CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6　毒性試験の概要文

ブリストル・マイヤーズ株式会社

用語及び略語一覧

ADA	anti drug antibody	抗薬物抗体
ANA	anti nuclear antibody	抗核抗体
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度時間曲線下面積
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Cmax	maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4	細胞傷害性 T リンパ球抗原 4
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DNP	dinitrophenyl	ジニトロフェニル
DTH	delayed-type hepersensitibity	遅延型過敏症
DTPA	diethylene triamine pentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
ePPND	enhanced pre 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
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
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
HCl	hydrochloric acid	塩酸
HYB	hybridoma	ハイブリドーマ
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
irAE	immune-related adverse event	免疫に関連した有害事象
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LD50	50% lethal dose	半数致死量
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
MHC	major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
N/A	not applicable	該当なし
NaOH	sodium hydroxide	水酸化ナトリウム
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
Oligo-CpG	immuno-enhancing CpG Oligonucleotide	免疫賦活シトシン-リン酸-グアニン-オリゴ核酸
PBMC	peripheral-blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PK	pharmacokinetics	薬物動態
RSV	respiratory sincytial virus	RS ウイルス
SCE	sister chromatid exchange	姉妹染色体分体交換
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	ヒト悪性黒色腫細胞
S/N	signal to noise	信号対雑音
TDAR	T-cell-dependent antibody response	T 細胞依存性抗体反応
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

Treg	regulatory T cell	制御性 T 細胞

目次

1 まとめ 7
2 単回投与毒性試験 12
3 反復投与毒性試験 12
3.1 サル反復毒性試験 12
3.1.1 重要な試験 13
3.1.1.1 サル 2 週間間歇（q3d×3）静脈内投与毒性試験 13
3.1.1.2 サル 1 ヵ月間間歇（qw×4）静脈内併用投与（± BMS-663513）毒性試験 14
3.1.1.3 サル 3 ヵ月間（79 日間）間歇静脈内投与毒性・生物活性同等性試験 15
3.1.1.4 サル 6 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与毒性試験 16
3.1.2 探索的反復投与毒性試験（重要な試験以外の試験） 17
3.1.2.1 サル 2 週間間歇（q3d×3）静脈内投与探索的毒性試験 17
3.1.2.2 サル 2 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与探索的毒性・生物活性試験 18
3.1.2.3 サル 3 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与探索的毒性・生物活性試験 19
3.1.2.4 サル 4 ヵ月間静脈内間歇併用投与探索的薬理試験 20
4 遺伝毒性 22
5 がん原性試験 22
6 生殖発生毒性試験 22
6.1 サルにおける出生前及び出生後の発生に関する静脈内投与試験及び出生後 6 ヵ月間評価 22
7 局所刺激性試験 26
8 その他の毒性試験 26
8.1 免疫原性 26
8.2 免疫毒性 27
8.3 毒性発現の機序に関する試験 29
8.4 依存性 29
8.5 代謝物の毒性試験 29
8.6 不純物及び原薬関連分子種の安全性評価 29
8.7 組織交差反応性及び結合性 30
8.7.1 正常ヒト組織における蛍光標識 Ipilimumab の交差反応性 30
8.7.2 正常ヒト組織における蛍光標識 Ipilimumab の交差反応性（追加試験） 30
8.7.3 マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける組織結合性比較試験 31

8.8 *In vitro* 細胞増殖及びサイトカイン放出の評価 32
8.8.1 ヒト末梢血単核細胞を用いた in vitro 細胞増殖及びサイトカイン放出試験 32
8.8.2 Ipilimumab 及びMDX-1106 の併用によるヒト末梢血細胞のサイトカイン放出ex vivo 試験 35
8.9 併用投与毒性試験 35
8.9.1 BMS-663513 及びIpilimumab のサル 1 ヵ月間間歇（qw）静脈内併用投与毒性試験 35
8.9.2 BMS-663513 及びIpilimumab のサル 4 ヵ月間間歇（2q4w）静脈内併用投与探索的薬理試験 36
8.9.3 MDX-1106 及びIpilimumab のサル 4 週間間歇（qw）静脈内併用投与毒性試験 36
8.10 異なる製造工程による原薬（製剤）の比較試験 37
8.10.1 MDX-010[redacted]（プロセス B）及びMDX-010[redacted]（プロセス A）のサル 3 ヵ月間（79 日間）間歇静脈内投与毒性・生物活性同等性試験 37
8.10.2 プロセス B 及びプロセス C のサルにおける単回静脈内投与薬物動態比較試験 38
8.11 新添加物の安全性評価 39
8.11.1 [redacted] mol/L 水酸化ナトリウム溶液の安全性評価 40
8.11.2 [redacted] mol/L 塩酸溶液の安全性評価 40
8.11.3 ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の安全性評価 40
8.11.3.1 単回投与毒性試験 41
8.11.3.2 反復投与毒性試験 41
8.11.3.3 遺伝毒性試験 42
8.11.3.4 生殖発生毒性試験 43
8.11.3.5 DTPA に含有される金属不純物についての安全性評価 45
8.11.3.6 DTPA の安全性評価に関する考察及び結論 46
9 考察 47
10 参考文献 54

表一覧

表 1-1: 非臨床毒性試験一覧 7
表 3.1-1: サル及びヒトにおける Ipilimumab の曝露量比較 12
表 6.1-1: 妊娠サルにおけるトキシコキネティクス値 23
表 6.1-2: 出生児及び母動物の平均血清中 Ipilimumab 濃度及び比 24
表 6.1-3: 妊娠中の胎児死亡 25
表 8.8.1-1: 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：Ipilimumab 及び BMS-663513 の単剤又は併用若しくは 5.11A1 がヒト PBMC の増殖に及ぼす影響 33
表 8.8.1-2: Ipilimumab 及び BMS-663513 の単剤又は併用若しくは 5.11A1 がヒト PBMC のサイトカイン放出に及ぼす影響 34
表 8.10.1-1: サルにおけるプロセス A 及び B の薬物動態学的パラメータ 38
表 8.10.2-1: サルにおけるプロセス B 及び C の薬物動態学的パラメータ 39
表 8.11-1: 重要な Ipilimumab の反復毒性試験及び ePPND 試験に用いたバイアル中の新添加物含量 39
表 8.11.3-1: DTPA の評価に用いた毒性試験一覧 40
表 8.11.3.3-1: Ca-DTPA のヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験成績 43
表 9-1: サル及びヒトにおける Ipilimumab の曝露量比較 48

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。

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評価した。予定されている臨床の用法は、Ipilimumab 3 mg/kg を 3 週ごとに 90 分かけて合計 4 回実施する静脈内投与である。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、薬理作用はサ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。実施した毒性試験の一覧を表 1-1 に示す。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。

表 1-1: 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 ヵ月間投与	静脈内	カニクイザル
6 ヵ月間投与	静脈内	カニクイザル
併用投与毒性試験		
1 ヵ月間投与［± BMS-663513（抗 CD137 抗体）］	静脈内	カニクイザル
1 ヵ月間投与［± 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
In vitro 増殖活性及びサイトカイン放出試験	*In vitro*	ヒト細胞
製剤同等性試験		
単回投与	静脈内	カニクイザル
3 ヵ月間（79 日間）投与	静脈内	カニクイザル
組織結合性試験	*In vitro*	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 ヵ月間投与（ワクチン併用）	静脈内	カニクイザル
3 ヵ月間投与（ワクチン併用）	静脈内	カニクイザル
4 ヵ月間投与（BMS-663513 併用）	静脈内	カニクイザル

重要なサルの反復静脈内投与毒性試験では､様々な臨床試験計画に対応する投与スケジュールとして、2 週間間歇静脈内投与毒性試験では 3 日に 1 回の計 3 回（q3d×3）投与、1 ヵ月間間歇静脈内併用投与毒性試験［Ipilimumab 単剤又は BMS-663513（抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）との併用］では週 1 回の計 4 回（qw×4）投与、3 ヵ月間間歇投与製剤同等性試験では月 1 回の計 3 回（q28d×3）投与、6 ヵ月間間歇静脈内投与毒性試験ではおおよそ月 1 回の計 5 回投与を設定した。重要な試験に先行して、2 週間の探索的間歇静脈内投与毒性試験と 3 ヵ月間の探索的間歇静脈内投与毒性・生物活性試験を実施した。Ipilimumab の生物活性を評価する試験では、B 型肝炎ワクチンと併用投与した。更に、Ipilimumab 及び数種のワクチン製剤を併用した場合の有効性について検討したサルを用いた 2 つの探索的薬理試験（2 ヵ月間投与及び 4 ヵ月間投与試験）において、Ipilimumab 投与に関連すると考えられる毒性変化が認められたため、これらの試験についても毒性試験の概要に記載した。

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 q3d×3 投与（Cmax : 682 μg/mL）、10 mg/kg（体重換算臨床投与量の約 3 倍）の qw×4 投与［AUC (0-168h) : 31600 μg·h/mL、AUC (0-63 日) : 90600 μg·h/mL］、1 mg/kg の qw×10 投与及び最高用量 10 mg/kg のおおよそ月 1 回 6 ヵ月間投与で有害な影響はみられず、Ipilimumab への忍容性が認められた。6 ヵ月間間歇静脈内投与毒性試験では、雌雄各 5 匹に 10 mg/kg の Ipilimumab を静脈内投与した（投与日 : Day 0、28、56、84 及び 140）。投与開始日及び最終投与日の投与後 24 時間までの Cmax はそれぞれ 184 μg/mL 及び 261 μg/mL であり､トラフ値（投与開始日及び最終投与日の投与後 27～28 日の血漿中濃度）の平均はそれぞれ 32 μg/mL 及び 52 μg/mL であった。投与に関連した所見としては､器官重量測定において甲状腺重量の減少（対照群と比べて−44%～−21%）及び精巣重量の減少（−49%～−27%）が認められたのみであった。これらの所見は関連する病理組織学的変化を伴わず、本試験における無毒性量（NOAEL）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。しかし、探索的に実施した薬理試験において、安楽死に至る重篤な大腸炎が 2 回目の投与（10 mg/kg の Ipilimumab 及び 3 種のワクチンをおおよそ月に 1 回併用投与）後に 6 例中 1 例に認められた。大腸における炎症反応（粘膜の化膿性炎症、陰窩の膿瘍及び粘膜のびらん）は、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｡Ipilimumab は腸管系リンパ組織（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。

他の薬理試験（サル 4 ヵ月間静脈内投与探索的薬理試験）において、10 mg/kg の Ipilimumab をおおよそ月に 2 回（投与日 : Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88）、免疫調節抗体薬（BMS-663513、抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）及びサル免疫不全ウイルス（SIV）のデオキシリボ核酸（DNA）ワクチンと併用投与した 1 例で、鼠径部の皮膚炎、発疹及び末梢リンパ節周囲の腫脹が 3 ヵ月間投与終了の 4 週間後に認められた。所見を認めた皮膚のバイオプシー検査の結果、真皮層下部へのリンパ球（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・細胞増殖が認められた。発疹は約 2 ヵ月間のうちに回復した。発疹の症状は、Ipilimumab 及び BMS-663513 の双方で臨床的に報告されていることから、これらの薬剤の投与に関連していると考えられた。非臨床試験において大腸炎及び皮膚の発疹・発赤は頻発せず（発現頻度は 10 mg/kg の Ipilimumab をおおよそ月に 1 回投与したサルにおいて約 6%､すべての反復投与試験を通して約 3%）、

Ipilimumab 単剤を 10 mg/kg の用量で投与した最長 6 ヵ月間の重要な反復投与毒性試験においては発現しなかった。

また、同試験の他のサルにおいてDay 58 に、ケタミンによる沈静下でIpilimumabの投与約 5 分後（試験抗原の投与から約 2～3 分後）にチアノーゼ、糸様脈及び心音の減弱を伴うinfusion reactionがみられ、約 45 分後に容体は安定した（投与速度不明）。その約 5 ヵ月後、本例にIpilimumabを 3 mL/min の速度で投与したが同様の反応は誘発されず、本反応とIpilimumab投与との関連性は不明であった。しかし、類似した反応が免疫グロブリンの急速静注による急性のサイトカイン放出によって誘発され、投与速度を緩徐にすることにより速やかに改善されることが報告されている[1]。したがって、Ipilimumab投与により本例に認められた反応は、免疫グロブリンの急速静注による非特異的反応である可能性が考えられた。更に、急性反応は麻酔下の血圧低下状態で認められたため、より複雑な機序で発現した可能性も考えられた[2,3,4,5]。Infusion reactionは、無麻酔下で速度を制御して投与したサルにおけるIpilimumabの毒性試験及び薬理試験（合計 88 例）では認められなかった。また、infusion reactionを認めたサルでは反応発現の前に高濃度の抗Ipilimumab抗体［抗薬物抗体（ADA）］を検出しており、Ipilimumabの急速静注時にはADA複合体が形成されていた可能性があった。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[6,7]。したがって、この動物で認められた反応の原因は明らかではないが、この反応はIpilimumabの直接的な影響又は標的受容体（CTLA-4）への結合による影響によるものではないと考えられた。

Ipilimumab 及び MDX-1106（免疫調節薬：抗ヒト PD-1 完全ヒト型モノクローナル抗体）のサル 1 ヵ月間間歇（週 1 回計 4 回投与）併用投与試験では、それぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で免疫に関連した有害事象（irAE）の発現頻度が増加し、それらは本試験に先立ち実施した単剤の毒性試験において類似の用量で認められた所見と同様であった。これらの所見は概してそれぞれの薬物の薬理作用と関連性のある変化で、一般症状として下痢、摂餌量減少及び体重減少を伴う大腸の炎症を主症状とし、病理組織学的所見として脾臓における濾胞の増加、辺縁帯の拡張及び脾臓・リンパ節における胚中心数の減少を認めた。更に、MDX-1106 と併用したときの Ipilimumab の免疫原性の発現頻度は、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よりも高かった（32%）。

Ipilimumab の単剤又は抗原ワクチン、DNA ワクチン若しくは BMS-663513 と併用して静脈内投与したサルにおいて Ipilimumab に顕著な免疫原性はみられず、ADA 陽性反応を示した動物は約 8%であった。これらの動物のうち数例では、ADA が Ipilimumab の血清中又は血漿中からの消失亢進に関連していた。投与部位の刺激性変化は、臨床推奨投与濃度及び速度を超えるか又は同等の条件で実施したサルにおける反復静脈内投与のいずれの用量でも認められなかった。

