab の再投与の結果、CD4 セントラルメモリーT 細胞の割合は再び増加した。SK-mel、HBsAg 及び DNP Ficoll による免疫刺激に対する測定可能なリコール反応及び二次リンパ器官の細胞サブセットの実質的な変化はみられず、末梢血中の抗原に対する T

細胞反応もみられなかった。これらのパラメータは Ipilimumab 再投与の 14 日後のみに測定したことから、試験抗原に対して最大反応に到達していなかった可能性がある【モジュール 4.2.3.2-6】。

以上、カニクイザルで実施したワクチンとの併用薬理試験より、Ipilimumab 10 mg/kg の反復投与は複数の T 細胞依存性抗原に対する抗体反応を増強させることが明らかとなった。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ると考えられる。また、1 つの試験で、CD4+セントラルメモリーT 細胞数の一貫した増加が Ipilimumab 投与のおよそ 2 週間後に認められた。さらに、試験抗原に対する抗体反応の増大は、自己抗原に対する非特異的で無制限な反応を伴っていないことから、本剤の免疫反応の増強はワクチン接種に用いた抗原に限定されることが示唆された。

2.3.4.4 IpilimumabによるKLHに対する抗体反応の増強

T 細胞依存性抗原（KLH）に対する液性免疫反応の強度に及ぼす Ipilimumab の影響を、サル 1 ヵ月間間歇静脈内併用投与毒性試験（DS06064 試験）の一部として検討した【モジュール 4.2.3.2-4】。Ipilimumab を 10 mg/kg で週 1 回 4 週間 10 例のカニクイザル（雌雄各 5 例）に静脈内投与した。別の群には Ipilimumab 10 mg/kg 及び BMS-663513（抗 CD137 作動性抗体）100 mg/kg を雌雄各 5 例に同様に週 1 回 4 週間静脈内投与し、両剤併用の安全性を評価した。対照群の動物（10 例）には、Ipilimumab 及び BMS-663513 の各溶媒を投与した。KLH は Ipilimumab 初回投与の 9 日後に全例に投与した。薬理学的パラメータとして、末梢血リンパ球のフェノタイピング、抗核抗体（ANA）量の測定及び KLH に対する T 細胞依存性抗体反応を評価した。

末梢血リンパ球のフェノタイピング及び ANA 量において、Ipilimumab の投与に関連した影響は Week 4 までみられなかった。KLH で感作したすべての動物は、Day 15 から KLH 特異的抗体反応を示した。Ipilimumab を単剤投与又は BMS-663513 と併用投与されたサルでは、KLH 抗体反応が Day 23 に溶媒対照群に比較して有意に増大した（$p < 0.05$、Table 2.3.4.4-1）。Ipilimumab 単剤投与群及び BMS-663513 との併用投与群間には KLH 抗体反応に統計学的な差がなかったこと、また、BMS-663513 単剤の試験結果から、Day 23 にみられた KLH 特異的抗体反応の増強は、主に Ipilimumab の週 1 回 4 週間静脈内投与に起因するものであると考えられる。本反応に性差はみられなかった。KLH 抗体反応は、Day 29 及び 36 においても対照群に比べて高かった（Table 2.3.4.4-1）。

以上のように、カニクイザルにおける Ipilimumab 10 mg/kg の週 1 回 4 週間投与は、KLH 特異的抗体反応を増大させた。KLH に対する効率的な抗体反応は CD4+ T 細胞の援助を必要とすることが知られていることから、Ipilimumab による液性免疫反応の増大は T 細胞への CTLA-4 の抑制性シグナルの除去によるものと考えられ、これは作用機序と一致する。

Table 2.3.4.4-1: Ipilimumab及びBMS-663513 を併用投与したサルにおけるKLH特異的抗体反応

投与群	試験日			
	Day 15	Day 23	Day 29	Day 36
溶媒対照	42～1922	5083～39914	8980～63071	10927～86048
Ipilimumab + BMS-663513 併用投与	126～2263	15248～307052[a]	153654～318135[b]	130734～348812[b]
Ipilimumab 単剤投与	185～610	29045～225355[a]	60609～387777[b]	59796～418765[b]

例数（雌雄合計）	10	10	4	4

数値は吸光度がプレートの平均背景値の5倍となる希釈をエンドポイントとして求めた抗体力価の範囲を示す。

[a] Day 23 に溶媒対照群との間に有意差が認められた（$p < 0.05$、雌雄別の Tukey の多重比較）。

[b] 例数が少ないことから統計学的有意差検定は実施しなかった。

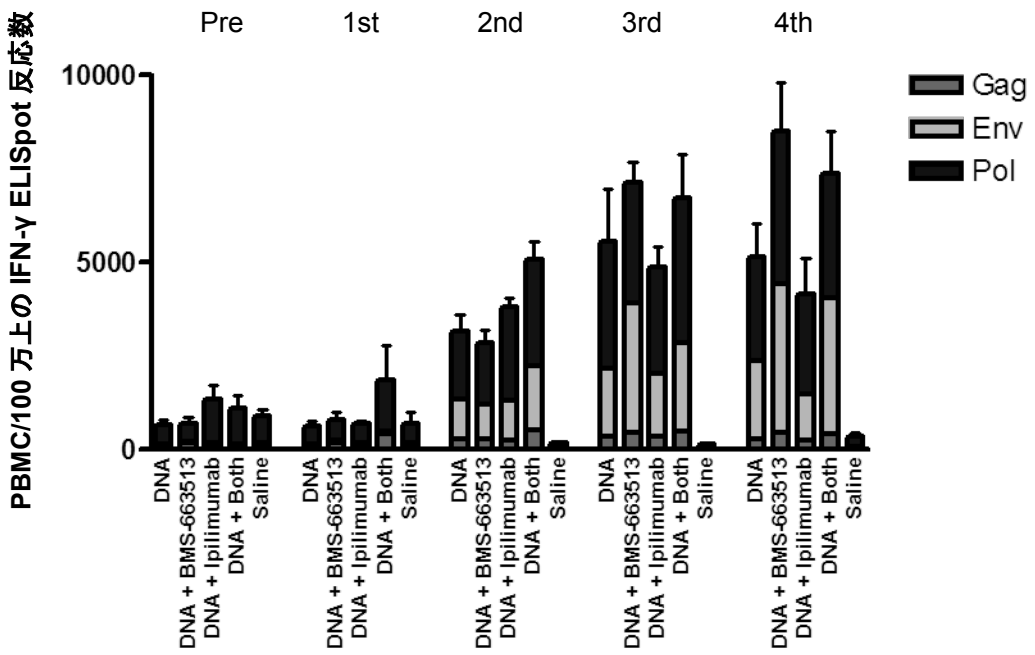
出典：【モジュール 4.2.3.2-4】

2.3.4.5 DNA ワクチンに対する免疫反応の調節

SIV DNA ワクチンによって誘発される免疫反応に対する Ipilimumab の薬理作用を、カニクイザルで試験した（TIB-06-001 試験）。Ipilimumab を単剤（10 mg/kg）又は、抗 CD137 作動性抗体である BMS-663513 と併用投与した【モジュール 4.2.1.1-8】【モジュール 4.2.1.1-9】。本試験において用いたプラスミド DNA は SIV Gag（pSIVgag）、SIV pol（pSIVpol）又は SIV env（pSIVenv）の組換え蛋白質を発現するものである。本試験は 5 群で実施し、各群 6 例のカニクイザルを用いた。第 1～4 群のサルに pSIVgag、pSIVpol 及び pSIVenv の各 2 mg を Day 1～2、29～30、57～58 及び 85～86 に 2 日間筋肉内投与することにより感作した。BMS-663513（第 2 群）及び Ipilimumab（第 3 群）を単剤又は併用（第 4 群）で Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88 に各 10 mg/kg で静脈内投与した。非ワクチン対照群（第 5 群）のサルには、ワクチンの溶媒及び生理食塩水をそれぞれワクチン及び抗体投与日に投与した。各抗原感作の 2 又は 4 週間後に IFN-γ 及び IL-4 ELISpot 分析並びに CFSE 増殖アッセイを用いて抗ワクチン抗原特異的免疫反応を評価した。細胞内サイトカイン染色も実施したが、結果は明確ではなかった。

抗原特異的 IFN-γ ELISpot 反応は、各抗原感作後のすべての DNA 処置群で増強し、特に BMS-663513 投与群（第 2 群）及び併用投与群（第 4 群）における 3 及び 4 回目の感作後に高い反応が認められた（Figure 2.3.4.5-1）。4 回目の感作後、ワクチン単剤投与群（第 1 群）の抗原特異的 IFN-γ ELISpot 反応の平均値が 5149 スポット／100 万 PBMC であったのに対し、BMS-663513 投与群では 8510 スポット／100 万 PBMC に増加した。Ipilimumab 投与群（第 3 群）の値はワクチン単剤投与群に比べて小さく、4174 スポット／100 万 PBMC であった。両抗体併用投与群の値は BMS-663513 投与群と同等であった（7352 スポット／100 万 PBMC）。

Figure 2.3.4.5-1: SIVペプチドに対するIFN-γ ELISpot反応

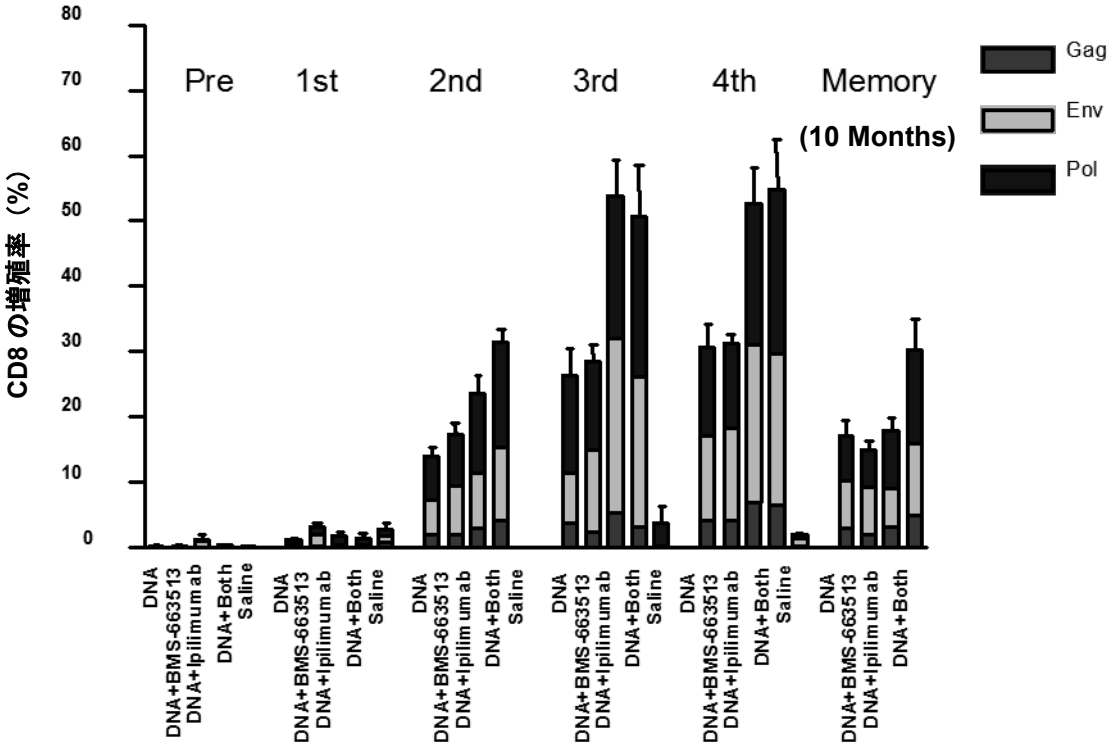


カニクイザルに pSIVgag、pSIVenv 及び pSIVpol（DNA）の各 2 mg 又は生理食塩水（Saline）の筋肉内投与を 4 回行った。また、BMS-663513（DNA + BMS-663513）、Ipilimumab（DNA + Ipilimumab）又は BMS-663513 と Ipilimumab（DNA + BMS-663513 + Ipilimumab）を静脈内投与した。測定時点毎、IFN-γ ELISpot 分析において PBMC を抗原性ペプチドで一晩刺激した。PBMC の測定は、投与前（Pre）及び各抗原感作（1st、2nd、3rd、4th）の 2 又は 4 週間後に実施した。エラーバーは標準誤差を示す。

出典：【モジュール 4.2.1.1-8】

Ipilimumab は SIV 抗原に対する T 細胞の増殖能を亢進させた。全体として、Ipilimumab 投与群では、2、3 及び 4 回目の抗原感作後における抗原特異的 CD4+及び CD8+ T 細胞の平均割合が、SIV DNA ワクチンの単剤又は BMS-663513 との併用投与群に比べて高かった。Ipilimumab 投与群における CD8+ T 細胞増殖の程度は、それぞれ次の感作後に増大したが、CD4+ T 細胞の増殖は早くピークに達し（2 回目の感作後）、その後の測定点では増殖が減少した（Figure 2.3.4.5-2 及び Figure 2.3.4.5-3）。Ipilimumab の単剤又は BMS-663513 との併用投与群と SIV DNA 群との間の統計学的有意差は Day 44（2 回目の感作の 2 週間後）においてのみ認められた。Ipilimumab と BMS-663513 の併用投与による反応の程度は、Ipilimumab 単剤投与における反応と同程度であったことから、併用投与群における抗原特異的 T 細胞増殖の亢進は Ipilimumab に起因することが示された。

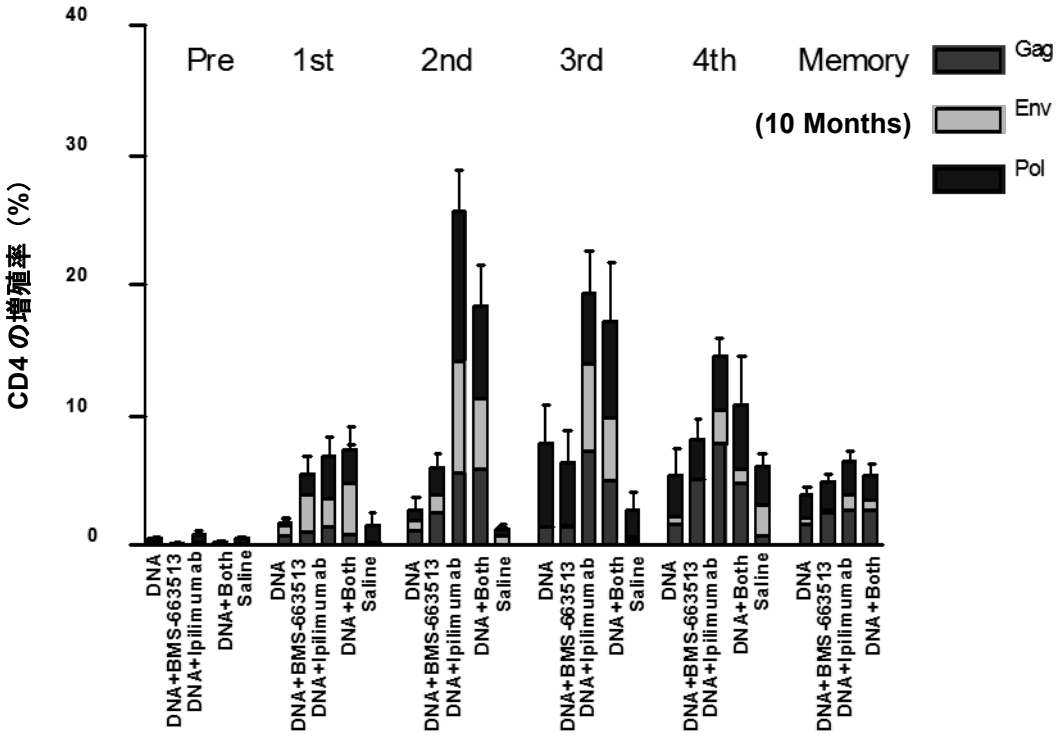
Figure 2.3.4.5-2: SIVペプチドに対する反応におけるCD8+ T細胞の増殖