[redacted]の原薬［プロセス B、AUC (0-672h):49600～51600 µg·h/mL］と[redacted]の原薬［プロセス A、AUC (0-672h)：44900～45300 µg·h/mL］は、薬物動態、活性（特異的 T 細胞活性化）、免疫原性及び安全性プロファイルにおいて同等であった。また、プロセス B の[redacted]を用い、[redacted]を変更して製造した原薬［プロセス C、AUC (0-1008h) : 46700 µg·h/mL］の薬物動態、及び免疫原性プロファイルも、プロセス B の Ipilimumab［AUC (0-1008h)：52100 µg·h/mL］と同等であることがサルの探索的試験において示された。更に、[redacted]及び[redacted]をより確実に除去するため、プロセス C の[redacted]のひとつを変更してプロセス C.1 とした。生物学的特性の分析結果から、プロセス C.1 とプ

ロセス C における Ipilimumab の生物活性の同等性が示されたため【モジュール 2.3.S.2.6.2.3.1】、プロセス C とプロセス C.1 を比較する試験は実施しなかった。

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）より、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ため必要とされない。また、がん原性試験ガイドライン（ICH S1A）より、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。更に、がん原性試験に一般的に用いられる動物種はげっ歯類であるが、Ipilimumab はこれらの動物の CTLA-4 に交差反応性がなく、毒性試験に用いる動物種としては適切でないと考えられた。したがって、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。

Ipilimumabの組織結合性は、2 つの試験にわたりヒト組織パネル（36 組織）で蛍光又はビオチン結合で標識したIpilimumabを用いて評価した。ビオチン標識Ipilimumabは、カニクイザル組織パネル（23 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適用した。標識したIpilimumabは、組織結合交差性試験において複数の正常ヒト組織又はカニクイザル組織若しくはその両方の組織（扁桃腺、消化管、リンパ系組織、肺、腎臓、肝臓、皮膚及び末梢血）においてCTLA-4 を発現したリンパ球に特異的に結合した。更に、ビオチン標識Ipilimumab（1 及び 10 µg/mL）はヒト及びカニクイザルの胎盤の結合組織及びカニクイザルの卵巣の結合組織に特異的に結合し、ヒトの卵巣の結合組織には特異的に結合しなかった。Ipilimumabはカニクイザル及びヒトのその他の組織及びマウス、ラット及びウサギのリンパ系組織（ウサギのリンパ節、脾臓及び扁桃腺、マウス及びラットのリンパ節及び脾臓）には特異的な結合を示さなかった。これらの結果は、Ipilimumabがカニクイザル及びヒトのCTLA-4 に種特異的に結合することを示していた。これまでにCTLA-4 蛋白が胎盤の線維芽細胞に発現していることは報告されているが [8,9]、その機能については明らかでなく、細胞内部に発現しているのかIpilimumabが作用を及ぼすと推定される細胞表面に発現しているのかについても明らかでない。更に、Ipilimumabはカニクイザルの卵巣の結合組織に特異的に結合することが示されたが、サルを用いて実施した毒性試験の剖検及び病理組織学的検査において卵巣に所見は認められていない。卵巣組織への同様な結合はヒトでは認められていないことからも、サルの卵巣結合組織へのIpilimumabの特異的な結合には生物学的及び毒性学的意義はないと推察された。Ipilimumabがヒト及びカニクイザルのその他の組織と特異的結合を示さなかったことは、CTLA-4 が主として活性化したリンパ球上に一過性に発現しているという報告と一致していた [10]。

細胞増殖及びサイトカイン放出に関する *in vitro* 探索的試験では、Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab を BMS-663513 若しくは MDX-1106 と併用した場合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誘導作用を可溶化・安定化した抗体のアッセイ系で評価した。Ipilimumab はヒト PBMC において軽微な増殖誘導［平均最大刺激指数（SI）：12］及びサイトカイン放出の誘導［インターロイキン（IL）-2、腫瘍壊死因子（TNF）-α、IL-6 及び IL-8；平均最大 SI：2～6］を安定化抗体アッセイ系で示した。これと比較し、陽性対照として実施した抗 CD28 抗体を用いたアッセイでは、顕著な増殖誘導（平均最大 SI：139）及び強いサイトカイン放出の誘導［インターフェロン（IFN）-δ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 及び IL-8；平均最大 SI：4～124］を示した。可溶化アッセイ系における評価では、Ipilimumabはヒト PBMC からのサイトカイン放出に影響を及ぼさず、BMS-663513 及び MDX-1106 との併用により、可溶化及び安定化アッセイ系のいずれの評価においても相加・相乗作用を示さなかっ

た。これらの結果は、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臨床の結果と一致していた。

Ipilimumab の生殖発生毒性について、カニクイザルの ePPND 試験により検討した。本試験では、妊娠カニクイザルに Ipilimumab を 10 mg/kg 及び 30 mg/kg の用量［3 mg/kg を 21 日間隔で投与したヒト曝露量（AUC）のそれぞれ 3.2 倍及び 7.3 倍に相当］で妊娠 20～22 日（超音波検査による妊娠確定日を基にして算出）から分娩まで、21 日間隔（q3w）で静脈内投与した。妊娠サルを自然分娩させ、母動物及び出生児の評価を分娩後及び出生後約 6 ヵ月間実施した後に出生児を剖検した。

出生児の血清中 Ipilimumab 濃度は出生後 3 ヵ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）。妊娠初期及び中期（妊娠第 1 三半期及び妊娠第 2 三半期）においては、投与に関連した有害な影響はみられなかった。また、妊娠第 1 三半期及び第 2 三半期の妊娠転帰に、対照群と Ipilimumab 投与群との間で差はなかった。妊娠後期（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、出生時死亡率の用量に依存した増加［妊娠 100 日以降、対照群（0%）及び施設背景値（17.6%）に対して 10 mg/kg 群で 21%、30 mg/kg 群で 30%］が認められた。平均妊娠期間の軽度な短縮が 30 mg/kg 群（平均 151 日間）において対照群（平均 160 日間）及び 10 mg/kg 群（平均 156 日間）と比較して認められた。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。30 mg/kg 群の出生児では出生児平均体重の低値（対照群平均値と比較して−15%）がみられたが、これらの動物では体重増加率の上昇が生後 3 ヵ月までみられ、生後 6 ヵ月で 30 mg/kg 群の出生児平均体重は対照群と同等となった。出生後 6 週及び 18 週に実施した出生児の B 型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）に対する T 細胞依存性抗体反応（TDAR）検査では、Ipilimumab への曝露による有害な影響は認められなかった。また、生後 6 ヵ月まで実施した出生児の一般状態観察、形態測定、神経行動学的検査、骨格検査、臨床病理検査、リンパ球フェノタイピング、抗核抗体（ANA）検査及び血清中免疫グロブリン測定では、Ipilimumab の子宮内曝露による有害な影響はみられなかった。

サルを用いた最長 6 ヵ月間の反復投与毒性試験の一部として実施した心血管系、呼吸系及び中枢神経系の安全性薬理評価において、Ipilimumab 投与に関連した所見は認められなかった。合計 100 例以上のカニクイザルを用い、Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab を種々の抗原、DNA ワクチン若しくは抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体（BMS-663513）と併用投与した非臨床試験において、薬理試験の 1 例を Ipilimumab 10 mg/kg q4w 投与の 2 回目の投与後に発現した大腸の炎症により安楽死させた。また、4 ヵ月間の薬理試験において Ipilimumab の 10 mg/kg を他の免疫調節抗体薬及び SIV DNA ワクチンとおおよそ月に 1 回の頻度で併用投与したカニクイザルに 3 ヵ月間投与終了の 4 週後に皮膚炎及び発疹が認められた。これらの所見を示した例にはワクチン抗原も投与していたが、認められた所見は Ipilimumab の薬理作用に関連した免疫に関する影響と考えられた。急速静注により 1 例に認められた infusion reaction と薬剤の投与との関連は不明ではあるが、蛋白質の静脈内投与により影響が発現することが広く知られていることから、Ipilimumab も infusion reaction を引き起こす可能性が示唆された。カニクイザルの反復投与毒性試験（30 mg/kg q3d×3、10 mg/kg qw×4、1 mg/kg qw×10、10 mg/kg q4w×5）では、概して有害な毒性作用はみられなかった。更に、ADA 陽性反応の発現頻度は約 8%で、サルにおいて Ipilimumab の免疫原性は顕著にみられなかった。なお、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。

また、Ipilimumab 製剤に含有される [redacted]mol/L 水酸化ナトリウム（NaOH）溶液、[redacted]mol/L 塩酸（HCl）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規格に適合しないためその毒性を評価した結果、本製剤の用法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た。

これらの非臨床毒性試験の結果は、臨床における進行期悪性黒色腫患者を対象とした Ipilimumab の静脈内投与療法の安全性を担保するものである。

2 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ず、概略の致死量は 30 mg/kg を超える量と考えられた【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6 及び表 2.6.7.7A～E】。更に、サルにプロセス B 又はプロセス C の Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で単回投与した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（8.10.2 項参照）。

3 反復投与毒性試験

すべての Ipilimumab の反復投与毒性試験はカニクイザルを用いて実施し、投与経路は静脈内投与とした。反復静脈内投与毒性試験は、探索的試験として 2 週間間歇投与毒性試験、2 ヵ月間間歇投与薬理・毒性試験（B 型肝炎ワクチンと併用）、3 ヵ月間間歇投与薬理・毒性試験（月に 1 回投与）及び 4 ヵ月間間歇投与併用薬理・毒性試験（BMS-663513 と併用、各月初週に 2 回投与）を実施し、重要な試験として 2 週間間歇投与毒性試験、1 ヵ月間間歇投与併用毒性試験（Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab 及び BMS-663513 を週に 1 回の計 4 回投与）、3 ヵ月間（79 日間）間歇投与毒性・生物活性同等性試験（月に 1 回投与）及び 6 ヵ月間間歇投与毒性試験（月に 1 回の計 5 回投与）を実施した【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6 及び表 2.6.7.7A～E】。Ipilimumab はげっ歯類の CTLA-4 に交差反応性を有しないことから、げっ歯類を用いた試験は実施しなかった。

3.1 サル反復毒性試験

Ipilimumab の全身曝露量は概して用量比を上回って増加し、投与間隔（約 3～28 日間）の割に長い半減期（最大約 13 ± 4 日間）のため蓄積する傾向を示した。プロセス A（[redacted]）及びプロセス B（[redacted]）で製造した Ipilimumab の薬物動態は同等であった。サル 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）10 mg/kg 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 回の 90 分間静脈内投与を計 4 回）におけるヒト曝露量と比較した（表 3.1-1）。

表 3.1-1: 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（週 1 回× 4 週間）[e]	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、最終投与後の雌雄合計平均値（T は AUC 算出の期間）。

[b] ヒトの 3 週間曝露に換算。

[c] 予定臨床用量 3 mg/kg（3 週間に 1 回）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 と他の免疫調節薬を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

3.1.1 重要な試験

3.1.1.1 サル 2 週間間歇（q3d×3）静脈内投与毒性試験

（4.2.3.2-2 試験番号[redacted]-0919-128、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7A】及び 4.2.3.2-3 試験番号 7114-100、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7B】）

2 週間間歇投与毒性試験を 2 試験実施した。カニクイザルに Ipilimumab を 3 mg/kg/day（各試験雄 2 匹）及び 10 mg/kg（試験番号[redacted]-0919-128、雌雄各 2 匹）又は 30 mg/kg（試験番号 7114-100、雌雄各 2 匹）の用量で Day 1、4 及び 7 に静脈内投与した。それぞれの試験では血清中薬物濃度測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、理学的検査（神経学的検査、呼吸系検査及び眼科学的検査）、末梢血リンパ球フェノタイピング（B 細胞、T 細胞及び活性化 T 細胞サブセット）、免疫原性検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。いずれの試験でも溶媒対照群を設定せず、各検査値は投与前値と比較した。Day 14 に全例を剖検した。

Ipilimumab の投与に関連した一般症状及び病理学的所見は認められず、リンパ球サブセットに実質的な変化は最高用量 30 mg/kg［Day 4、7 及び 14 における血清中濃度（Day 4 及び 7 は投与前）：370、682 及び 526 µg/mL］まで認められなかった。30 mg/kg では、投与前と比較して白血球数の軽微な増加（約 2 倍、主にリンパ球、好中球、好塩基球及び単球数の増加による）、総蛋白質の増加（完全ヒト型免疫グロブリンである Ipilimumab を直接静脈内に投与したことに由来するグロブリンの増加による）、赤血球数の減少（10%）、ヘモグロビンの減少（10%）及びヘマトクリット値の減少（5%）が認められた。その他、30 mg/kg では CD3+リンパ球の割合が軽微に上昇し、それに伴い CD20+リンパ球の割合が低下したが、投与群間及び投与前後で個体差が大きく、本試験以降に実施した長期試験では観察されなかったことから生物学的意義はないと考えられた。免疫原性評価（12 匹）では、ADA

陽性例が 3 mg/kg 群の雄 1 例（投与前値の 16 倍）及び 30 mg/kg 群の雌 1 例（投与前値の 64 倍）に認められた。

以上より、カニクイザルに Ipilimumab を最高用量 30 mg/kg で Day 1、4 及び 7 に投与した結果、忍容性は良好であり、無毒性量は 30 mg/kg と推定された。

3.1.1.2 サル 1 ヵ月間間歇（qw×4）静脈内併用投与（± BMS-663513）毒性試験

（4.2.3.2-4 試験番号 DS06064、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7C】）

カニクイザル（1 群雌雄各 5 匹）に Ipilimumab を単剤（10 mg/kg/日）又は BMS-663513（抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）（100 mg/kg/日）と併用して 1 ヵ月間間歇静脈内投与（週 1 回計 4 回）した。投与終了後 9 週間の休薬期間を設け、Ipilimumab の遅延毒性、トキシコキネティクス及び免疫原性を評価した。対照群には BMS-663513 の溶媒［プルロニック F68（ポロクサマー188）の 2 mg/mL 注射用生理食塩水溶液を含有する 5 mM コハク酸ナトリウム緩衝液（pH 5）］及び Ipilimumab の溶媒（注射用生理食塩水）を連続して投与した。併用投与群及び対照群では、投与を 2 回に分けて実施した。BMS-663513 及びその溶媒の投与容量は 9.8 mL/kg、投与速度は約 0.1 mL/sec とした。Ipilimumab 及びその溶媒の投与は BMS-663513 の投与開始から 15 分以内に実施し、投与容量は 1.9 mL/kg として同様の速度で投与した。トキシコキネティクス測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、理学的検査（神経学的検査、呼吸系検査及び眼科学的検査）、心電図検査、末梢血リンパ球フェノタイピング、BMS-663513 及び Ipilimumab に対する免疫原性検査、キーホールリンペットヘモシアニン（以下、KLH）に対する TDAR 検査、ANA 検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。Day 24 に雌雄各 3 例を剖検した。残りの雌雄各 2 例は約 9 週間の休薬期間の後、雌は Day 91 に、雄は Day 92 に剖検した。

Day 22 における Ipilimumab（10 mg/kg）投与後の全身曝露量［AUC (0-48h)、AUC (0-168h)及び Cmax］は、それぞれ 11900 μg·h/mL、31600 μg·h/mL 及び 339 μg/mL であった（単剤及び併用投与の合計平均値）。Day 1 及び 22 の Ipilimumab 単剤及び併用投与群の全身曝露量に性差はみられなかった。いずれの投与群でも Day 22 の Cmax、AUC (0-48h)及び AUC (0-168h)は Day 1 より 54%～76%高く、蓄積が示唆された。最終投与後の平均半減期は 302 ± 90.3 時間（12.6 ± 3.76 日）、平均滞留時間は 432 ± 72.0 時間であった。併用投与群 10 例中 1 例のみに一過性の弱い ADA 抗体価を検出したが（Day 15 のみ）、本例の全身曝露量に影響はみられなかった。Ipilimumab 単剤投与群（10 mg/kg）10 例では、ADA は検出されなかった。

試験期間中死亡例は認められなかった。投与に関連した一般症状はみられず、摂餌量、体重、ANA 量、末梢血リンパ球フェノタイピング、心電図、眼科学的検査、理学的検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査のいずれにも投与に関連した所見は認められなかった。

試験中に認められた免疫学的な影響は、Ipilimumab の T 細胞増強活性によるものと考えられた。Day 10（2 回目の投与 2 日後）の KLH 投与により、Day 23 に統計学的に有意（$P < 0.05$）な KLH 特異的 TDAR（IgG、IgM 又は IgA）が Ipilimumab 単剤投与群の雌雄に認められ（対照群と比べて 3.9～4.7 倍）、併用投与群ではより強く認められた（6.3～7.0 倍）。Ipilimumab 単剤投与群と併用投与群との間に統計学的な差はみられなかった。したがって、KLH 特異的 TDAR の亢進は主として Ipilimumab

の投与に起因した変化と考えられた。投与に関連した ANA の増加は認められず、本試験においてIpilimumab は広範囲にわたる非特異的免疫増強効果や自己免疫作用を示さなかった。

以上より、本試験において週に 1 回の計 4 回投与した Ipilimumab の無毒性量は、Ipilimumab 単剤及びBMS-663513 との併用投与でいずれも 10 mg/kg［AUC (0-168h) : 31600 μg·h/mL］と推定された。本用量における AUC は、投与間隔を 3 週間に換算してヒト曝露量の約 6.1 倍に相当した。ADA は併用投与群の 10 例中 1 例のみに一過性に認められ、Ipilimumab 単剤投与群には認められなかった。Ipilimumab による KLH 特異的 TDAR の亢進は、その薬理作用（T 細胞増強）によるものと考えられた。

3.1.1.3 サル 3 ヵ月間（79 日間）間歇静脈内投与毒性・生物活性同等性試験

［MDX-010-[redacted]（プロセス B）及び MDX-010-[redacted]（プロセス A）］
（4.2.3.2-7 試験番号[redacted]-1416-128、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7D】）

カニクイザル（1 群雌雄各 3 匹）に[redacted] Ipilimumab（プロセス B）又は[redacted] Ipilimumab（プロセス A）を 79 日間間歇静脈内投与し、各原薬の毒性に加え薬物動態、免疫原性及び生物活性（抗原特異的 T 細胞活性化）の同等性を確認した。プロセス B を 0.1、1 及び 10 mg/kg の用量で Day 1、29 及び 57（q4w×3）に、1 mg/kg の用量で週に 1 回 10 週間（qw×10）投与し、また、プロセス A を 10 mg/kg の用量で Day 1、29 及び 57（q4w×3）に投与した。全例について、Day 1、29 及び 57 にワクチン抗原の SK-mel 細胞［顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、GM-CSF）放出ヒト悪性黒色腫培養がん細胞］を 5×10^6 cell の細胞数（0.5 mL）で皮下投与し、同時に HBsAg の 10 μg（0.5 mL）を筋肉内投与した。ワクチン対照群（雌雄各 3 匹）には、生理食塩水 2 mL/kg 及び 2 種のワクチン抗原を同様に投与した。遅延型過敏反応（以下、DTH）を評価するため、全例にワクチン抗原［HBsAg（2 μg）及び SK-mel 細胞（1×10^6 cell）］又は生理食塩水を Day 41 又は 44 及び Day 71 にそれぞれ 0.1 mL 皮内投与した。血漿中薬物濃度測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、投与部位（皮膚）の炎症検査、皮膚 DTH 検査、理学的検査、ワクチン抗原に対する TDAR 検査、末梢血リンパ球フェノタイピング（活性化 T 細胞サブセット）、HBsAg 又はポリクローナルスーパー抗原（*Staphylococcus* エンテロトキシン B）に反応してサル末梢血 CD8+T 細胞が *in vitro* で産生することが知られているサイトカイン（TNF-α 及び IFN-γ）の細胞内染色、免疫原性検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。Day 79 に全例を剖検した。

プロセス B 及びプロセス A の薬物動態、免疫原性、生物活性（T 細胞活性化及び TDAR）及び毒性プロファイルは概して同等であった。曝露量（Cmax 及び AUC）は 1～10 mg/kg の間で投与量比を上回って増加した。十分な採血ポイントを設定しなかったこと及び測定値が定量下限値（LLOQ : 1.0 μg/mL）未満であったことから、0.1 mg/kg 群では曝露量を算出できなかった。10 mg/kg の初回投与後のプロセス A 及びプロセス B の平均 Cmax はそれぞれ 420～459 μg/mL 及び 503～560 μg/mL であり、全身曝露量［AUC (0-672h)又は最終測定時点までの AUC］はそれぞれ 44900～45300 μg·h/mL 及び 49600～51600 μg·h/mL であった。両プロセスのデータを合計して算出した半減期は 203 時間（8.5 日）、平均滞留時間は 233 時間、分布容積は 44.1 mL/kg、総クリアランスは 0.196 mL/h/kg であった。プロセス A の 10 mg/kg を投与した 1 例が免疫原性反応（ADA の抗体価増加）を Day 71 に示し（投与前値の 256 倍）、プロセス B の 1 mg/kg を週 1 回投与した 2 例が ADA の抗体価 16 倍を示した。

投与に関連した一般症状はみられず、理学的検査及び眼科学的検査所見、臨床病理学的検査及び活性化 T 細胞の CD69、CD25 及び HLA-DR 発現割合の変化、器官重量、剖検並びに病理組織学的検査所見は認められなかった。Day 41 又は 44 及び 71 における HBsAg 又は SK-mel ワクチンに対する DTH には個体差が大きかったが、HBsAg に対する DTH 評点（硬結直径×紅斑評点）のわずかな増加がみられ、対照群（平均 DTH 評点 3～4）と比較してプロセス A 又は B の 10 mg/kg q4w×3 投与群及びプロセス B の 1 mg/kg qw 投与群のいずれも平均 DTH 評点は 6～10 であった。10 mg/kg では、プロセス A 及びプロセス B のいずれでも最大 TDAR の亢進が同程度にみられ、Day 79 において HBsAg に対しては対照群の 2.3～4.5 倍、SK-mel ワクチンに対しては 2.1～3.6 倍であった。HBsAg に対する最大 TDAR の亢進は 1 mg/kg でも認められ、q4w 投与で 2.1 倍、q1w 投与で 5.6 倍の亢進を示した。活性化 CD69+T 細胞による抗原特異的サイトカイン（TNF-α 又は IFN-γ）産生では、用量及び投与スケジュールに依存した軽微な増加を示した個体が 1 mg/kg q1w 投与群及び 10 mg/kg q4w 投与群で Day 43 及び 79 に認められた。

以上より、プロセス B の 0.1、1 及び 10 mg/kg q4w×3 投与及び 1 mg/kg qw×10 投与並びにプロセス A の 10 mg/kg q4w×3 投与のいずれにおいても毒性学的意義のある変化は認められなかった。無毒性量は両プロセス共に 10 mg/kg［AUC (0-672h) : 44900～45300 μg·h/mL（プロセス A）及び AUC (0-672h) : 49600～51600 μg·h/mL（プロセス B）］と推定された。臨床試験とほぼ同等の曝露量において、[redacted]（プロセス B）及び[redacted]（プロセス A）の Ipilimumab の薬物動態、免疫原性、生物活性（T 細胞活性化及び TDAR）及び毒性プロファイルは同等であった。

3.1.1.4 サル 6 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与毒性試験

（4.2.3.2-8 試験番号 01-3460、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7E】）

カニクイザルに Ipilimumab を単剤又は SK-mel ワクチンとの併用でおおよそ月 1 回（q4w）投与し、Ipilimumab の毒性及び生物活性を評価した。Ipilimumab は静脈内投与し、ワクチンは皮下投与した。Ipilimumab 単剤投与群（雌雄各 2 匹）には 10 mg/kg の用量で Day 0、28、56、84 及び 140 に投与し、併用投与群（雌雄各 3 匹）には Ipilimumab の 10 mg/kg を SK-mel ワクチン（5×10^6 cell/dose）と併用して同様の投与スケジュールで投与した。また、対照群（雌雄各 2 匹）には生理食塩水 1.27～2 mL/kg を、ワクチン対照群（雌雄各 3 匹）には SK-mel ワクチン（5×10^6 cell/dose、投与量：0.5 mL）のみを同条件でそれぞれ投与した。血漿中薬物濃度測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、投与部位（皮膚）の炎症検査、DTH 検査、理学的検査、末梢血リンパ球フェノタイピング（活性化 T 細胞サブセット）、免疫原性検査、SK-mel ワクチンに対する TDAR 検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。Day 167 及び 168 に全例を剖検した。

Ipilimumab を単剤又はワクチンとの併用で投与したサルにおける初回及び最終投与後約 24 時間の平均最大血漿中薬物濃度はそれぞれ 184 μg/mL 及び 261 μg/mL、平均トラフ値（初回及び最終投与後 27～28 日）はそれぞれ 32 μg/mL 及び 52 μg/mL であった。Ipilimumab を投与された全 10 例のサルにおいて、ADA は Day 112 及び 141 のいずれでも検出されなかったが、本試験のような高薬物濃度下では Ipilimumab 特異的抗体の測定が干渉を受ける可能性も否定できなかった。しかし、ADA の産生を示唆するような曝露量の減少は認められなかった。

投与に関連した一般症状はみられず、体重及び摂餌量への影響並びに理学的検査、臨床病理学的検査、剖検及び病理組織学的検査の所見は認められなかった。10 mg/kg で認められた投与に関連する所見は甲状腺重量の減少（−44%～−21%）及び精巣重量の減少（−49%～−27%）のみであったが、これらは関連する病理組織学的変化を伴わなかった。更に、4 回目及び 5 回目の SK-mel ワクチン皮下投与部位の炎症（軽微な紅斑と浮腫）が Ipilimumab 及び SK-mel ワクチン併用投与群の雄 1 例で認められた。

SK-mel ワクチンを単剤又は Ipilimumab と併用投与したサルについて、3 種の抗原（SK-mel ワクチン、樹状細胞、SK-mel ワクチンで抗原提示した樹状細胞）に対する DTH 反応を Week16 及び 17 に評価した。DTH 陽性反応（ごく軽微～軽微、高さ及び直径のいずれかが 2 mm 以上）が両群（± Ipilimumab）の各 6 例中 4 例のワクチン投与部位に認められ、Ipilimumab を投与した 6 例中 2 例にごく軽微な浮腫又は紅斑が SK-mel ワクチンで抗原提示した樹状細胞又は樹状細胞に対する反応としてそれぞれ認められた。DTH 反応の直径は Ipilimumab 投与群で概して大きかった。

投与に関連した末梢血リンパ球サブセット｛CD3+［T 細胞］、CD3/CD4+［ヘルパーT 細胞］、CD3/CD8+［細胞傷害性 T 細胞］、CD3/CD25+［活性化 T 細胞サブセット］、CD3/CD69+［活性化 T 細胞サブセット］又は CD3/HLA-DR+［主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス II 発現 T 細胞-DR アイソタイプ］細胞｝への影響は認められず、全般的な T 細胞の活性化又は減少を示唆する所見はみられなかった。

SK-mel ワクチンに対する TDAR への Ipilimumab の亢進作用を 2 種の方法［フローサイトメトリーを用いた SK-mel 細胞への抗体結合検査及び酵素免疫測定法（ELISA 法）による SK-mel 細胞溶解物への抗体結合検査］で評価した。SK-mel ワクチンに対する抗体反応は、SK-mel ワクチン単独投与群の 6 例中 1 例に対して Ipilimumab 投与群では 6 例中 5 例に強い反応が認められた。Ipilimumab 投与群の平均抗 SK-mel 抗体量は対照群を大幅に上回り（ELISA 測定でワクチン対照群の 1.2～3.3 倍）、平均抗体結合量も増加した（フローサイトメトリーで 2.1～4.7 倍）。

以上より、サルに 10 mg/kg の Ipilimumab を 6 ヵ月間投与したときの無毒性量は 10 mg/kg（血漿中濃度：184～261 µg/mL）と推定された。抗原（SK-mel ワクチン）特異的 TDAR の亢進及び皮内投与した抗原に対する DTH 反応の増強は、本試験以前に実施したサル 2 ヵ月間間歇静脈内投与探索的毒性・生物活性試験（SBi-0992-128 試験）と同様に Ipilimumab の薬理作用を反映しており、非特異的な免疫細胞の活性化を示唆する変化はみられなかった。

3.1.2 探索的反復投与毒性試験（重要な試験以外の試験）

3.1.2.1 サル 2 週間間歇（q3d ×3）静脈内投与探索的毒性試験

（4.2.3.2-1 試験番号 126-002、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6】［参考資料］）

重要な2週間投与毒性試験の実施に先立ち、探索的試験を実施した。カニクイザル（雌2匹）にIpilimumabを 3 mg/kg の用量で Day 1、4 及び 7 に投与し、生死・一般状態観察、体重測定、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施し、Day 14 に全例を剖検した。本試験では陰性対照群を設定せず、各検査値は投与前の値と比較した。

実施したすべての検査において投与前と比較して影響は認められなかった。

3.1.2.2 サル 2 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与探索的毒性・生物活性試験

（4.2.3.2-5 試験番号[redacted]-0992-128、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6】［参考資料］）