カニクイザルに pSIVgag、pSIVenv 及び pSIVpol（DNA）の各 2 mg 又は生理食塩水（Saline）の筋肉内投与を 4 回行った。また、BMS-663513（DNA + BMS-663513）、Ipilimumab（DNA + Ipilimumab）又は BMS-663513 と Ipilimumab（DNA + BMS-663513 + Ipilimumab）を静脈内投与した。PBMC の測定は、投与前（Pre）及び各抗原感作（1st、2nd、3rd、4th）の 2 又は 4 週間後に実施した。測定点ごとに PBMC を CFSE で標識し、抗原性ペプチドで 5 日間刺激した。刺激後に細胞を表現型マーカー用に染色し、フローサイトメトリーにより測定した。メモリー免疫反応の評価を最終感作の 10 ヵ月後に行った（Memory）。エラーバーは標準誤差を示す。

出典：【モジュール 4.2.1.1-8】

Figure 2.3.4.5-3: SIVペプチドに対する反応におけるCD4+ T細胞の増殖



カニクイザルに pSIVgag、pSIVenv 及び pSIVpol（DNA）の各 2 mg 又は生理食塩水（Saline）の筋肉内投与を 4 回行った。また、BMS-663513（DNA + BMS-663513）、Ipilimumab（DNA + Ipilimumab）又は BMS-663513 と Ipilimumab（DNA + BMS-663513 + Ipilimumab）を静脈内投与した。PBMC の測定は、投与前（Pre）及び各抗原感作（1st、2nd、3rd、4th）の 2 又は 4 週間後に実施した。測定点毎に PBMC を CFSE で標識し、抗原性ペプチドで 5 日間刺激した。刺激後に細胞を表現型マーカー用に染色し、フローサイトメトリーにより測定した。メモリー免疫反応の評価を最終感作の 10 ヵ月後に行った（Memory）。エラーバーは標準誤差を示す。

出典：【モジュール 4.2.1.1-8】

CD4+ T 細胞増殖が最大である 2 回目の抗原感作後に採取し、凍結保存した PBMC について IL-4 ELISpot 分析を実施した【モジュール 4.2.1.1-8】。Ipilimumab 投与群の IL-4 産生細胞数（500 超／100 万 PBMC）は DNA 単剤投与群又は BMS-663513 投与群の IL-4 産生細胞数（100 超／100 万 PBMC）に比べて多かった。BMS-663513 と Ipilimumab の併用投与群では、Ipilimumab 単剤投与群と類似した効果が認められた。これらの結果は IL-4 の反応が増大したことを示すが、IL-4 産生細胞数は IFN-γ 産生細胞数に比べて著明に少なかったことから、Ipilimumab の追加投与により T 細胞の増殖のみでなく多機能性の亢進が示唆された。

試験期間中、各抗原感作の 2 又は 4 週間後に採取した新鮮な血液を用いて末梢血リンパ球のフェノタイピングを実施し、その後は月 1 回の頻度で実施した。その結果、Ipilimumab の単剤投与群又は BMS-663513 との併用投与群は、CD25 及び PD-1 を発現する CD4+ T 細胞（Day 44 及び 72、$p < 0.05$）並びにケモカイン受容体 7（CCR7）を共発現する CD4+ T 細胞（Day 44 及び 116、$p < 0.05$）の割合

を DNA 単剤投与群に比べて増大させることが示された【モジュール 4.2.1.1-10】。また、末梢免疫細胞を SIV ペプチド抗原に曝露した場合、Ipilimumab 投与群では CD4+及び CD8+セントラルメモリー（$CD28^{hi}$、$CD95^{hi}$）T 細胞反応と同様に、短命な CD8+エフェクター（$CD28^{lo}$、$CD95^{hi}$）T 細胞反応のさらなる増強が観察された [36)]。

以上のように、SIV DNA による感作に反応して、Ipilimumab は T 細胞の増殖能を亢進させ、BMS-663513 は抗原特異的な IFN-γ 反応を増大させたが、BMS-663513 と Ipilimumab の追加投与は、IFN-γ 反応及び T 細胞の増殖能を各抗体投与の場合と同等のレベルで増大させた。また、フェノタイピングの結果、Ipilimumab が DNA ワクチンの接種後の末梢免疫細胞群の構成を変化させることが示された。

3 副次的薬理試験

該当なし

4 安全性薬理試験

ICH S6 ガイダンス（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）及び ICH S7A ガイダンス（安全性薬理試験ガイドライン）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 ガイドラインに準じて、Ipilimumab を静脈内投与したときの心血管系、中枢／末梢神経系又は呼吸系に及ぼす影響を、サルの反復投与毒性試験（GLP 適用）の一部として評価した【モジュール 2.6.3、Table 2.6.3.4】。その結果、Ipilimumab のサルにおける 6 ヵ月間までの反復投与毒性試験では、心血管系、呼吸系及び中枢系機能の評価［行動、姿勢、協調運動、末梢／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 ヵ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【モジュール 4.2.3.2-2】【モジュール 4.2.3.2-3】【モジュール 4.2.3.2-4】【モジュール 4.2.3.2-6】【モジュール 4.2.3.2-7】【モジュール 4.2.3.2-8】。

Ipilimumab の 10 mg/kg を単剤又は BMS-663513 との併用で 1 ヵ月間間歇静脈内投与（週 1 回計 4 回）した試験（DS06064 試験）において、投与開始前、投与終了時（Day 22）の Ipilimumab 高曝露時及び最終投与後約 10 週間の休薬後に安全性薬理評価（理学的検査として全身的な身体状態、呼吸、消化管、外皮、循環器、リンパ系、尿生殖器、眼科学的、耳科学的、筋骨格系検査）を実施した【モジュール 4.2.3.2-4】。また、体温を Day 1 の投与 1、4 及び 24 時間後に測定した。機能評価の項目としてそれぞれ、心血管系（胸部聴診による心音、心拍数及び大腿動脈拍動）、中枢神経系（行動、協調運動、運動性、筋緊張、自己受容性感覚、脊髄反射及び末梢／脳神経機能検査）及び呼吸系（胸部聴診による肺音、呼吸数及び直腸プローブによるパルスオキシメーターでの動脈血酸素飽和度）を評価した。さらに、覚醒下サルの四肢誘導心電図検査を、投与開始前、Day 15 の Ipilimumab 投与後の高曝露時及び最終投与後約 10 週間の休薬後に実施した。評価は各動物につき 300 の心周期データの集積及び解析により行った。解析に用いた拍動数（平均値）、RR 間隔、心拍数、P 波幅、PR 間隔、QRS 群幅、QT 間隔、補正 QT（QTcf）、P 波振幅、R 波振幅、T 波高、逆転 T 波高及び ST 上昇を定量的心電図データとした。不整脈又はその他の波形異常を評価するため各心電図の定性的評価も実施した。これらの評価の結果、心血管系、中枢神経系及び呼吸系に本剤投与に関連した影響は認められなかった。