本試験の目的は、Ipilimumab とワクチン又は免疫賦活物質を併用したときの相互作用を検討することであった。カニクイザル（1 群雌雄各 2 匹）に Ipilimumab10 mg/kg を Day 1 及び 29 に静脈内投与し、ワクチン抗原として HBsAg10 μg（0.5 mL）に免疫賦活物質 CpG オリゴ核酸（Oligo-CpG）500 μg を添加（陽性対照）又は非添加で Day 2 及び 30 に筋肉内投与した。更に、対照群 2 群（各群雌雄各 2 匹）には陰性対照抗体として respiratory syncytial virus（RSV）特異的ヒトアイソタイプ適合 IgG 抗体 10 mg/kg を Day 1 及び 29 に投与し、Oligo-CpG 添加又は非添加の HBsAg 10 μg（0.5 mL）を Day 2 及び 30 に筋肉内投与した。血漿中薬物濃度測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、理学的検査（全身状態検査）、免疫原性検査、HBsAg に対する TDAR 検査、末梢血リンパ球フェノタイピング（T 細胞及び活性化 T 細胞サブセット）、細胞内サイトカイン染色［HBsAg によりサル末梢血 T 細胞が *in vitro* で産生するサイトカイン：IL-2、TNF-α 及び IFN-γ］、臨床病理学的検査及び胃・大腸の剖検及び病理組織学的検査を実施した。Day 64 に全例を剖検した。

Ipilimumab 初回投与 14 日後及び 28 日後の平均血漿中薬物濃度は、それぞれ 97～110 μg/mL 及び 33～40 μg/mL であった。また、2 回目投与から 7 日後の平均血漿中薬物濃度は、138～169 μg/mL であった。Day 64 に Ipilimumab の免疫原性陽性を示したサルはみられなかった。

投与に関連した一般症状はみられず、理学的検査、臨床病理学的検査、末梢血リンパ球フェノタイピング、剖検及び病理組織学的検査に変化は認められなかった。初回 HBsAg 接種による抗体反応はすべての群で概して弱かったが、5 例（Ipilimumab 投与群 1 例、陰性対照抗体 + Oligo-CpG 投与群 2 例、Ipilimumab＋Oligo-CpG 投与群 2 例）では CpG を投与しなかった陰性対照群と比べて顕著な抗体反応（抗 HBsAg 抗体量：1000 mIU/mL 超）がみられた。Day 30 の追加抗原接種後、Ipilimumab 投与群の抗体反応は陰性対照群と比べて亢進（対照群の最大 2.8 倍）し、陰性対照抗体 + Oligo-CpG 投与群でも同様に増加した。Ipilimumab 投与群で Oligo-CpG の添加に関わらず抗 HBsAg 抗体反応が同様であったことから、Ipilimumab と Oligo-CpG の併用に相加・相乗効果はないと考えられた。

全血及び培養 T 細胞を HBsAg と一晩反応させ、抗原特異的 T 細胞活性化を評価した。検出された活性化 T 細胞の割合は低かったが、陽性反応（陽性対照物質 *Staphylococcus* エンテロトキシン B と同様の染色が 0.2%超）はすべての群で認められ、Ipilimumab あるいは Oligo-CpG を投与した群では陰性対照抗体のみを投与した群よりも高頻度に認められた。培養 T 細胞の実験で最も多く認められたサイトカインは、CD8−細胞による TNF-α 産生（Oligo-CpG 添加及び非添加の Ipilimumab 投与群 8 例中 6 例、陰性対照抗体 + Oligo-CpG 投与群 4 例中 2 例）であった。また、CD8+細胞による TNF-α 産生（Oligo-CpG 添加及び非添加の Ipilimumab 投与群 8 例中 2 例、陰性対照抗体 + Oligo-CpG 投与群 4 例中 3 例）及び CD8−及び CD8+細胞による IL-2 又は IFN-γ の産生（Oligo-CpG 添加及び非添加の Ipilimumab 投与群 8 例中 3 例及び陰性対照抗体 + Oligo-CpG 投与群 4 例中 1 例）も認められた。

以上より、Ipilimumab を 10 mg/kg の用量でワクチン抗原（HBsAg）又は免疫賦活物質（Oligo-CpG）を併用して月 1 回間歇投与したサルにおいて、毒性学的意義のある変化は認められなかった。Ipilimumab 投与による HBsAg に対する TDAR の亢進及び *ex vivo* における Oligo-CpG と同様の抗原特異的 T 細胞

活性化は Ipilimumab の薬理作用に関連する影響と考えられた。非特異的な免疫細胞の活性化を示唆する変化は認められなかった。

3.1.2.3 サル 3 ヵ月間間歇（q4w）静脈内投与探索的毒性・生物活性試験

（4.2.3.2-6 試験番号 SUV00006、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6】［参考資料］）

本試験の目的は、Ipilimumab と他のワクチンを併用したときの相互作用を検討することであった。1 群雌雄各 3 例のカニクイザルに Ipilimumab を 10 mg/kg の用量でおおよそ月 1 回、ワクチン抗原［SK-mel 細胞（GM-CSF 非放出型）、HBsAg 及び dinitrophenyl (DNP)-ficoll（T 細胞非依存的抗原）］と 3 ヵ月間併用投与し、Ipilimumab の毒性及び生物活性を評価した。試験の第 1 段階として、投与群では Day 1、29 及び 57 に Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で静脈内投与し、HBsAg を 10 µg（投与容量 0.5 mL）筋肉内に、全悪性黒色腫細胞ワクチン SK-mel を（5×10^6 cell、投与容量 0.5 mL）皮下投与した。更に、100 µg（投与容量 0.1 mL）の DNP-ficoll を Day 1 及び 29 に皮内投与した。ワクチン対照群には、2 mL/kg の生理食塩水及びワクチン抗原を同様に投与した。全例に各 0.1 mL のワクチン抗原［HBsAg（2 µg）及び SK-mel（1×10^6 cell）］又は生理食塩水を Day 42 に皮内投与し、投与 24 及び 48 時間後に皮膚の DTH 反応を評価した。試験の第 2 段階（再投与）では、第 1 段階の生存例に 10 mg/kg の Ipilimumab 又は生理食塩水（ワクチン対照群）を Day 140 に投与した。試験では、血漿中薬物濃度測定、生死及び一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、投与部位（皮膚）の炎症検査、DTH 検査、理学的検査、免疫原性検査、ワクチン抗原に対する TDAR 検査、末梢血リンパ球フェノタイピング、脾臓・鼠径リンパ節・腸管（大腸）上皮白血球分類検査［B 細胞、T 細胞、単球、樹状細胞（CD11c+）、活性化 T 細胞（CD4+CD25+、CD8+CD25+及び CD3+HLA+）、メモリーT 細胞（CD3+CD45RO+及び CD3+CD45RA−）、エフェクターメモリーT 細胞（CD4+CD28−CD95+又は CD8+CD28−CD95+）、セントラルメモリーT 細胞（CD4+CD28+CD95+又は CD8+CD28+CD95+）、ナイーブ T 細胞（CD4+CD28+CD95−又は CD8+CD28+CD95−）、Treg（CD4+CD25+及び CD4+CD25+CTLA-4+）］、末梢白血球及び脾細胞染色［CTLA-4 及び FoxP3（Treg 評価）］、TNF-α 及び IFN-γ の細胞内染色、臨床病理学的検査、剖検、器官重量測定並びに病理組織学的検査を実施した。Day 154 に全例を剖検した。

初回投与 24 時間後の平均血漿中 Ipilimumab 濃度は 239 µg/mL であった。2 及び 3 回目の投与 24 時間後の平均血漿中 Ipilimumab 濃度はそれぞれ 239 µg/mL 及び 232 µg/mL で、初回投与後と同程度の曝露量であった。いずれのサルからも Day 14、43 及び 71 に ADA は検出されなかった。

Ipilimumab を投与した 1 例を一般状態の悪化のため Day 42 に安楽死させた。本例では、Day 29 からみられた持続性の下痢、食欲不振、体重減少（Day 28〜35 の間で−12%以上、Day 42 に更に−10%）が認められ、死戦期の浅呼吸、中等度の脱水、低血圧、心拍数の低下（約 40 bpm）及び体温の低下［92ºF（33.3ºC）未満］がみられた。本例には治療のため、静脈内及び皮下への輸液投与を試みたが奏効しなかった。本例では臨床検査で軽度の赤血球数増加（投与前の 1.19 倍）、白血球数減少（0.56 倍）、高窒素血症、体液喪失の 2 次的影響と考えられる血中電解質の変動など［顕著なナトリウム減少（投与前の 0.81 倍）、塩素減少（0.78 倍）、カルシウム減少（0.7 倍）、AST 増加（3.2 倍）、LDH 増加（1.9 倍）、BUN 増加（5.9 倍）、無機リン増加（2.3 倍）、カリウム増加（1.2 倍）、コレステロール減少（0.57 倍）、GGT 減少（0.42 倍）、総蛋白質減少（0.61 倍）、グロブリン減少（0.8 倍）及びアルブミンの減少（0.43 倍）］がみられ、下痢、脱水及び一般状態の悪化が示唆された。剖検では、

大腸に緑色液状便の貯留、結腸に多巣性の粘膜黒色化が認められ、その 2 次的な影響と考えられる副腎の両側性の肥大及び暗褐色化、胸腺及び脾臓の小型化、肺の赤色化、投与部位の紅斑が認められた。病理組織学的検査では、急性～亜急性の炎症、陰窩の膿瘍及びびらんが結腸から直腸にわたって認められた。これらの所見は一般状態の悪化に関連した変化と考えられ、同様に 2 次的な影響と考えられる副腎、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 GALT のリンパ球数減少が認められた。これらは Ipilimumab の臨床試験で認められた所見と類似していたため、結腸の症状は投与に関連した変化と考えられたが、ワクチン抗原との関連性は不明であった。

対照群の 1 例を含むその他のサルにも断続的な水様便がみられ、皮下輸液及び Pepto-Bismol（胃腸薬）の投与を行った。その他の一般症状として、一過性の下腹部及び大腿部皮膚の発赤が生存例の雄 1 例で Day 44～98 に認められたが、毒性学的意義のない変化と考えられた。試験終了時の生存例に体重及び摂餌量、血液学的及び血液生化学的検査値、剖検及び病理組織学的検査所見の投与に関連した影響はみられなかった。

HBsAg 皮内投与部位における DTH 評点は、Ipilimumab 投与群が生理食塩水対照群と比べて約 2 倍高く、HBsAg に対する細胞免疫応答の亢進が示唆された。SK-mel に対する DTH 評点には Ipilimumab 投与による増加はみられなかった。体液性免疫応答では、SK-mel 及び HBsAg に対する高い抗体価（平均値で最大約 5 倍）が第 1 段階で Ipilimumab を投与したサルに認められたが、DNP-ficoll に対する体液性免疫応答はいずれの投与群でも一様に乏しかった。第 2 段階での Ipilimumab 投与（ワクチンの再接種なし）の結果、SK-mel、HBsAg 及び DNP-ficoll に対するいずれの抗体のリコール応答も認められなかった。末梢血メモリーT 細胞（特に CD4 セントラルメモリーT 細胞サブセット）の増加（対照群と比べて最大＋77%）が Ipilimumab を投与したサルに認められた。その他の末梢血分類には、投与と関連した影響は認められなかった。第 2 段階の Ipilimumab 投与による毒性学的意義のある一般症状はみられず、鼠径リンパ節、脾臓及び大腸の免疫細胞サブセットに意義のある変化は認められなかった。

以上より、10 mg/kg の Ipilimumab 及び HBsAg、SK-mel 及び DNP-ficoll 抗原を月 1 回、計 2 回投与した 1 例で重篤な大腸の炎症が認められ、一般状態の悪化により Day 42 に安楽死させた。本例の大腸で認められた炎症性変化には、Ipilimumab の薬理作用（CTLA-4 の阻害による自己免疫寛容の調節）との関連性が示唆され、臨床試験で報告されている Ipilimumab 療法の主要な irAE と同様の変化と考えられた。約 4.5 ヵ月間に計 4 回投与した他の生存例においては、Ipilimumab の忍容性は良好であった。

3.1.2.4 サル 4 ヵ月間静脈内間歇併用投与探索的薬理試験

（4.2.1.1-9 試験番号 TIB-06-001、【モジュール 2.6.7、2.6.7.6】［参考資料］）

カニクイザル（1 群雄 4 匹及び雌 2 匹）に Ipilimumab 又は BMS-663513 を単剤あるいは併用投与して SIV DNA ワクチンによる免疫応答を評価した。本試験は Ipilimumab 又は BMS-663513 及びこれらの併用による SIV DNA ワクチンへの免疫応答に対する影響を検討する目的で実施した薬理試験であったが、毒性変化が認められたため毒性試験の項に記載した。SIV ワクチンには、SIV の一部である gag（pSIVgag）、env（pSIVenv）及び pol（pSIVpol）蛋白を発現する 3 種を使用した。各ワクチンを bupivicaine

の 0.25%水溶液を添加した 0.15 M クエン酸緩衝液（pH 6.7）に溶解し、カニクイザル（1 群雄 4 匹及び雌 2 匹）にそれぞれ 1 mg（2 mL）を Day 1、2、29、30、57、58、85 及び 86 に筋肉内投与した。また、Ipilimumab（2 mL/kg）又は BMS-663513（5 mL/kg）の単剤又は両方をいずれも 10 mg/kg の用量で Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88 にケタミン沈静下で静脈内投与した。ワクチン対照群（雄 4 匹及び雌 2 匹）には SIV DNA ワクチンを同様に筋肉内投与し、生理食塩水（4 mL/kg）を静脈内投与した。更に、陰性対照群（雌雄各 3 匹）を設け、0.25% bupivicaine 水溶液 2 mL を筋肉内投与し、生理食塩水 4 mL/kg）を静脈内投与した。SIV DNA ワクチンの初回投与日を Day 1 とした。血漿及び血清中薬物濃度測定、生死及び一般状態観察、体重測定、理学的検査、臨床病理学的検査及び SIV DNA ワクチンに対する抗原特異的免疫応答検査（ELISPOT 及び細胞増殖アッセイ）を実施した。本試験で認められた毒性所見を下記に示す。薬理学的評価（SIV DNA ワクチンに対する免疫応答など）については、薬理試験の概要文【モジュール 2.6.2】に記載した。

試験中、2 例に毒性変化が認められた。Ipilimumab 単剤投与群雌 1 例に infusion reaction を疑う変化がみられ、併用投与群 1 例に皮膚炎及び発疹がみられた。雌 1 例の infusion reaction を疑う変化は、Day 58 に Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で SIV DNA ワクチンと共にケタミン沈静下で投与した直後に発現した。Ipilimumab を投与した約 5 分後（SIV DNA ワクチン抗原の投与から約 2～3 分後）、チアノーゼ、糸様脈及び心音の減弱がケタミン沈静下で認められたため、挿管して酸素を供給し、ショック症状に対する処置を行った。処置の約 45 分後に容体が安定し、本例は一時的に試験から除外された。その約 5 ヵ月後（Day 211）、同一例にケタミン沈静下で Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で投与速度を 3 mL/min に制御して投与した（ワクチンは非投与）が、投与前と比較した各検査項目（一般症状、体温、心電図、酸素飽和度、心拍数及び血圧）に毒性学的意義のある影響は認められなかった。