カニクイザルの 6 ヵ月間投与試験（01-3460 試験）において、10 mg/kg の Ipilimumab を単剤又はワクチン（SK-mel 細胞）との併用で Day 0、28、56、84 及び 140 に投与した試験では、平均最大血漿中薬物濃度（初回及び最終投与の約 24 時間後の測定値）はそれぞれ 184 μg/mL 及び 261 μg/mL であり、平均トラフ濃度（初回投与の 27 日後及び最終投与の 29 日後の測定値）はそれぞれ 32 μg/mL 及び 52 μg/mL であった。本試験では、1 日 2 回の生死及び一般状態［嘔吐、便性状、その他分泌物及び健康状態若しくは毒性又は薬理作用に関連する症状（一般症状、外観、行動、活動性及び呼吸の異常）］の観察を基に評価した。また、理学的検査（全身状態、眼、呼吸異常行動、一般症状）を、試験開始前及び試験中週 1 回の頻度で実施した。その結果、安全性薬理評価項目も含めて投与に関連した影響は認められなかった。その他の反復投与毒性試験で実施した同様の評価においても、本剤投与に関連した影響は認められなかった【モジュール 4.2.3.2-2】【モジュール 4.2.3.2-3】【モジュール 4.2.3.2-5】【モジュール 4.2.3.2-7】【モジュール 4.2.3.2-8】。

しかし、探索的薬理試験（TIB-06-001）において、ケタミン鎮静下にて Ipilimumab を 10 mg/kg の用量でおよそ月に 2 回（投与日 : Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88）、サル免疫不全ウイルス（SIV）DNA ワクチンと併用投与した試験において、Day 58 に 1 例で Ipilimumab 投与の約 5 分後（試験抗原の投与から 2～3 分後）に呼吸困難、チアノーゼ、糸様脈及び心音の減弱を伴う infusion reaction が発現した【モジュール 4.2.1.3-1】。約 5 ヵ月後、本動物に Ipilimumab を一定速度で投与したが、同様の反応は惹起されなかった。本試験に関する詳細は、毒性試験の概要文【モジュール 2.6.6、3.1.2.4 項】に記載した。Ipilimumab の一定速度による 2 回目の投与では同様の infusion reaction は誘発されなかったことから、本反応と Ipilimumab 投与との関連性は不明であった。しかし、本例で認められた infusion reaction には、麻酔薬による血圧低下、急速投与による急性のサイトカイン放出などの交絡因子が関与している可能性が考えられた。Infusion reaction は、無麻酔下にて Ipilimumab の投与速度を調節したサルの毒性試験及び薬理試験では認められなかった。したがって、本動物で認められた infusion reaction の原因は明らかでないが、この反応は Ipilimumab の直接的な影響あるいは標的受容体である CTLA-4 への結合によるものではないと考えられる。

Ipilimumab の特異性とその分子量から、心筋イオンチャネルに結合することは考えにくいため、低分子量医薬品のようにイオン電流やチャネル選択性に影響を及ぼすことはないと考えられる [37]。Ipilimumab の薬理学的標的への特異性及び分子量の大きさから、本剤が心筋チャネル蛋白質の細胞内輸送、細胞シグナル伝達分子の活性や心血管系機能に関係するその他の蛋白質の発現に直接的な影響を与えることはないと考えられる。同様に、Ipilimumab はチトクローム P450 と相互作用も有さないと予測され、薬物相互作用はないと考えられた。

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を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 ヵ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【モジュール 4.2.3.2-4】。Ipilimumab の単剤投与又は BMS-663513 との併用投与時の Cmax 及び AUC（0-48h）値に差はみられなかった【モジュール 2.6.4、3.2.3 項】。Ipilimumab の単剤投与群又は 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（Table 2.3.4.4-1）。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。このように、BMS-663513 との併用投与は、Ipilimumab の T 細胞依存性抗原に対する抗体反応調節作用を変化させなかった【モジュール 4.2.3.2-4】。

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【モジュール 4.2.1.4-1】【モジュール 4.2.1.4-2】【モジュール 4.2.1.4-3】。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 ヵ月間間歇投与毒性試験【モジュール 4.2.3.2-4】の結果と一致した【モジュール 2.6.4、3.2.3 項】。Ipilimumab は SIV 特異的な T 細胞（CD4+及び CD8+）の増殖を亢進させたが、BMS-663513 は増強させなかった（2.3.4.5 項）。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。

Ipilimumab と MDX-1106（完全ヒト PD-1 IgG4 mAb）との併用での安全性を検討するため、カニクイザルを用いた 1 ヵ月間併用投与試験を実施した【モジュール 4.2.3.7.7-2】。また、両剤の併用投与が KLH に対する抗体反応に及ぼす影響を評価した。免疫細胞群の構成変化を確認するため、末梢血のフェノタイピングを異なる間隔で実施した。試験は溶媒対照群（注射用生理食塩水、7 mL/kg）、Ipilimumab 3 mg/kg と MDX-1106 10 mg/kg との併用投与群（低用量群）及び Ipilimumab 10 mg/kg と MDX-1106 50 mg/kg との併用投与群（高用量群）の 3 群で実施した。Ipilimumab 又は MDX-1106 は、週 1 回で計 4 回（Day 1、8、15 及び 22）静脈内投与した。各群とも雌雄各 5 例を用いた。本試験では Ipilimumab 又は MDX-1106 の単剤投与群を設けなかった。Ipilimumab 及び MDX-1106 の血清中濃度は変動が大きかったが、概して性差はなく用量に比例して増加し、各薬剤を単剤で投与した以前の試験結果と同様であった。19 例（高用量群の雄 1 例で Day 23 に死亡が観察されたため）中 10 例において、抗 MDX-1106 抗体が Day 28 又は 58 に検出された。Day 1 及び 22 の Ipilimumab の血清中濃度を比較した結果、試験期間中に薬物が軽度に蓄積されることが示唆された。19 例中 6 例（32%）において、抗 Ipilimumab 抗体が Day 28 又は 58 に検出されたが、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。抗 Ipilimumab 抗体の増加率は、免疫賦活抗体である MDX-1106 の薬理作用に起因するものであると考えられる。KLH に対する血清免疫グロブリン M 及び G（IgM 及び IgG）の反応を、Day 10 の KLH（750 μg）投与前及び投与後（Day 15、24、33 及び 40）に測定した。その結果、Ipilimumab 及び MDX-1106 の併用投与群では抗 KLH 抗体量が対照群に比較して増加した。低用量群では、Day 24 の抗 KLH IgM 及び IgG 反応が対照群のそれぞれ雄で 2.5 倍及び 2.7 倍並びに雌で 1.5 倍及び 2.3 倍に増大し、高用量群では雄で 1.6 倍及び 2.4 倍、雌で 1.5 倍及び 3.2 倍に増大した。本試験では Ipilimumab 及び MDX-1106 の単剤投与群を設定しておらず、各単剤での結果と直接的な比較ができないため、薬物相互作用の可能性についての言及には至らなかった。末梢血のフェノタイピングの結果、高用量群では Day 7 に CD3+CD4+ T 細胞数及び CD3+CD8+ T 細胞数に変動が大きいものの有意な増加（$p < 0.05$）がみられた。しかし、単球及びナチュラルキラー細胞数又はそれらの頻度に変化は認められなかった。これらの免疫細胞サブセット数又は頻度の有

意な変化は、過去の Ipilimumab 単剤投与試験でみられていないことから、これらの増加は免疫賦活抗体である MDX-1106 との併用投与の結果と考えられる。

Ipilimumab の臨床試験において、irAE の治療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、マウスの腫瘍モデルを用いて抗マウス CTLA-4 mAb の抗腫瘍効果に及ぼすデキサメタゾンの同時投与又は逐次投与の影響を評価した【モジュール 4.2.1.4.4】。腫瘍モデルとして、皮下に SA1N 線維肉腫腫瘍を移植した A/J マウスを用いた。デキサメタゾン（1 及び 10 mg/kg を 2 日に 1 回で 2 週間投与）及び抗 CTLA-4 mAb（5 mg/kg を 3～4 日に 1 回で 4 回投与）を併用した場合、抗 CTLA-4 の抗腫瘍効果は投与初期では維持されたが、Day 24 までに減弱し始めた。しかし、デキサメタゾンの 1 mg/kg を抗 CTLA-4 mAb の 2 回投与後に投与した場合には、CTLA-4 mAb 及びデキサメタゾンの併用投与群と CTLA-4 mAb の単剤投与群との間に抗腫瘍効果の差は認められなかった。CTLA-4 mAb の抗腫瘍効果の減弱は、CTLA-4 mAb の 2 回投与後にデキサメタゾン 10 mg/kg を投与した場合に認められたが、統計学的な有意差はみられなかった（$p > 0.05$）。また、デキサメタゾン（1 及び 10 mg/kg）の投与を CTLA-4 mAb の 3 回投与後に開始した場合には、CTLA-4 mAb 及びデキサメタゾンの併用投与群と CTLA-4 mAb の単剤投与群との間に抗腫瘍効果の有意な差は認められなかった（$p > 0.05$）。これらの結果は、CTLA-4 mAb の反復投与後にデキサメタゾンを投与した場合は、CTLA-4 阻害により誘導される抗腫瘍効果を消失させないことを示している。これらの結果は、抗 CTLA-4 抗体による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を支持している。