Infusion reaction は Ipilimumab の再投与によって再現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。また、SIV DNA ワクチン投与に起因する可能性も考えられた。Infusion reaction がみられた個体は Ipilimumab にアレルギー感作されていなかったと考えられ、アナフィラキシーが infusion reaction の原因でないことが示唆された。同様の反応は、免疫グロブリンの急速静注でサイトカイン放出によって誘発され、投与速度を緩徐にすることにより速やかに改善されることが報告されている [1]。Infusion reaction が発現した当日の投与速度を厳密に管理していなかったため、Ipilimumab 投与により本例に認められた反応は、免疫グロブリンの急速静注による非特異的反応である可能性が考えられた。しかし、反応の発現中及び発現後のサイトカイン量を測定していなかったため、急性のサイトカイン放出の有無は確認できなかった。また、投与時は麻酔により低血圧状態であったため、認められた急性反応はより複雑な機序で発現した可能性があった。ケタミンなどの麻酔薬は、動物やヒトでアナフィラキシー様症状などを引き起こすことが報告されている [2,3,4,5]。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（使用合計数 88 匹）では認められなかった。更に、infusion reaction が発現した 1 例では、反応の発現前（Day 44）の測定で高濃度［signal to noise（S/N）比 690（陽性カットオフ値 1.6）］ADA が検出されており、これにより本例では ipilimumab の曝露量の減少も認められた。蛋白製剤の免疫原性により infusion reaction が生じ、特に投与速度が早い場合は高率に発現することが知られている [6]。また、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性免疫複合体の生成が大幅に減少する。したがって、約 5 ヵ月後（Day 211）の再投与の際に ADA が同様に高濃度であっても infusion reaction を示唆する変化が認められなかったのは、制御された投与速度が十分低かったため免疫複合体の生成が抑制又は減少したことによると考えられた [6,7]。また、本例に加えて Day 116 に他の 1 例で弱い免疫原性陽性反応がみられたことを除き、本試験でその他の

サルに ADA は認められなかった。これらのことから、雌 1 例で認められた infusion reaction の正確な発現機序は明らかではないが、この反応は Ipilimumab の投与又はその標的受容体（CTLA-4）への結合の直接的な影響によるものではないと考えられた。

Ipilimumab 及び BMS-663513 並びに SIV DNA ワクチン併用投与群の雌 1 例に、鼠径部の皮膚炎、発疹及び末梢リンパ節周囲の腫脹が Day 113（Ipilimumab 及び BMS-663513 の最終投与から約 4 週間後）に認められた。本例の鼠径部には投与開始前（Ipilimumab 及び BMS-663513 の投与初日である Day 4 に記録）から脱毛が認められていた。抗ヒスタミン薬による処置で発疹は一時的に治癒したが、約 1 ヵ月後（Day 140）に再発して膝の裏側まで拡大したためプレドニゾンによる処置を開始した。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及び細胞増殖（核増殖抗原 Ki67 陽性の増加）が認められた。発疹は約 2 ヵ月間以内に回復した。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。Ipilimumab の非臨床試験においては、皮膚の発疹・発赤の発現頻度は低く（サルにおいて Ipilimumab 10 mg/kg のおおよそ月 1 回投与で約 6%、反復投与毒性試験全体で約 3%）、Ipilimumab 単剤の最長 6 ヵ月間の重要な反復投与毒性試験では発現しなかった。

以上より、Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で投与したサル 1 例に投与後の infusion reaction が認められ、Ipilimumab 及び BMS-663513 をいずれも 10 mg/kg の用量で併用投与した他の 1 例に皮膚炎が認められた。Infusion reaction と Ipilimumab 投与の因果関係は不明であるが、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。発疹の症状は、Ipilimumab 及び BMS-663513 のいずれでもヒトで臨床的に報告されており、薬理作用に関連する変化と考えられた。上記の 2 例以外においては、本試験で実施した投与法に対する忍容性は良好であった。

4 遺伝毒性

「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ため必要とされない。したがって、Ipilimumab の遺伝毒性試験は実施しなかった。

5 がん原性試験

がん原性試験ガイドライン（ICH S1A）に記載されているとおり、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。更に、がん原性試験に一般的に用いられるげっ歯類の CTLA-4 には Ipilimumab に対する交差反応性がなく、毒性試験に用いる動物種としては適切でないと考えられた。したがって、Ipilimumab のがん原性試験は実施しなかった。

6 生殖発生毒性試験

6.1 サルにおける出生前及び出生後の発生に関する静脈内投与試験及び出生後 6 ヵ月間評価

（4.2.3.5.3-1 試験番号 DN10020、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.14】）

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 ヵ月間以内）に外表検査、理学的検査、骨格検査及び神経行動学的検査を行い、出生後 6 ヵ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。出生後約 182 ± 1 日に安楽死させ、全例について外表検査、内臓検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。また、出生児の血清中並びに母動物の血清中及び乳汁中 Ipilimumab 濃度とともに出生児及び母動物血清中 ADA 濃度を測定した。出生児は可能な限り母動物によって哺育させた。出生児の剖検が終了した母動物は飼育コロニーに戻した。試験期間中に出生児が死亡又は安楽死された母動物は、その時点で剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

妊娠期間中の投与終了時における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。各投与時点における血清中 Ipilimumab 濃度のトラフ値は概して同程度であった。妊娠サルにおけるトキシコキネティクス値を表 6.1-1 に示す。

表 6.1-1: 妊娠サルにおけるトキシコキネティクス値

パラメータ	妊娠日数	Ipilimumab[a]	
		10 mg/kg/dose	30 mg/kg/dose
C (3 min) (µg/mL)	20～22	285[b]/286	834/825
	125～127	291/342	817/890
AUC (0-T) (µg•h/mL)	20～22	42400[b]/43400	119000[b]/126000
	125～127	50500[b]/54700	115000[b]/146000

[a] 曝露量は、抗 Ipilimumab 抗体を検出した個体を含む値/含まない値。

[b] AUC (0-T)：AUC (0-504h)及び LLOQ（0.800 µg/mL）未満までの AUC の平均値（T=168～504h）。

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、哺育期間中に減少して分娩 182 日後の濃度は分娩 3 日後の 1.1%未満であった。出生児においても血清中 Ipilimumab 濃度は 10～30 mg/kg の間で用量に比例し、出生 7 日後から出生 84 日後まで減少がみられた後、出生後 182 日には測定下限（LLOQ：0.800 µg/mL）未満であった。出生児の出生後 7、21、84 及び 182 日の血清中 Ipilimumab 濃度はそれぞれ母動物の分娩後 7、21、84 及び 182 日の血清中 Ipilimumab 濃度と概して同程度であり、妊娠第 3 三半期の胎児の曝露量は母動物と同等であったことが示唆された。更に、出生児における出生後 7～182 日の血清中 Ipilimumab の消失は母動物における分娩後 7～182 日の消失と同様であった。出生児及び母動物の平均血清中 Ipilimumab 濃度及び比を表 6.1-2 に示す。

表 6.1-2: 出生児及び母動物の平均血清中Ipilimumab濃度及び比

用量 (mg/kg/dose)	Ipilimumab 平均血清中濃度 (μg/mL)[a]									平均血清中濃度比：出生児/母動物 [a]			
	母動物					出生児							
	分娩後日数					出生後日数				分娩後/出生後日数			
	3	7	21	84	182	7	21	84	182	7	21	84	182
10	84.5	65.0	35.7	4.78	0.967[b]	56.9	31.7	3.00	NA	1.1	1.2	1.3	NA
30	154	112	60.6	6.02	0.946[b]	122	65.5	4.35	NA	1.4	1.7	1.6	NA

NA：全例で LLOQ（0.800 ng/mL）未満

[a] 抗 Ipilimumab 抗体が検出された個体の血清中濃度を含む平均値。

[b] N = 1（1 例以外の血清中濃度は LLOQ 未満）

分娩後 3、7 及び 21 日の母動物の乳汁中 Ipilimumab 濃度は 10～30 mg/kg の間で用量とともに増加した。乳汁中 Ipilimumab 濃度は血清中濃度と比較して非常に低く、乳汁中と血清中 Ipilimumab の濃度比は 0.002～0.004 であった。

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ず、TDAR にも影響しなかった。

妊娠期間中に Ipilimumab を 10 又は 30 mg/kg の用量で q3w 投与した母動物における忍容性は良好であった。妊娠中から分娩後 6 ヵ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。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。

母動物の病理学的検査は、妊娠損失がみられた個体と対照として用いた無処置の妊娠動物 3 匹についてのみ実施した。これらの母動物では、病理組織学的検査で Ipilimumab 投与と明確に関連した所見は認められなかった。しかし、30 mg/kg 群の母動物の 1 例で腎臓に軽度の糸球体症（好酸性物質の蓄積を伴う糸球体の肥大及び歪み）及び糸球体周囲の単核細胞浸潤が認められた。本所見は 1 例のみに認められた変化であり、関連する一般症状もみられなかったが、慢性的な免疫活性化と多様な糸球体病変との関連性がよく知られており、本所見が高用量群で認められたことから、Ipilimumab 投与との関連性を完全に否定することはできなかった。また、別の 30 mg/kg 群の母動物 1 例に甲状腺の濾胞縮小又は消失を伴う中等度の単核細胞性炎症が認められた。炎症性変化及び腺組織への影響の程度は

通常認められる範囲ではなく、1 例にのみみられた変化であったものの高用量群で認められたことから、本所見と Ipilimumab 投与との関連性を完全に否定することはできなかった。

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%）。臍帯捻転及び閉塞による胎児死亡（10 mg/kg：1 例、30 mg/kg：2 例）を除く胚・胎児死亡を表 6.1-3 に示す。

表 6.1-3: 妊娠中の胎児死亡

用量 (mg/kg)	胎児死亡日（妊娠日）	総死亡率 [a]	妊娠 20～50 日の死亡率	妊娠 51～100 日の死亡率 [a]	妊娠 101～終了の死亡率 [a]	妊娠 140～終了 [b] の死亡率
0（媒体）	32 36 60 85	20% (4/20)	10% (2/20)	10% (2/20)	0% (0/20)	0% (0/20)
10	45 133 143 160 160	26.3% (5/19)	5.3% (1/19)	0% (0/19)	21.1% (4/19)	15.8% (3/19)
30	117 123 146 148 158 166	30% (6/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	30% (6/20)	20% (4/20)
施設背景値範囲 [c]		26.1% (37/142) (6.7～38.9%)	7.0% (10/142) (0～11.8%)	0% (0/142) (0%)	17.6% (25/142) (6.7～28.6%)	10.6% (15/142) (6.7～16.7%)

[a] 臍帯捻転及び閉塞による胎児死亡及び Ipilimumab 投与に関連しない胎児死亡を除く。

[b] 妊娠 140 日以降の死亡は死産とみなした。

[c] 試験施設で 2008 年から現在までに実施した ePPND 8 試験の対照群データ。

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 三半期の胎児死亡及び出生児の死亡が認められた母動物の病理学的検査では、Ipilimumab投与に関連した原因は認められなかった。ヒトにおいては、最も一般的に早期陣痛に至る原因は炎症である [11,12,13,14,15]。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、早産及び出生児の死亡をIpilimumabの作用機序（CTLA-4 の阻害及び免疫刺激）及び標的分子の胎盤への局在と合わせて考察すると、胎児及び出生児の死亡の増加はIpilimumabの薬理作用と関連する可能性が考えられた。

Ipilimumab の投与に関連すると考えられる外表及び内臓の異常が 30 mg/kg 群の早期剖検した出生児 2 例の泌尿生殖器に認められた。そのうち 1 例（雌）では左側腎臓及び尿管の片側性形成不全、他の 1 例（雄）では無開口尿道及びこれに関連して尿路閉塞及び陰嚢皮下の浮腫が認められた。これら以外

に泌尿生殖器の形態異常は認められず、出生児の器官重量、病理組織学的検査及び骨格検査に Ipilimumab 投与に関連した影響はみられなかった。

また、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、30 mg/kg 群の出生児は体重増加率の上昇が生後 3 ヵ月までみられ、生後 6 ヵ月の出生児平均体重は対照群と同等であった。

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。出生児の一般症状、外部形態測定、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 ヵ月まで 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（母動物 AUC：50500 µg·h/mL 未満）。以上の結果に基づき、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。

7 局所刺激性試験

サルにおける反復静脈内投与試験において、Ipilimumab の投与部位に炎症性変化は認められなかった。非臨床試験の投与には臨床投与濃度（約 5 mg/mL）の調製済バイアルを用いたが、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/min）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。

8 その他の毒性試験

8.1 免疫原性

Ipilimumab はサルにおける静脈内投与で顕著な免疫原性を示さなかった。Ipilimumab を単剤及び数種の抗原、DNA ワクチン又は BMS-663513（抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）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 [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] を変更して製造した Ipilimumab（プロセス C）の間に、免疫原性の差は認められなかった。サルにおける ADA 反応の陽性率は、単回投与比較試験【4.2.3.7.7-1】で 13%（8 例中 1 例）、14 日間投与試験【4.2.3.2-2, 4.2.3.2-3】で 17%（12 例中 2 例）、1 ヵ月間投与試験【4.2.3.2-4】で 5%（20 例中 1 例、BMS-663513

と併用投与した 10 例中の 1 例）、2 ヵ月間試験【4.2.3.2-5】で 0%（8 例中 0 例）、3 ヵ月間（79 日間）試験【4.2.3.2-7】で 10%（30 例中 3 例）、探索的 3 ヵ月間試験【4.2.3.2-6】で 0%（6 例中 0 例）、4 ヵ月間薬理試験【4.2.1.1-9】で 8%（12 例中 2 例）、6 ヵ月間試験【4.2.3.2-8】で 0%（10 例中 0 例）及び MDX-1106 との 1 ヵ月間併用投与試験で 32%（19 例中 6 例）であった。Ipilimumab はヒト型抗体であるためサルにおいて異種蛋白であり、これらの免疫反応は予測されたものであった。よって、サルにおける免疫原性の発現やその発現率は、ヒトにおける免疫原性の予測には適さないと考えられた。

サルの 2 週間試験、2 ヵ月間試験、3 ヵ月間（79 日間）試験及び 6 ヵ月間試験では、Ipilimumab の安定化 F(ab')フラグメントに対する抗体反応をサンドイッチ ELISA 法で評価した。結果の実験日によるばらつきを考慮し、投与前と比較して 4 倍を超える抗体価を示した場合に陽性と判定した。また、探索的 3 ヵ月間試験では ELISA 法をブリッジングしたアッセイとして用い、その後の単回投与比較試験、重要な 1 ヵ月間毒性試験、MDX-1106 との併用投与 1 ヵ月間試験及び 4 ヵ月間薬理試験では電気化学発光法（ECL）をブリッジングしたアッセイとして用いて測定した。ECL では、陽性対照血清の値と陰性対照血清の値の比より、試験前の値と比較して 1.6 倍を超えていた場合、抗 Ipilimumab 抗体反応陽性と判定した。

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月 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。この事象に関する詳細については 3.1.2.4 項に記述した。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。この試験では、他の 1 例に ADA の弱い陽性反応が Day 116 に認められたことを除き、ADA は検出されなかった。

以上より、Ipilimumab はサルにおいて異種蛋白であるため、予測通りサルにおいて免疫原性を示したがその割合は低かった。しかし、すべての試験で投与期間中の Ipilimumab の曝露は維持されていた。

8.2 免疫毒性

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 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。

Ipilimumab を最高用量 10 mg/kg で投与した 1 ヵ月間間歇併用毒性試験、3 ヵ月間間歇投与毒性・生物活性同等性試験及び 6 ヵ月間間歇投与毒性試験において、免疫に関連する臨床病理学的検査及びリンパ系組織の剖検検査及び病理組織学的検査に投与に関連した影響は認められなかった。2 週間試験の 30 mg/kg 群で主にリンパ球、好中球、好塩基球及び単球の増加による軽微な白血球数の増加（投与前と比較して約 2 倍）及び末梢血における CD20+B 細胞の軽微な減少が認められた。

実施した試験で認められた免疫学的影響は Ipilimumab の T 細胞活性化作用によるものと考えられ、2 例に認められた irAE（探索的 3 ヵ月間試験で 1 例に認められた大腸炎及び探索的 4 ヵ月間薬理試験で Ipilimumab 及び BMS-663513 を投与された 1 例に認められた発疹）を除き、これらの免疫学的影響は併用投与した試験抗原に特異的な反応であった。複数の試験において、Ipilimumab と併用投与した抗原（SK-mel 細胞、HBsAg 及び KLH）に対する TDAR が亢進（全試験を通して対照群と比較して 2～7 倍）した。1 mg/kg の週 1 回投与又は 10 mg/kg の月 1 回投与における SK-mel 細胞又は HBsAg に対する DTH 皮膚反応には個体差があったが、溶媒投与群と比較して Ipilimumab 投与群でわずかに抗原投与部位の浮腫・硬結、紅斑及び反応径が増加した。

2 ヵ月間探索的試験、3 ヵ月間（79 日間）試験及び 3 ヵ月間探索的試験では、HBsAg 抗原とこの抗原に感作させたサルの全血又は培養 T 細胞を一晩反応させ、抗原特異的 T 細胞の活性化を細胞内サイトカイン（TNF-α、IFN-γ、IL-2）の染色により評価した。10 mg/kg の Ipilimumab を月に 1 回投与した試験において、上記サイトカインの 1 種以上をベースライン（0.2%）を超えて発現した活性化 T 細胞のわずかな増加が陽性対照（*Staphylococcus* エンテロトキシン B）と同様の染色パターンですべての群に認められ、Ipilimumab 投与群では対照群と比べて高頻度に認められた。CD8−細胞の TNF-α 発現が最も高頻度に認められ、CD8+細胞の TNF-α や CD8−細胞又は CD8+細胞の IFN-γ 又は IL-2 発現も認められた。3 ヵ月間（79 日間）試験では、活性化された CD69+T 細胞による抗原特異的サイトカイン産生（TNF-α 又は IFN-γ）の軽度に用量又は投与頻度依存的な増加が Ipilimumab 1 mg/kg の週 1 回投与群又は 10 mg/kg の月 1 回投与群のいずれでも Day 43 又は 79 に認められた。10 mg/kg を月 1 回投与した 3 ヵ月間探索的試験では、投与に関連した抗原特異的 T 細胞活性化は認められなかった。

上記の投与に関連した抗原特異的免疫応答にも関わらず、Ipilimumab を投与したサルの大多数に広範囲の非特異的及び多臓器にわたる免疫活性化や自己免疫毒性は認められなかった。Ipilimumab を最高用量 10 mg/kg まで投与した重要な 1 ヵ月間、3 ヵ月間（79 日間）及び 6 ヵ月間試験及び 2 ヵ月間探索的試験の末梢血リンパ球サブセットフェノタイピングで、投与に関連した全般的な T 細胞活性化及び減少を示す結果は認められなかった。これらすべての試験では、CD2+又は CD3+T 細胞、CD20+B 細胞、CD3/CD4+ヘルパーT 細胞、CD3/CD8+細胞傷害性 T 細胞、CD3−CD16+ナチュラルキラー（NK）細胞、CD3/CD25+活性化 T 細胞サブセット、CD3/CD69+活性化 T 細胞サブセット及び CD3/HLA-DR+細胞（DR アイソタイプの MHC クラス II を発現した T 細胞）の 1 種以上のリンパ球サブセットを評価した。3 ヵ月間の探索的試験では更に、B 細胞、T 細胞、単球、活性化単球（CD14+CD25+）、樹状細胞（CD11c+）、活性化 T 細胞（CD4+CD25+、CD8+CD25+、CD3+HLA+）、メモリーT 細胞（CD3+CD45RO+、CD3+CD45RA−）、エフェクターメモリーT 細胞などのメモリーT 細胞サブセット（CD4+CD28−CD95+、CD8+CD28−CD95+）、セントラルメモリーT 細胞（CD4+CD28+CD95+又は CD8+CD28+CD95+）、ナイーブ T 細胞（CD4+CD28+CD95−又は CD8+CD28+CD95−）及び Treg（CD4+CD25+、CD4+CD25+CTLA-4+、CD4+CD25+FoxP3+）のフェノタイピングを実施したが、末梢血メモリーT 細胞集団の増加（対照群と比べて最大+77%）が特に Ipilimumab を投与したサルの CD4 セントラルメモリーT 細胞サブセット（CD4+CD28+CD95+）で認められた。3 mg/kg 以上の Ipilimumab 及び 10 mg/kg 以上の MDX-1106 を併用投与したサルにおいて、血中 T リンパ球及びヘルパーT リンパ球の変動の大きい増加が認められた。メモリーT 細胞の増加は Ipilimumab の薬理作用に関連する変化であり、その生物活性（体液性・細胞性免疫の亢進）に関与していると考えられた。その他の末梢血細胞数には投与に関連した影響は認められなかった。約 5 ヵ月後の Ipilimumab 投与による再惹起でも、血中、鼠径部リンパ節、脾臓、大腸における同様の免疫細胞サブセットで投与に関連した変化は

認められなかった。更に、Ipilimumab の単剤又は Ipilimumab 及び BMS-663513 を併用投与した重要な 1 ヵ月間試験において血清 ANA 量に投与に関連した増加は認められなかった。

Ipilimumab を投与した 100 例以上のサルのうち探索的試験の 2 例において、ヒトで認められた irAE と同様と考えられる毒性変化が認められた。これらの毒性変化は、3 ヵ月間探索的試験において Day 42 日に安楽死させた 10 mg/kg の Ipilimumab を投与した 1 例に認められた大腸炎及び 4 ヵ月間薬理試験において 10 mg/kg の Ipilimumab 及び BMS-663513 を併用投与した 1 例に認められた鼠径部に末梢リンパ節の腫脹を伴う持続性の皮膚炎及び発疹であった。これらの炎症性変化は、CTLA-4 の重要な役割とされる自己免疫寛容の維持との関連性が示唆され、Ipilimumab の臨床使用で報告されている有害事象と類似していた。臨床試験では、主要な有害事象として主に大腸炎や発疹などの炎症性変化が報告されている。ヒトでは大腸炎とともにブドウ膜炎なども認められているが、Ipilimumab を投与したサルでは認められていない。Ipilimumab が消化管付近のリンパ系組織に発現した CTLA-4 に結合することがヒト組織を使用した組織結合試験で示されており、これらのリンパ球（T 細胞）は活性化状態で存在し、Ipilimumab による CTLA-4 阻害に対する感受性が高いことが示唆されている。

以上より、Ipilimumab はサルにおける抗原特異的な体液性・細胞性免疫を亢進したが、サルに広範囲の非特異的な免疫活性化や自己免疫毒性は概して認められなかった。Ipilimumab を反復投与したサル 2 例において、臨床試験で報告されている症状と類似した irAE（大腸炎及び発疹）を認めたが、これらは CTLA-4 の重要な役割と予想される自己免疫寛容の維持に関連すると考えられた。

8.3 毒性発現の機序に関する試験

毒性発現機序のバイオマーカーに関する評価は 8.2 項に記載した。

8.4 依存性

Ipilimumab はヒト CTLA-4 に特異的結合する免疫グロブリン製剤であり、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。

8.5 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。

8.6 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【モジュール 2.3】に記した通り、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【モジュール 2.3.S.2.5.3】。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。

8.7 組織交差反応性及び結合性

CTLA-4 受容体融合分子との結合性評価により、Ipilimumab の結合には種特異性がみられた【モジュール 2.6.2】。Ipilimumab とヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの細胞又は組織の交差反応性試験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。組織結合性試験は GLP 適合下で実施した。

8.7.1 正常ヒト組織における蛍光標識pilimumabの交差反応性

（4.2.3.7.7-3 試験番号[redacted]578、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17A】）

毒性の標的となる可能性のある器官を特定するため、Ipilimumab の組織結合を各 3 例の提供者から得たヒト組織パネル（36 組織）で比較した。組織切片を 2.5 又は 10 µg/mL の蛍光標識 Ipilimumab（プロセス A：[redacted]）と反応させ、非特異的結合を評価するため蛍光標識した陰性対照抗体（ヒト IgG1κ）と同様に反応させた。構造的に CTLA-4 を発現しているヒト培養 T 細胞（58αβCTLA-4CD38）のペレットの凍結切片及びヒト扁桃腺を陽性対照組織とし、ヒト小脳切片を陰性対照組織とした。染色結果は、陰性、弱い、中等度、強い、非常に強いの 5 段階で評価した。

Ipilimumab は陽性対照組織（58αβCTLA-4CD38）に対して特異的に結合（中等度～非常に強い）したが、陰性対照組織には結合しなかった。ヒト組織試料では、扁桃腺のリンパ球（3 例中 3 例）、血液塗抹標本（3 例中 2 例）及び大腸（3 例中 1 例）に Ipilimumab との特異的反応性が認められた。大腸での染色強度は 2.5 及び 10 µg/mL で同様（中等度～強い）であったが、扁桃腺（2.5 µg/mL：弱い～中等度、10 µg/mL：中等度）と末梢血リンパ球（2.5 µg/mL：陰性、10 µg/mL：弱い～中等度）での染色強度は濃度依存的であった。扁桃腺では、Ipilimumab の特異的染色は膜周囲散在性の顆粒及び膜直下の細胞質に認められた。Ipilimumab 特異的染色は、濾胞、濾胞間及び上皮下に散在するリンパ球に認められた。扁桃腺の全リンパ球の 1%～2%未満が Ipilimumab との反応性を示した。末梢血塗抹標本では、Ipilimumab は少数（1%～2%未満）のリンパ球の細胞膜に結合した直径約 1 µm の散在性顆粒に特異的に結合した。結合の認められた顆粒は環状又は弓状に配列しており、リンパ球表面への局在が示唆された。大腸では、Ipilimumab は結腸の粘膜下リンパ節に散在する濾胞及び濾胞間リンパ球に特異的に結合した。

以上より、ヒト組織パネル（36 組織）において Ipilimumab の特異的結合は扁桃腺、末梢血及び結腸のわずかなリンパ球サブセットにのみ認められた。組織間の交差反応性は、これまでに報告されているヒト及び動物組織における CTLA-4 受容体の免疫組織学的分布と概して一致した [10,16,42,43,44]。予期しない交差反応性は認められなかった。

8.7.2 正常ヒト組織における蛍光標識pilimumabの交差反応性（追加試験）

（4.2.3.7.7-4 試験番号[redacted]933、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17A】）

プロセス B（[redacted]）の Ipilimumab について各 3 例の提供者から得たヒト凍結組織パネル（12 組織）における組織結合性試験を実施し、プロセス A（[redacted]）の Ipilimumab の組織結合性（[redacted]578 試験）と比較した。組織切片を 2 又は 10 µg/mL の蛍光標識 Ipilimumab と反応させ、非特異的結合を評価するため蛍光標識陰性対照抗体（ヒト IgG1κ）と同様に反応させた。また、それぞれの組織切片を陽性対照抗体（抗ヒト β2 マイクログロブリン）で染色し、抗体の反応性を検証した。ヒト扁桃腺組織切片を陽性対照組織とし、ヒト小脳組織切片を陰性対照組織とした。染色結果の等級は陰性、弱い、中等度、強い、非常に強いの 5 段階で評価した。

Ipilimumab は陽性対照組織であるヒト扁桃腺に対して特異的に結合（強い～非常に強い）したが、陰性対照組織には結合しなかった。試験に供したヒト組織では、Ipilimumab の特異的な結合が扁桃腺（3 例中 3 例）、大腸粘膜下のリンパ節（3 例中 3 例）、食道（3 例中 1 例）、小腸（2 例中 1 例）、胃（3 例中 2 例）及び末梢血塗抹標本（3 例中 3 例）に認められた。大部分の組織で 2 µg/mL においても染色が認められたが、染色強度は 10 µg/mL で概して強かった。免疫反応性細胞は、形態（核細胞質比が大きい円形の単核細胞で、樹状突起を欠き、直径約 10～15 µm）及び組織中の局在に基づき、リンパ球として識別した。すべての組織において、Ipilimumab のリンパ球への特異的結合は、膜周囲散在性の顆粒及び膜直下の細胞質に認められた。反応性は、濾胞、濾胞間、上皮下及び上皮内（遊走性）のリンパ球に認められた。Ipilimumab との反応性が認められたリンパ球は扁桃腺の全リンパ球の 1%～5%未満であった。

評価した 3 例中 1 例の末梢血塗抹標本では、少数のリンパ球で直径約 1 µm の離散顆粒に Ipilimumab の特異的結合が認められた。結合の認められた顆粒は環状又は弓状に配列していた。末梢血全白血球の 5%未満に Ipilimumab との反応性が認められた。ごく少数の Ipilimumab 染色性リンパ球が、肺（3 例中 2 例）、腎臓（3 例中 2 例）及び肝臓（3 例中 1 例）にも認められたが、脳（小脳及び大脳）、心臓及び皮膚には認められなかった。

以上より、ヒト組織パネル（12 組織）において、Ipilimumabの特異的結合は、扁桃腺、大腸、食道、小腸、胃及び末梢血中の少数のリンパ球サブセット並びに肺、腎臓及び肝臓中のごく少数のリンパ球にのみ認められた。組織間の交差反応性は、これまでに報告されているヒト組織におけるCTLA-4 受容体の免疫組織学的分布及びプロセスAで製造したIpilimumabで得られた結果と概して一致していた[10,16]。予期しない交差反応性は認められなかった。

8.7.3 マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける組織結合性比較試験

（4.2.3.7.7-5 試験番号 DS05067、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17A】）