6 考察及び結論

がん治療の改善に結びつく発がんの分子機構の理解は著明に進歩したが、大部分の進行がん患者の 5 年生存率は依然として低いままである [38)]。この深刻な疾患の進行性及び転移性を抑制する新たな方法が必要である。抗腫瘍性の免疫反応が、時にがんの進行を遅延又は停止させることはよく知られている。しかし、これらの反応は弱いか不完全な場合が多い。腫瘍特異的 T 細胞を介する適応免疫は、腫瘍進行に対抗する主要免疫系の 1 つと認識されている。不十分な抗腫瘍 T 細胞反応を増強させる治療法はがんに対する新しい治療アプローチである。

エフェクターT 細胞の生成には、反応の程度と持続性を調節する複数のシグナルの調整を必要とする。ナイーブ T 細胞及び抗原刺激経験のある T 細胞の活性化には、CD28 の共刺激が必要である。CD28 の APC 上にある B7.1 又は B7.2 への結合は、T 細胞の増殖とサイトカインの産生を増加させ、また、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の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である CTLA-4 の役割については、以下のようなことが知られている。T 細胞が一度活性化されると、Treg 以外の休止 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強い親和性を有することから、CTLA-4 の発現が少なくても CD28 と競合可能である。CTLA-4 の阻害は、無制限な CD28 の共刺激、及び CTLA-4 と B7.1 及び B7.2 分子との相互作用による抑制性シグナルの除去によって、T 細胞反応の増大を誘導する。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ことが報告されている [26),39)]。

マウス腫瘍モデルにおいて、CTLA-4 を阻害する mAb の投与は、腫瘍増殖の遅延又は腫瘍を消失させる抗腫瘍免疫反応を誘導した。抗 CTLA-4 mAb の投与は、自己免疫疾患のモデルマウスにおける自己抗原に対する反応にも関与した。

Ipilimumab は、ヒト CTLA-4 に特異的な IgG_1 アイソタイプのヒト免疫グロブリンである。本剤は CTLA-4 に高い親和性を有し、CTLA-4 の B7.1 及び B7.2 への結合を効果的に阻害する。Ipilimumab は、活性化 T 細胞の補体を介した細胞傷害作用を惹起しなかった。*In vitro* 抗体依存性細胞傷害試験において、Ipilimumab の活性化 T 細胞の細胞傷害作用は低度～中程度であったが、*in vivo* の非臨床及び臨床試験の結果では、T 細胞の減少は認められなかった。Ipilimumab による CTLA-4 の阻害は、ヒト CTLA-4 トランスジェニックマウスモデルにおいて腫瘍増殖を阻止あるいは抑制した。また、カニクイザルを用いて実施した複数の試験においては、Ipilimumab が T 細胞依存的抗原に対する抗体反応を増強させ、また、SIV DNA ワクチンに対する T 細胞の増殖を亢進させることが示された。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ている[34),40),41)]。

以上のように、CTLA-4 mAb の非臨床腫瘍モデルにおける活性並びに *in vitro* 及び *in vivo* 試験結果は、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。

7 参考文献

1) 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.

2) 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.

3) Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. J Exp Med. 1996; 183(6):2541-2550.

4) Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. J Exp Med. 1996; 183(6):2533-2540.

5) Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science. 1996; 271:1734-1736.

6) Yang YF, Zou JP, Mu J, et al. Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. Cancer Res. 1997; 57(18):4036-4041.

7) Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, et al. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(15):8099-8103.

8) Paradis TJ, Floyd E, Burkwit J, et al. The anti-tumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFNγ. Cancer Immunol Immunother. 2001; 50:125-133.

9) Pedersen AE, Buus S, Claesson MH. Treatment of transplanted CT26 tumour with dendritic cell vaccine in combination with blockade of vascular endothelial growth factor receptor 2 and CTLA 4. Cancer Lett. 2006; 235(2):229-238.

10) Met O, Wang M, Pedersen AE, et al. The effect of a therapeutic dendritic cell-based cancer vaccination depends on the blockage of CTLA-4 signaling. Cancer Lett. 2006; 231(2):247-256.

11) Daftarian P, Song, GY, Ali S, et al. Two distinct pathways of immuno-modulation improve potency of p53 immunization in rejecting established tumors. Cancer Res. 2004; 64(15):5407-5414.

12) Hurwitz AA, Yu TF, Leach DR, et al. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(17):10067-10071.

13) Hurwitz AA, Foster BA, Kwon ED, et al. Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic model using CTLA-4 blockade. Cancer Res. 2000; 60(9):2444-2448.

14) Espenschied J, Lamont J, Longmate J, et al. CTLA-4 blockade enhances the therapeutic effect of an attenuated poxvirus vaccine targeting p53 in an established murine tumor model. J Immunol. 2003; 170(6):3401-3407.

15) van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. J Exp Med. 1999; 190(3):355-366.

16) Davila E, Kennedy R, Celis E. Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. Cancer Res. 2003; 63(12):3281-3288.

17) Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating FoxP3+CD25+CD4+ regulatory T cells. J Exp Med. 2005; 202:885-891.

18) Kocak E, Lute K, Chang X, et al. Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. Cancer Res. 2006; 66(14):7276-7284.

19) Li B, VanRoey M, Wang C, et al. Anti-programmed death-1 synergizes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell immunotherapy providing therapeutic benefit to mice with established tumors. Clin Cancer Res. 2009; 15(5):1623-1634.

20) Kwon ED, Foster BA, Hurwitz AA, et al. Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(26):15074-15079.

21) Mokyr MB, Kalinichenko T, Gorelik L, et al. Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. Cancer Res. 1998; 58(23):5301-5304.

22) Demaria S, Kawashima N, Yang AM, et al. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. Clin Cancer Res. 2005; 11(2 Pt 1):728-734.

23) Shrikant P, Khoruts A, Mescher MF. CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. Immunity. 1999; 11(4):483-493.

24) Sabel MS, Hess SD, Egilmez NK, et al. CTLA-4 blockade augments human T lymphocyte-mediated suppression of lung tumor xenografts in SCID mice. Cancer Immunol Immunother. 2005; 54(4):944-952.

25) May KF Jr, Roychowdhury S, Bhatt D, et al. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies. Blood. 2005; 105(3):1114-1120.

26) 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.

27) Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, et al. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol. 1996; 157(4):1333-1336.

28) Zhu J, Zou L, Zhu S, et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade enhances incidence and severity of experimental autoimmune neuritis in resistant mice. J Neuroimmunol. 2001; 115(1-2):111-117.

29) Luhder F, Hoglund P, Allison JP, et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. J Exp Med. 1998; 187(3):427-432.

30) Korman A, Halk E, Lonberg N, inventors; Medarex Inc., Princeton, NJ, assignee, Human CTLA-4 Antibodies and Their Uses. 15-Sept-2005. US patent 2005/0201994A1.

31) Biophysical Characterization of Protein Reagents Used in MDX-010 SPR Experiments, Memo Report. Bristol-Myers Squibb Company, [redacted] BMS Document Control Number 930019505.

32) 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.

33) 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.

34) Liakou CI, Kamat A, Tang DN, et al. CTLA-4 blockade increases IFNγ-producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(39):14987-14992.

35) Keler T, Halk E, Vitale L, et al. Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. J Immunol. 2003; 171(11):6251-6259.

36) Hokey DA, Yan J, Hirao LA, et al. CLTA-4 blockade in vivo promotes the generation of short-lived effector CD8 T cells and a more persistent central memory CD4 T cell response. J Med Primatol. 2008;37 Suppl 2:62-68.

37) Tamargo J, Caballero R, Gomez R, et al. Pharmacology of cardiac potassium channels. Cardiovasc Res. 2004; 62:9-33.

38) American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2009. American Cancer Society website. Available at: http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2009.asp. Accessed on 19-Jan-2010.

39) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science. 2008; 322:271-275.

40) 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

41) 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.

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

ブリストル・マイヤーズ株式会社

目次

1 薬理試験：一覧表 3
2 効力を裏付ける試験 8
3 副次的薬理試験 12
4 安全性薬理試験 13
5 薬力学的薬物相互作用試験 17

1 薬理試験：一覧表

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview **Test Article: Ipilimumab**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Dossier
Primary Pharmacodynamics					
Binding of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) to human CTLA-4	Recombinant Human CTLA-4 - ELISA	*In vitro*	Medarex Inc.	US patent 2005/0201994 A1 Korman A, Halk E, and Lonberg N, inventors	【モジュール 4.3】
Binding of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) to human CTLA-4 expressed on cells	T cell hybridoma transfected with human CTLA-4 (58αβCTLA-4 cells) - Flow cytometry	*In vitro*	Medarex Inc.	US patent 2005/0201994 A1 Korman A, Halk E, and Lonberg N, inventors	【モジュール 4.3】
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on the binding of human CTLA-4 to B7.1(CD80) and B7.2 (CD86)	Fluorophore-conjugated CD80 and CD86 fusion proteins binding to human CTLA-4 expressed on 58αβCTLA-4 cells - Flow cytometry	*In vitro*	Medarex Inc.	MDX-010-008-R/ 930020099	【モジュール 4.2.1.1-1】
Binding of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) to human Fcγ receptors (FcγR)	Recombinant human FcγRI, FcγRIIA and FcγRIIIB - ELISA	*In vitro*	Bristol-Myers Squibb	930022419	【モジュール 4.2.1.1-2】
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on complement dependent cytotoxicity (CDC)	Activated human T cells incubated with ipilimumab and human or baby rabbit complement - Colorimetric assay and incorporation of propidium iodide	*In vitro*	Medarex Inc. and Bristol-Myers Squibb	MDX-010-006-R/ 930020459 930025694	【モジュール 4.2.1.1-3】 【モジュール 4.2.1.1-4】
Effect of ipilimumab (BMS-734016,	Activated human T cells	*In vitro*	Medarex Inc. and	MDX-010-00	【モジュール

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview **Test Article: Ipilimumab**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Dossier
MDX-010) on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)	incubated with ipilimumab and human peripheral mononuclear cells - Chromium-release assay and BATDA dye release assay		Bristol-Myers Squibb	6-R/ 930020459 930023602 MDX-010-01 5-SR/ 930026820	4.2.1.1-3】【モジュール 4.2.1.1-5】【モジュール 4.2.1.1-6】
Effect of Ipilimumab in a Human CTLA-4 Mouse Transgenic MC38 Model	MC38 colon adenocarcinoma tumor line implanted in transgenic mice expressing human CTLA-4 in the C57BL/6 mouse CTLA4 -/- background	Intraperitoneal	Medarex Inc.	MDX-010-00 5-R/ 930020107	【モジュール 4.2.1.1-7】
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on the immune response to HBsAg vaccine/cynomolgus monkeys	Ipilimumab (10 mg/kg) administered on days 1 and 29 in combination with HBsAg HBsAg vaccine mixed with Oligo-CpG (500 µg), administered on day 2	Ipilimumab: intravenous HBsAg: intramuscular	[redacted] and Medarex Inc.	0992-128/ 930009968	【モジュール 4.2.3.2-5】
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on the immune response to Sk-mel (GM-CSF-secreting vaccine)/cynomolgus monkeys[a]	Ipilimumab (10 mg/kg) administered on days 0, 28, 56, 84, and 140 in combination with Sk-mel GM-CSF vaccine ($5x10^6$ cells) administered on days 0, 28, 56, 84, and 140	Ipilimumab: intravenous Sk-mel GM-CSF vaccine: subcutaneous	[redacted] and Medarex Inc.	01-3460/ 930009980	【モジュール 4.2.3.2-8】
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on the immune response to HBsAg and Sk-mel/cynomolgus monkeys[a]	Ipilimumab, Process A ([redacted] (10 mg/kg) administered once monthly for 3 months Ipilimumab, Process B ([redacted] (0.1, 1, 10 mg/kg) administered once	Ipilimumab: intravenous	[redacted] and Medarex Inc.	1416-128/ 930009973	【モジュール 4.2.3.2-7】

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview **Test Article: Ipilimumab**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Dossier
	monthly for 3 months Ipilimumab, Process B (1 mg/kg) administered once weekly for 10 weeks HBsAg (10 μg) or Sk-mel GM-CSF ($5x10^6$ cells) administered once/month for 3 months on the same days as antibody injection	HBsAg: intramuscular Sk-mel vaccine: subcutaneous			
Effect of ipilimumab (BMS-734016, MDX-010) on the immune response to HBsAg, Sk-mel and DNP-Ficoll/cynomolgus monkeys	Ipilimumab (10 mg/kg) administered on days 1, 29, 57, and 140 in combination with HBsAg (10 μg) or Sk-mel ($5x10^6$ cells) on days 1, 29, 57 or DNP-Ficoll (100 μg) on days 1, 29	Ipilimumab: intravenous HBsAg: intramuscular Sk-mel vaccine: subcutaneous DNP-Ficoll: intradermal	[redacted] and Medarex Inc.	SUV00006/ 930021733	【モジュール 4.2.3.2-6】
Effect of ipilimumab on the immune response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) [a]	Ipilimumab (10 mg/kg) alone or in combination with BMS-663513 (100 mg/kg) administered weekly for 4 weeks KLH (10 mg/animal) was administered on day 10	Ipilimumab: intravenous BMS-663513: intravenous KLH: intramuscular	Bristol-Myers Squibb	DS06064/ 930021064	【モジュール 4.2.3.2-4】
Effect of ipilimumab on the immune response to simian immunodeficiency virus (SIV) DNA vaccines	Ipilimumab (10 mg/kg) alone or in combination with BMS-663513 (10 mg/kg) administered on Study Days 4, 9, 30, 32, 58, 60, 86, and 88 SIV DNA vaccines (SIV gag, SIV pol and SIV env) /1 mg each/ Study Days 1, 2; 29, 30;	Ipilimumab: intravenous BMS-663513: intravenous SIV DNA vaccines: intramuscular	Bristol-Myers Squibb	TIB-06-001/ 930031729/ 930022368/ 930041502	【モジュール 4.2.1.1.9】 【モジュール 4.2.1.1.8】 【モジュール 4.2.1.1.10】