サル組織パネル（23 組織）、ヒト組織パネル（23 組織）並びにマウス、ラット及びウサギのリンパ系組織における Ipilimumab の組織結合性を比較して動物種特異的結合を評価し、毒性標的器官を検索した。各動物種において、雌雄各 2 例の組織を評価した。組織切片を 1 又は 10 µg/mL のビオチン標識 Ipilimumab と反応させ、非特異的結合を評価するためビオチン標識陰性対照抗体（ヒト IgG1κ）と同様に反応させた。また、それぞれの組織切片を陽性対照抗体（抗ヒト β2 マイクログロブリン）で染色し、抗体の反応性を検証した。構造的に CTLA-4 を発現しているヒト培養 T 細胞（58αβCTLA-4CD38）ペレットの凍結切片及びヒト扁桃腺を陽性対照組織とし、ヒト小脳切片を陰性対照組織とした。染色結果の等級は陰性、弱い、中等度、強い、非常に強いの 5 段階で評価した。

ヒトとカニクイザルの組織において、1 及び 10 µg/mL の Ipilimumab は消化管、リンパ系組織及び皮膚内の細胞質に乏しい小型の単核細胞（リンパ球）に特異的に結合した。更に、ビオチン標識 Ipilimumab（1 及び 10 µg/mL）はヒト及びカニクイザルの胎盤の結合組織及びカニクイザルの卵巣の結合組織に特異的に結合し、ヒトの卵巣には結合しなかった。複数の組織では 1 µg/mL で染色が認められたが、染色強度は 10 µg/mL で概して強かった。

Ipilimumab は、サル及びヒトのその他の組織、マウス、ラット及びウサギのリンパ系組織（ウサギ：リンパ節、脾臓及び扁桃腺、マウス及びラット：リンパ節及び脾臓）には結合しなかった。

Ipilimumab の特異的結合がリンパ系組織のリンパ球で認められたことは、正常ヒト組織における蛍光標識 Ipilimumab の交差反応性試験（試験番号[redacted]578）において、Ipilimumab が扁桃腺、大腸及び培養ヒト T 細胞（58αβCTLA-4CD38）ペレットのヒトリンパ球に強く特異的に結合し、ヒト小脳組織には結合しなかった結果と一致した。

一方、[redacted]578 試験では Ipilimumab はヒト胎盤組織と特異的に結合しなかった。CTLA-4 蛋白がヒト胎盤線維芽細胞に発現していることは報告されているが、その機能については明らかでなく、細胞内部に発現しているのか Ipilimumab が作用を及ぼすと推定される細胞表面に発現しているのかについても明らかでない[8]。したがって、Ipilimumab がカニクイザル及びヒトの胎盤組織に結合することの生物学的意義は不明であり、サル ePPND 試験で妊娠第 3 三半期に認められた胎児・新生児死亡との関連性は明らかでない。

また、Ipilimumab はカニクイザルの卵巣結合組織に特異的に結合することが示されたが、サルを用いて実施した毒性試験の剖検及び病理組織学的検査において卵巣に所見は認められていない。卵巣組織への同様な結合はヒトでは認められていないことからも、サルの卵巣結合組織で認められた Ipilimumab の結合には生物学的・毒性学的な関連性はないと考えられた。

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、予測されたものであった[10]。

以上より、カニクイザル組織パネル（23 組織）及びヒト組織パネル（23 組織）並びにマウス、ラット及びウサギのリンパ系組織において、Ipilimumab の特異的結合はサル及びヒト組織のみに認められ、サル及びヒトの胎盤、消化管、リンパ系組織及び皮膚、サルの卵巣に結合した。これらの試験結果から、Ipilimumab はマウス、ラット及びウサギの組織には結合せず、サル及びヒトの組織に結合したことが示され、Ipilimumab がカニクイザル及びヒトの CTLA-4 に特異的に結合することが裏付けられた。

8.8 *In vitro*細胞増殖及びサイトカイン放出の評価

8.8.1 ヒト末梢血単核細胞を用いたin vitro細胞増殖及びサイトカイン放出試験

（4.2.3.7.7-6 試験番号 930034490、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17B】［参考資料］）

抗CD137 抗体であるBMS-663513 及びIpilimumabそれぞれの単剤または併用におけるヒト末梢血単核細胞（PBMC）の増殖及びサイトカイン放出への影響を評価した。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[17,18]。しかし、Stebbingらによってレトロスペクティブに検証された新規*in vitro*試験法において、TGN1412 をプレート上に直接又は抗ヒトIgG抗体を介して安定化した後にヒトPBMCへ提示することで、サイトカインの放出作用とリンパ球の増殖作用を惹起した[17]。そこで、安定化したBMS-663513 及びIpilimumabの併用又はそれぞれ単独（単独の場合、適切なアイソタイプの対照抗体の存在下で）でヒトPBMCに曝露し、増殖及びサイトカイン放出への影響を評価した。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（TGN1412 は 5.11A1 のヒト化IgG4 抗体）を陽性対照として使用するとともに、試験法の比較に用いた。

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。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（被検抗体用量：0.016、0.08、0.4、2、10 及び 50 µg/well）、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（被検抗体用量：0.08、0.4、2、10、50 及び 250 µg/well）。両アッセイでは、10 例の健康成人から採取した PBMC を評価した。反応開始後 6 及び 24 時間後、上清中のサイトカイン（IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8 及び IL-12）を測定した。プレートを更に 2 日間（合計 66 時間）培養して 1 µCi/well のトリチウム標識チミジンと 6 時間反応させた後、液体シンチレーションカウンターを用いて細胞増殖を評価した。

10 例の試料のすべてにおいて、陽性対照の 5.11A1 はリンパ球の増殖反応をすべての用量で顕著に誘導した（平均 SI＝乾燥固定法：34.3、抗体結合法：138.8）。最大反応は、乾燥固定法では 2 及び 10 µg/well で、抗体結合法では約 0.08 µg/mL で認められた。両アッセイにおいて、BMS-663513 単独（IgG1 アイソタイプの対照抗体併用）では、PBMC の増殖を誘導しなかった（平均 SI：乾燥固定法＝−0.7、抗体結合法：1.4）。一方、Ipilimumab 単独（IgG4 アイソタイプの対照抗体併用）では、乾燥固定法及び抗体結合法でそれぞれ 10 例中 6 例及び 10 例中 9 例に軽微な増殖反応がそれぞれ 0.4 µg/well 及び 2.0 µg/mL の用量で認められた（平均 SI：乾燥固定法＝4.4、抗体結合法＝12.1）。同じ試料の多数において（乾燥固定法 10 例中 9 例、抗体結合法 10 例中 6 例）、Ipilimumab 単独（IgG4 アイソタイプの対照抗体併用）では増殖性に影響がみられた用量（0.4 及び 2.0 µg/mL）に BMS-663513 を併用しても増殖性への影響は Ipilimumab 単独と同様又はより小さく、Ipilimumab 及び BMS-663513 が増殖性に与える影響に相加及び相乗作用はないと考えられた。最大反応は、乾燥固定法では約 0.016 µg/well、抗体結合法では約 0.08 µg/mL で認められた（表 8.8.1-1）。

表 8.8.1-1: 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：Ipilimumab 及びBMS-663513 の単剤又は併用若しくは 5.11A1 がヒトPBMCの増殖に及ぼす影響

試料	乾燥固定法[a]			抗体結合法[b]		
	最大 SI[c]			最大 SI		
	Ipilimumab[d]	Ipilimumab[e]+ BMS-663513	5.11A1[f]	Ipilimumab	Ipilimumab+ BMS-663513	5.11A1
1	3.8	−0.2	62.5	1.7	3.1	224.9
2	0.5	−0.6	5	14.6	9.7	122.5
3	−0.3	−0.4	15.8	3.6	3	139.3
4	1	0.2	80.5	−0.8	−0.8	9
5	20.8	13.1	64.9	16.5	16.9	182.6
6	4.8	2	49.3	5.4	2.6	116.5

7	11.6	1.8	46.9	22.5	1.7	130.5
8	−0.3	−0.5	4.5	27.5	24.9	72.8
9	−0.3	−0.3	11	26.7	45.9	242.9
10	2.8	1.4	34.3	3.3	9.6	146.9
平均[g]	4.4	1.7	34.3	12.1	11.7	138.8

[a] 採取 72 時間後に被験抗体と 0.016～50 μg/well の濃度で反応させた値。

[b] 採取 72 時間後に被験抗体と 0.08～250 μg/mL の濃度で反応させた値。

[c] SI：刺激指数 =（試料の値−溶媒の値）/溶媒の値、溶媒の SI は 0。

[d] Ipilimumab 及び IgG4 の 0.4 μg/well（乾燥固定法の最大反応濃度）及び 2 μg/mL（抗体結合法の最大反応濃度）における値。

[e] Ipilimumab 及び BMS-663513 の 0.016～10 μg/well（乾燥固定法の最大反応濃度）及び 0.08～0.4 μg/mL（抗体結合法の最大反応濃度）における値。

[f] 5.11A1 の 2～10 μg/well（乾燥固定法の最大反応濃度）及び 0.08～50 μg/mL（抗体結合法の最大反応濃度）における値。

[g] BMS-663513 単独（IgG1 と併用）の平均 SI は乾燥固定法で−0.7 及び抗体結合法で 1.4、増殖誘導作用が認められなかったため個別値は表記しなかった。

抗体結合法アッセイに供した全 10 例の試料のうち、反応開始後 24 時間［5.11A1：0.4、2 及び 10 μg/mL、Ipilimumab：2 μg/mL（IgG4 又は BMS-663513 の 0.4、2 及び 10 μg/mL と併用）］のサイトカイン放出を評価した。陽性対照である 5.11A1 は IL-12 を除くすべてのサイトカイン（IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 及び IL-8）を比較的強く（平均最大 SI 範囲：4～124）誘導した。BMS-663513 単独（IgG1 アイソタイプ抗体と併用）はサイトカインの放出を誘導しなかった（平均 SI 0.03 以下）が、Ipilimumab 単独では 5.11A1 のサイトカイン放出プロファイルと異なり、主に IL-2、IL-6、IL-8 及び TNF-α を軽微に誘導した（平均 SI 範囲 2～6）。これらの結果は表 8.8.1-2 にまとめた。BMS-663513 を Ipilimumab に加えてもサイトカイン放出の誘導に影響は認められず、Ipilimumab 及び BMS-663513 の併用に相加及び相乗作用はないと考えられた。

表 8.8.1-2: Ipilimumab及びBMS-663513 の単剤又は併用若しくは 5.11A1 がヒトPBMCのサイトカイン放出に及ぼす影響

	Ipilimumab[a]			**Ipilimumab+BMS663513[b]**			**5.11A1[c]**		
サイトカイン	**SI>1 発生率**	**個別最大 SI**	**平均最大 SI[d]**	**SI>1 発生率**	**個別最大 SI**	**平均最大 SI[d]**	**SI>1 発生率**	**個別最大 SI**	**平均最大 SI[d]**
IL-2	4/10	39.7	6.3	4/10	16.2	2.4	9/10	306.3	54.5
IL-4	1/10	4.9	0.2	0/10	0	−0.3	8/10	95.3	12.8
IL-6	9/10	9.4	3.4	0/10	0.9	0.3	10/10	46.1	16.5
IL-8	7/10	7.9	2.2	1/10	1.8	0.4	10/10	7.4	4
IFN-γ	0/10	0.5	−0.8	0/10	−1	−0.9	9/10	445.3	112.4
TNF-α	4/10	27.6	5.3	3/10	9.6	1.4	10/10	536.0	123.9
IL-5	1/10	6.6	0.7	1/10	1.7	0.2	10/10	354.8	65.8
IL-12	0/10	0	−0.6	0/10	0	−0.6	0/10	1	−0.6

採取 24 時間後に被験抗体と 0.4～10 μg/mL（N = 10/group）の濃度で反応させた値を表記した

a Ipilimumab 及び IgG4 の 2 μg/mL における値。

b Ipilimumab（2 μg/mL）及び BMS-663513（0.4 μg/mL）における値（最大 SI 濃度）。

c 5.11A1 の 0.4～10 μg/mL における値を表記した（最大 SI 濃度）。

d SI：刺激指数 =（試料の値−溶媒の値）／溶媒の値、溶媒の SI は 0。

以上より、*in vitro* 安定化手法を用いて安定化した BMS-663513 及び Ipilimumab をそれぞれ単剤及び併用でヒト PBMC に曝露し、増殖及びサイトカイン放出への影響を評価した結果、Ipilimumab は単独で陽性対照である 5.11A1 と比較して軽微な増殖及びサイトカインの放出を数例の試料で誘導したのみであり、BMS-663513 との併用に相加及び相乗効果は認められなかった。これらの結果は臨床試験においてIpilimumabが有害で制御不能なサイトカインの放出を誘導しないという結果と一致した。

8.8.2 Ipilimumab及びMDX-1106 の併用によるヒト末梢血細胞のサイトカイン放出ex vivo試験

（4.2.3.7.7-7 試験番号 MDX-1106/010-008-R、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17B】［参考資料］）

Ipilimumab 及び抗 PD-1 抗体である MDX-1106 の単剤又は併用によるヒト末梢血細胞からのサイトカイン放出を評価した。本試験では、可溶化した MDX-1106 及び Ipilimumab を用いた。健康成人 10 例から得た新鮮全血 10 試料を試験に用いた。試料の全血は MDX-1106、Ipilimumab、MDX-1106 と Ipilimumab、抗 CD3 モノクローナル抗体（UCHT-1、陽性対照）、ヒト IgG1 又はヒト IgG4 抗体と 37 ^{o}C、5% CO_2 条件下で 4 又は 24 時間反応させた。225 µL のヘパリン処理全血を各ウェルに注入し、各抗体を最終濃度が 10 及び 100 µg/mL になるように加えた。反応終了後、血漿を採取して−20ºC で保存し、サイトカインサイトメトリビーズアレイアッセイでサイトカイン（IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-6 及び IL-10）を測定した。

Ipilimumab、MDX-1106 又はその併用により、いずれの 4 時間及び 24 時間時反応後の全血試料にも IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4、IL-6 及び IL-10 の放出は認められなかった（平均最大サイトカイン量 14 pg/mL 以下）。それと比較し、陽性対照である抗 CD3 抗体では反応時間依存的な高レベルかつ複数のサイトカイン放出（IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-6 及び IL-10）が 10 例中 8 例で認められた（平均最大サイトカイン量 48～1883 pg/mL）。抗 CD3 抗体との反応や放出されるサイトカイン量に個体間のばらつきが認められたが、2 例を除いたすべての試料でサイトカイン放出が認められ、IL-4 の放出はいずれの試料でも認められなかった。