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview **Test Article: Ipilimumab**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Dossier
	57,58; and 85, 86				
Secondary Pharmacodynamics					
Not Applicable					
Safety Pharmacology					
A 2-week (q3d x 3) toxicity study of human anti-CTLA4 administered by intravenous injection to cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted]	0919-128/ 930009982	【モジュール 4.2.3.2-2】
14-day (q3d x 3) intravenous toxicity study with mAb 10D1 in cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted]	7114-100/ 930009970	【モジュール 4.2.3.2-3】
BMS-663513 and BMS-734016: One-month intravenous combination toxicity study in monkeys[a]	Cynomolgus Monkey	Intravenous	Bristol-Myers Squibb	DS06064/ 930021064	【モジュール 4.2.3.2-4】
An (2-month) immunogenic study following combined intravenous/ intramuscular administration of MAb10D1/HBsAg, respectively, to cynomolgus monkeys	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted]	0992-128/ 930009968	【モジュール 4.2.3.2-5】
A (79-day) repeated dose toxicity and efficacy study of MDX-010 or MDX-010-[redacted] in combination with HBsAg and SKMel vaccines in cynomolgus monkeys[a]	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted]	1416-128/ 930009973	【モジュール 4.2.3.2-7】
An investigative repeat-dose toxicity and efficacy study of MDX-010, 4C5, and 5H1 in combination with HBsAg, DNP-Ficoll and SKMel immunostimulants following three monthly administrations	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted] and Medarex Inc.	SUV00006/ 930021733	【モジュール 4.2.3.2-6】
Effect of BMS-734016, BMS-663513, or their combination on the immune responses to simian immunodeficiency virus DNA test antigens	Cynomolgus Monkey	Intravenous	Bristol-Myers Squibb	TIB-06-001/ 930022368	【モジュール 4.2.1.1-9】

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview **Test Article: Ipilimumab**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Dossier
MDX-CTLA4: A 6-month intravenous toxicity study in cynomolgus monkeys[a]	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted]	01-3460/ 930009980	【モジュール 4.2.3.2-8】
Pharmacodynamic Drug Interaction					
BMS-663513 and BMS-734016: One-month intravenous combination toxicity study in monkeys. Effect on the immune response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) [a]	Cynomolgus Monkey	Intravenous	Bristol-Myers Squibb	DS06064/ 930021064	【モジュール 4.2.3.2-4】
Effect of BMS-734016, BMS-663513, or their combination on the immune responses to simian immunodeficiency virus DNA test antigens	Cynomolgus Monkey	Intravenous	Bristol-Myers Squibb	TIB-06-001/ 930022368/ 930031729/ 930041502	【モジュール 4.2.1.1-9】 【モジュール 4.2.1.1-8】 【モジュール 4.2.1.1-10】
A 4-week combination toxicity study of MDX-010 and MDX-1106. Effect on the immune response to keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunophenotypic analysis of peripheral blood immune cells[a]	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted] and Medarex Inc.	[redacted]00106/ 930036346	【モジュール 4.2.3.7.7-2】
Effects of Anti-CTLA-4 and Dexamethasone in a Therapeutic SA1/N Tumor Model	Mouse/A/J	Intraperitoneal	Medarex Inc.	MDX-010-00 1-R/ 930020103	【モジュール 4.2.1.4-4】

[a] GLP compliant

2 効力を裏付ける試験

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
Recombinant CTLA-4	Human	*In vitro*	0.0004 - 1 µg/mL	-	Half-maximal binding at 15 ng/mL and binding saturation at approximately 0.1 µg/mL	No	US patent 2005/0201994A1 Korman A, Halk E, and Lonberg N, inventors
CTLA-4 expressing cells	Human	*In vitro*	0.001 - 5 µg/mL	-	Half-maximal binding at 190 ng/mL, and binding saturation between 1 to 10 µg/mL	No	US patent 2005/0201994A1 Korman A, Halk E, and Lonberg N, inventors
Blockade of binding of recombinant B7.1 (CD80) or B7.2 (CD86) to a human CTLA-4-expressing cell line	Human	*In vitro*	0.009 - 20 µg/mL	-	EC_{50} for B7.1 (CD80) blockade = 0.169 µg/mL Maximal inhibition at 6 to 20 µg/mL EC_{50} for B7.2 (CD86) blockade = 0.211 µg/mL Maximal inhibition at 1 to 3 µg/mL	No	MDX-010-008-R/ 930020099
Binding of ipilimumab to Fcγ receptors (FcγR)	Human	*In vitro*	0.0002- 800 µg/mL	-	FcγRI/CD64 EC_{50} = 0.27 µg/mL FcγRIIA/CD32A and FcγRIII/CD16 EC_{50} > 800 µg/mL	No	STR-131/ 930022419
Complement-dependent cytotoxicity (CDC) of activated T cells	Human	*In vitro*	0.1 - 50 µg/mL	-	Ipilimumab did not elicit CDC of activated T cells in the presence of human or baby rabbit complement	No	MDX-010-006-R/ 930020459 930025694

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
Activated T cells	Human	*In vitro*	10 µg/mL	-	Ipilimumab showed non-detectable to moderate levels of ADCC in the presence of fresh effector cells	No	930023602
					Ipilimumab (Process A and Process B) did not elicit ADCC in autologus mononuclear:effector cell assays	No	MDX-010-015-SR/ 930026820
					Ipilimumab showed low to moderate (< 8-55% lysis) ability to elicit ADCC in the presence of IL-2-activated effector cells	No	MDX-010-006-R/ 930020459
Whole animal	Mouse/Human CTLA-4 transgenic mice in C57BL/6 CTLA-4 $^{-/-}$ background	Intraperitoneal	10 mg/kg on days 0, 3, 6, 10	MF, 8-10/group	Ipilimumab produced tumor rejection of MC38 tumors in 10-50% of mice or delay in tumor growth	No	MDX-010-005-R/ 930020107
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg on days 1, 29	2M/2F	Ipilimumab significantly enhanced the antibody response to hepatitis surface antigen (HBsAg) ($p < 0.05$) on Study Days 51 and 64	No	0992-128/ 930009968
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg on days 0, 28,	3M/3F	Ipilimumab significantly enhanced the antibody	Yes	01-3460/

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
			56, 84, 140		response to a whole cell melanoma vaccine (Sk-mel) expressing GM-CSF ($p < 0.05$)		930009980
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg Process A or 0.1, 1 or 10 mg/kg Process B on days 1, 29, 57 1 mg/kg Process B on days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64	3M/3F	Ipilimumab at 10 mg/kg produced by Process A or Process B induced an antibody response to HBsAg or Sk-mel of a greater magnitude than control animals	Yes	1416-128/ 930009973
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg on days 1, 29, 57, 140	3M/3F	Higher antibody titers to Sk-mel and HBsAg vaccines compared to control animals. Consistent increases in the percentage of T cell memory populations (defined as $CD3^+CD45RO^+$ or $CD3^+CD45RA^-$) were detected 2 weeks after each treatment with ipilimumab. On Study Days 71 and 154, increases in the	No	SUV00006/ 930021733

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
					percentage of CD4 central memory cells ($CD4^+CD28^+CD95^+$) were measured in animals treated with ipilimumab.		
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg weekly for 4 weeks	5M/5F	Significant enhancement of the KLH-specific antibody response from Study Day 23 ($p < 0.05$)	Yes	DS06064/ 930021064
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	10 mg/kg on Study Days 4, 9, 30, 32, 58, 60, 86, 88	4M/2F	Ipilimumab alone or in combination with BMS-663513 enhanced proliferation of antigen-specific $CD4^+$ ($p < 0.05$) and $CD8^+$ T cells on Study Day 44.	No	TIB-006-001/ 930031729/ 930022368/ 930041502

3 副次的薬理試験

該当なし

4 安全性薬理試験

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings[a]	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
Parameters of cardiovascular, neurologic, and respiratory function via clinical observations[b]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	3 or 10 Days 1, 4, 7	3 mg/kg: M2 10 mg/kg: M2/F2	No findings related to treatment with ipilimumab.	Yes	0919-128/ 930009982
Parameters of cardiovascular, neurologic and respiratory function via clinical observations and physical exams[c]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	3 or 30 Days 1, 4, 7	3 mg/kg: M2 30 mg/kg: M2/F2	No findings related to treatment with ipilimumab.	Yes	7114-100/ 930009970
Parameters of cardiovascular, neurologic, and respiratory function and clinical observations and physical exams[d]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	0 or 10 Days 1, 8, 15, 22(alone or in combination with anti-CD137 mAb BMS-663513 at 100 mg/kg)	M5/F5	No findings related to treatment with ipilimumab.	Yes	DS06064/ 930021064
Parameters of cardiovascular, neurologic and respiratory function via clinical	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	0 (10 mg/kg of a negative control antibody, mAbRSV) or 10	M2/F2	No findings related to treatment with ipilimumab.	No	0992-128/ 930009968

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings[a]	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
observations[b]			Days 1, 29				
Parameters of cardiovascular, neurologic and respiratory function via clinical observations and ophthalmologic exams[e]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Process A 10, once monthly for 3 doses Process B 0, 0.1, 1, or 10, once monthly for 3 doses 1, once weekly for 10 weeks	M3/F3	No findings related to treatment with ipilimumab.	Yes	1416-128/ 930009973
Parameters of cardiovascular, neurologic, and respiratory function via clinical observations[b]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	0, 10 Days 1, 29, 57, 140	M3/F3	No findings related to treatment with ipilimumab.	No	SUV00006/ 930021733
Parameters of cardiovascular, neurologic and respiratory function via clinical observations and physical exams[f]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	0, 10 Days 4, 9, 30, 32, 58, 60, 86, 88	M8/F4 (inclusive of 2 ipilimumab groups with [n = 4M and 2F/group] with or without BMS-663513 anti-CD137 mAb)	1 monkey receiving ipilimumab in combination with SIV DNA vaccines developed an infusion reaction while under ketamine sedation, accompanied by difficulty in breathing, cyanosis, thready pulse, and muffled heart sounds, at approximately 5 minutes following ipilimumab injection on Day 58 and approximately 2 to 3 minutes	No	TIB-06-001/ 930022368

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings[a]	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
					following administration of SIV antigens. Rechallenge with a controlled infusion of ipilimumab approximately 5 months later did not evoke a similar reaction. Since the infusion reaction was not reproducible after a subsequent controlled ipilimumab rechallenge, the drug relationship to this event remains unclear; however, the occurrence of acute cytokine release resulting from a rapid injection rate with complicating factors of anesthesia-induced hypotension and immunogenicity in this monkey is possible.		
Parameters of cardiovascular, neurologic and respiratory function via clinical observations and physical exams[g]	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	0, 10 Days 0, 28, 56, 84, 140	M5/F5 (inclusive of 2 ipilimumab groups with [n = 3/sex] or without [n = 2/sex] SK-mel vaccine)	No findings related to treatment with ipilimumab.	Yes	01-3460/ 930009980

[a] Only noteworthy findings relevant to safety pharmacology are presented. Other findings from these studies are described in the Nonclinical Toxicology Summary (Module 2.6.6).

[b] In the 2-week (0919-128), 2-month (0992-128), and 3-month (SUV00006) studies with ipilimumab, clinical observations were performed twice daily.

[c] In the 2-week study (7114-100) with ipilimumab, cage-side clinical observations were recorded once daily at 1 hr postdose on the days of dosing, detailed physical observations were performed once weekly, and veterinary physical examinations were conducted prior to study start and on Day 11.

[d] In the 1-month study (DS06064), these assessments included clinical observations once daily at ~1-4 hr postdose and veterinary physical assessment of general body condition, and the respiratory, gastrointestinal, integumentary, circulatory (including body temperature), lymphatic, urogenital, ophthalmologic, otologic, and musculoskeletal systems prior to study start and at 1-2 hr postdose on Days 22 and after an approximate 10-week dose-free observation period. Body temperatures were also recorded at 1, 4, and 24 hours postdose on Day 1. Criteria for cardiovascular evaluation included heart sounds by thoracic auscultation, heart rate, and femoral pulse rate; criteria for central-nervous system evaluation included behavior, coordination/balance, movement, muscle tone, proprioception, spinal reflexes, and peripheral and cranial nerve function; and criteria for respiratory evaluation included lung sounds by thoracic auscultation, and respiratory rate. Arterial oxygen saturation was also measured using pulse oximetry by rectal probe prior to study start and at 1-2 hr postdose on Days 22 and after an approximate 10-week dose-free observation period. In addition, 10-lead electrocardiograms (ECG) were obtained from conscious monkeys using a limb-lead only configuration prior to the first dose, at the completion of dosing on Day 15 at the time of high ipilimumab serum levels, and after an approximate 10-week dose-free observation period. Efforts were made to collect and evaluate 300 cardiac cycles per animal. Quantitative ECG data collected included the following parameters: number of beats collected (number averaged), R-R interval, heart rate, P wave duration, PR interval, QRS complex duration, QT interval, corrected QT (QTcf), P wave amplitude, R wave amplitude, T wave height, T wave height negative, and ST segment elevation. Qualitative assessment of each ECG was also performed to assess for arrhythmias or other waveform abnormalities.

[e] In the 79-day study (1416-128), cage-side clinical observations were recorded twice daily and veterinary ophthalmologic examinations were conducted prior to study start and on Day 74.

[f] In the 4-month study (TIB-06-001), physical examinations were conducted on the days of vaccine and/or ipilimumab administration (ie, Days 1, 2, 4, 9, 29, 30, 32, 57, 58, 60, 85, 86, and 88).

[g] In the 6-month study (01-3460), cage-side clinical observations were recorded twice daily (before and after dose on dosing days), and physical examinations were performed once weekly.

5 薬力学的薬物相互作用試験

Table 2.6.3.5: Pharmacodynamic Drug Interactions **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Ipilimumab: 10 mg/kg BMS-663513: 100 mg/kg	M5/F5	Ipilimumab significantly enhanced anti-KLH antibody response ($p < 0.05$). Co-treatment with BMS-663513 did not alter the magnitude of the response.	Yes	DS06064/ 930021064
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Ipilimumab: 10 mg/kg BMS-663513: 10 mg/kg	M4/F2	Ipilimumab alone or in combination with BMS-663513 enhanced proliferation of antigen-specific $CD4^+$ ($p < 0.05$) and $CD8^+$ T cells on Study Day 44. Co-treatment with BMS-663513 did not alter the magnitude of the response.	No	TIB-006-001/ 930031729/ 930022368/ 930041502
Whole animal	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Ipilimumab at 3 mg/kg plus MDX-1106 at 10 mg/kg Ipilimumab at 10 mg/kg plus MDX-1106 at 50 mg/kg	M5/F5	Ipilimumab at 3 mg/kg plus MDX-1106 at 10 mg/kg enhanced the anti-KLH IgM and IgG response relative to control by 2.5x and 2.7x in males and 1.5x and 2.3x in females, respectively (Day 24). Ipilimumab at 10 mg/kg plus MDX-1106 at 50 mg/kg increased the anti-KLH IgM and IgG response relative to control by 1.6x and 2.4 in males and 1.5x and 3.2x in females, respectively(Day 24). Ipilimumab at 10 mg/kg plus MDX-1106 at 50 mg/kg showed	Yes	SUV00106/ 930036346

Table 2.6.3.5: Pharmacodynamic Drug Interactions **Test Article: Ipilimumab**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Document Control No.
					significant increases in the number of $CD20^+$ B cells on day 28 ($p < 0.05$), and variable but significant increases in the number and frequency of $CD3^+$ $CD4^+$ T cells and $CD3^+$ $CD8^+$ T cells on day 7 ($p < 0.05$). Since changes in these immune cell subsets were not observed with ipilimumab alone in previous studies it is possible that these effects were the result of concurrent treatment with MDX-1106.		
Whole animal	Mouse/A/J Mice were implanted subcutaneously with SA1/N fibrosarcoma cells	Intraperitoneal	Monoclonal antibody (mAb) to mouse CTLA-4, clone 9D9 was administered at doses of 5 or 10 mg/kg Dexamethasone was administered at doses of 1 and 10 mg/kg	F/9 to 10 mice/group	Antitumor activity of anti-CTLA-4 mAb (10 mg/kg) was not affected by Dexamethasone treatments (1 or 10 mg/kg, every other day) if treatments were initiated after 3 doses of anti-CTLA-4 mAb. Dexamethasone reduced the antitumor activity of CTLA-4 mAb if dosed concurrently with CTLA-4 mAb.	No	MDX-010-001-R/ 930020103