以上より、Ipilimumab 及び MDX-1106 を単剤又は併用でヒト全血細胞と可溶化した系で最大 24 時間反応させても、サイトカインの放出は認められなかった。これらは、Ipilimumab 又は抗 PD-1 抗体の単剤若しくは併用がヒト末梢血細胞において非特異的リンパ球活性化及びサイトカインの放出を誘導しないことを示唆した。

8.9 併用投与毒性試験

8.9.1 BMS-663513 及びIpilimumabのサル 1 ヵ月間間歇（qw）静脈内併用投与毒性試験

カニクイザルに Ipilimumab 単剤又は Ipilimumab 及び BMS-663513（抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）を 1 ヵ月間間歇（qw×4）投与して毒性を評価した。Ipilimumab 単剤の 10 mg/kg［AUC (0-63 日) : 102100 µg·h/mL］及び BMS-663513 の 100 mg/kg/dose との併用［AUC (0-63 日) : 81900 µg·h/mL］において、毒性学的意義のある変化は認められなかった。本試験では Ipilimumab 単剤の毒性も評価しており、その結果は 3.1.1.2 項に詳述した。

8.9.2 BMS-663513 及びIpilimumabのサル 4 ヵ月間間歇（2q4w）静脈内併用投与探索的薬理試験

カニクイザルに Ipilimumab をおおよそ月に 2 回（投与日：Day 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 例に遅延性過敏症と考えられる皮膚炎及び発疹がみられた。本試験では Ipilimumab 単剤の毒性も評価しており、その結果は 3.1.2.4 項に詳述した。

8.9.3 MDX-1106 及びIpilimumabのサル 4 週間間歇（qw）静脈内併用投与毒性試験

（4.2.3.7.7-2 試験番号[redacted]00106、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.6】［参考資料］）

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、投与速度：0.6/1 mL/kg）及び 10/50 mg/kg（高用量併用群、投与速度：2/5 mL/kg）の用量で 4 週間（qw×4、投与日：Day 1、8、15 及び 22）静脈内投与した。最終投与終了後に約 4 週間の休薬期間を設け、投与に関連した影響の回復性を評価した。対照群には注射用生理食塩水を 7 mL/kg の投与容量で投与した。試験では、トキシコキネティクス測定、生死・一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、理学的検査（神経学的検査、呼吸系検査及び眼科学的検査）、心電図検査、血圧測定、心拍数測定、酸素飽和度測定、体温測定、末梢血リンパ球フェノタイピング、Ipilimumab 及び MDX-1106 に対する免疫原性検査、KLH に対する TDAR 検査、臨床病理学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。高用量併用群の雄 1 例が Day 23 に死亡発見されたため、Day 30（最終投与から 8 日後）に対照群及び低用量併用群では雌雄各 3 例、高用量併用群では雄 2 例雌 3 例をそれぞれ剖検した。各群雌雄 2 例については更に 4 週間の休薬期間を設けた後、Day 59 に剖検した。

血漿中の MDX-1106 及び Ipilimumab 濃度には個体差が認められたが、概して用量に伴って増加し、性差はみられなかった。本試験の曝露量はそれぞれの単剤の投与と同様であった。MDX-1106 は、Day 1～22 日の間で蓄積を示さなかった。同群の他の動物よりも曝露量が低い個体では抗 MDX-1106 抗体が Day 28 又は 58 にも検出される傾向にあり、抗 MDX-1106 抗体が血中薬物濃度に影響を与えることが示唆された。抗 MDX-1106 抗体は、Day 28 及び 58 に 19 例中 10 例で認められた。Day 1 及び 22 の血中 Ipilimumab 濃度を比較した結果、試験期間を通した Ipilimumab の軽微な蓄積が示唆された。Day 28 又は 58 に抗 Ipilimumab 抗体が認められたサルは 19 例中 6 例（32%）であり、Ipilimumab 単剤の投与による発生率よりも高かった。

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（結腸、盲腸及び直腸）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。

消化管では、低用量併用群で大腸及び骨盤リンパ節の拡張を伴う軽微なびまん性の粘膜固有層のリンパ形質細胞性炎症が認められ、高用量併用群では粘膜固有層に加え粘膜下のリンパ球及び組織球を主体とするより重度な炎症が認められた。単核細胞性の炎症は、ごく軽微な粘膜上皮の変性・再生、少数の粘液腺拡張又はごく軽度な好中球性炎症を伴って認められた。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。Day 10（2 回目投与の 2 日後）の KLH 投与後、KLH 特異的抗体反応（IgG 及び IgM）の亢進が両用量で同程度［IgM : 対照群と比べて 1.4～2.5 倍（Day 15 及び 24）、IgG：2.3～3.2 倍（Day 24）］に認められた。

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。本例では持続的な下痢、摂餌量の減少及び体重の減少がみられ、これらの症状は死亡前の治療処置にわずかに反応して改善し、高用量併用群の他のサルと同様に消化管の炎症性変化を示唆する所見はみられなかった。鼓脹はサルの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。その他、両用量群で胸腺の皮質又は髄質のリンパ球数減少、高用量併用群のみで膵臓腺房細胞の脱顆粒が認められたが、消化管への影響に関連した生理学的なストレス及び摂餌量減少の二次的変化と考えられた。4 週間の休薬期間後、これらと同様の所見が比較的軽度に高用量併用群のみで認められ、回復傾向が示唆された。

理学的検査、眼科学的検査、心電図、血圧、心拍数、体温及び酸素飽和度には投与に関連した変化は認められなかった。

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 単剤の試験における発生率（0%～17%）よりも高かった。本試験における Ipilimumab の無毒性量は、10 mg/kg 以上の MDX-1106 と併用投与した場合、3 mg/kg 未満と推定された。

8.10 異なる製造工程による原薬（製剤）の比較試験

8.10.1 MDX-010-[redacted]（プロセスB）及びMDX-010-[redacted]（プロセスA）のサル 3 ヵ月間（79 日間）間歇静脈内投与毒性・生物活性同等性試験

（4.2.3.2-7、試験番号[redacted]-1416-128、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7D】）

カニクイザルに[redacted] Ipilimumab（プロセス B）又は[redacted] Ipilimumab（プロセス A）を投与し、薬物動態、免疫原性、生物活性（抗原特異的 T 細胞活性化）及び毒性の同等性を確認した【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7D 及び 2.6.7.17C】。本試験の詳細については 3.1.1.3 項に記載した。また、Ipilimumab の製造方法については、製造工程開発の経緯【モジュール 2.3.S.2.6】に詳述した。

カニクイザル（1 群雌雄各 3 例）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。

全例について 2 種のワクチン抗原［SK-mel 細胞の 5×10^6 cell（投与容量 0.5 mL）を皮下投与及び HBsAg の 10 µg（投与容量 0.5 mL）を筋肉内投与］を Day 1、29 及び 57 に投与した。また、ワクチン対照群（雌雄各 3 例）を設け、2 mL/kg の生理食塩水及び 2 種のワクチン抗原を同様に投与した。

プロセス B を 0.1、1 及び 10 mg/kg の用量で月 1 回 3 ヵ月間又は 1 mg/kg の用量で週 1 回 10 週間若しくはプロセス A を 10 mg/kg の用量で月 1 回 3 ヵ月間投与したいずれの群においても毒性学的意義のある変化は認められなかった。プロセス A 及び B を 10 mg/kg の用量で投与したときの薬物動態学的パラメータを表 8.10.1-1 に示す。

表 8.10.1-1: サルにおけるプロセスA及びBの薬物動態学的パラメータ

プロセス	性別	Cmax (µg/mL)	AUC (0-672h) (µg·h/mL)	AUC (INF) (µg·h/mL)	T1/2 (h)	MRT (h)	CLT (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
B 10 mg/kg	雄	560 (97.4)	51600 (2630)	59500 (4350)	275 (38.8)	298 (33.9)	0.169 (0.0118)	50 (3.69)
	雌	503 (96.6)	49600 (2490)	53900 (1310)	194 (24.7)	241 (27.4)	0.186 (0.00456)	44.9 (6.15)
A 10 mg/kg	雄	459 (68.7)	44900[a] (13600)	48900 (15200)	169 (76.4)	184 (44.5)	0.217 (0.0572)	38.3 (5.76)
	雌	420 (49.1)	45300 (7980)	48200 (10600)	173 (52.4)	207 (45.5)	0.214 (0.0425)	43.1 (3.51)

Cmax：最大血中濃度、T1/2：みかけの血中半減期、MRT：平均滞留時間、CLT：総血清クリアランス、Vss：定常状態の分布容積、括弧内は標準偏差

a 672 h における血中濃度が LLOQ 未満であったため、1 例のみ AUC (0-312h)

薬物動態、免疫原性、生物活性（T 細胞活性化及び TDAR）及び毒性プロファイルはプロセス B 及びプロセス A で概して同等であった。

8.10.2 プロセスB及びプロセスCのサルにおける単回静脈内投与薬物動態比較試験

（4.2.3.7.7-1、試験番号 DS07167、【モジュール 2.6.7、表 2.6.7.17C】［参考資料］）

カニクイザルに[redacted] Ipilimumab（プロセス B）又はプロセス B の[redacted]を用い、[redacted]を変更して製造した Ipilimumab（プロセス C）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。Ipilimumab の製造方法については、製造工程開発の経緯【モジュール 2.3.S.2.6】に詳述した。

カニクイザル（1 群雌 4 匹）にプロセス B 又はプロセス C をそれぞれ 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。血清中薬物濃度測定、一般状態観察、体重測定、摂餌量観察、体温測定、理学的検査（神経学的検査、心血管系検査及び呼吸系検査）及び免疫原性検査を実施した。試験中死亡動物は認められず、Day 42 に全例を飼育動物群に戻した。

一般症状、体重、摂餌量、体温及び理学的検査では、プロセス B 及びプロセス C 投与群の間に差はみられなかった。

生物学的同等性を評価する試験ではないが、全身曝露量［Cmax、AUC (0-1008h)及び AUC (INF)］は、プロセス B 及びプロセス C 投与群で同等（12%以内）であった。プロセス B 及びプロセス C のいずれも血中半減期は長く［237～582 時間（平均値 ± SD：339 ± 112 時間）］、総血清クリアランスは低く［0.137～0.210 mL/h/kg（平均値 ± SD：0.181 ± 0.025 mL/h/kg）］、定常状態の分布容積は小さかった［0.060～0.104 L/kg（平均値 ± SD：0.081 ± 0.014 L/kg）］。

表 8.10.2-1: サルにおけるプロセスB及びCの薬物動態学的パラメータ

プロセス	Cmax (µg/mL)	AUC (0-1008h) (µg·h/mL)	AUC (INF) (µg·h/mL)	T1/2 (h)	MRT (h)	CLT (mL/h/kg)	Vss (L/kg)
B	252 (13.0)	52100 (4810)	57500 (4950)	307 (71.1)	410 (48.8)	0.175 (0.0148)	0.0717 (0.0106)
C	234 (29.9)	46700 (4630)	55200 (12100)	370 (146)	507 (173)	0.187 (0.0338)	0.0902 (0.00998)

Cmax：最大血中濃度、T1/2：みかけの血中半減期、MRT：平均滞留時間、CLT：総血清クリアランス、Vss：定常状態の分布容積、括弧内は標準偏差

本試験では、プロセス B 及び C のいずれでも明らかな免疫原性はみられなかった。プロセス B を投与した 1 例で、特異的な反応と考えられる軽微な（最終時点抗体価：20）ADA 反応が Day 42（最終採血日）にのみ検出した。また、プロセス C 投与群の 1 例で、ADA 抗体価の陽性反応が Day 1（投与前）、29、36 及び 42 に認められたがその抗体価は下降傾向を示し、本例は Ig 分子に対する抗体反応を試験開始前から有していたと考えられた。また、ADA 抗体価陽性例における Ipilimumab の血中濃度は各群の他の動物と概して同様であり、ADA の存在は Ipilimumab の曝露量には影響しなかった。

以上より、プロセス B 及びプロセス C の一般毒性、免疫原性及び薬物動態プロファイルは、本試験において生物学的に同等であった。

8.11 新添加物の安全性評価

Ipilimumab 製剤の添加物のうち、[redacted]mol/L 水酸化ナトリウム溶液、[redacted]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それぞれの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。DTPA については、その重金属試験の規格値（0.005%）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。各バイアル中の新添加物含量を表 8.11-1 に示す。

表 8.11-1: 重要なIpilimumabの反復毒性試験及びePPND試験に用いたバイアル中の新添加物含量

試験の種類及び期間	試験番号	バッチ番号	添加物含量 [a,b]
2 週間毒性試験	[redacted]-0919-128	010-[redacted]	なし
2 週間毒性試験	7114-100		
1 ヵ月間併用毒性試験	DS06064	[redacted]6544 ([redacted]004)	NaOH: 適量

			HCl: 適量 DTPA: 100 µM
3 ヵ月間（79 日間）毒性試験	[redacted]-1416-128	[redacted]001	なし
6 ヵ月間毒性試験	01-3460	010-[redacted]	なし
ePPND 試験	DN10020	[redacted]5392 ([redacted]6105)	NaOH: 適量 HCl: 適量 DTPA: 100 µM

a 市販予定製剤の含量 = NaOH: 適量、HCl: 適量、DTPA: 39 µg/mL

b 適量：溶液の pH を 7.0 に調整するのに必要な量

8.11.1 [redacted] mol/L水酸化ナトリウム溶液の安全性評価

[redacted] 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（[redacted] mol/L NaOH溶液として[redacted] 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[19]。以上より、この新添加物の臨床的なヒトでの安全性は担保されていると考えられる。

8.11.2 [redacted] mol/L塩酸溶液の安全性評価

[redacted] 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。[redacted]mol/L塩酸溶液は同じくpH調節剤として使用される[redacted] 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 µLである。[redacted]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[20]。以上より、この新添加物の臨床的なヒトでの安全性は担保されていると考えられる。

8.11.3 ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の安全性評価

DTPAは金属キレート作用を持つ低分子化合物である。そのカルシウム又は亜鉛錯体であるCa-DTPA及びZn-DTPAは重金属若しくは放射性物質による体内汚染の除去剤としてヒトで用いられている。これらは本邦でも医薬品（ジトリペンタートカル静注／アエントリペンタートカル静注）として承認され、静脈内投与を中心とした毒性試験の結果が公開概要として公表されている[21]。Ipilimumab製剤の用法・用量に従った静脈内投与によるDTPAの安全性について、上記ジトリペンタートカル静注／アエントリペンタートカル静注の公開概要及び公表論文に基づき評価した。また、Ipilimumab製剤の規格に基づくDTPAの金属不純物の許容濃度（[redacted]%）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【モジュール 2.3.P.4.2】。評価に用いた毒性試験を表 8.11.3-1 に示す。

表 8.11.3-1: DTPAの評価に用いた毒性試験一覧

試験の種類及び期間（化合物）	投与経路	動物種
単回投与毒性（DTPA）	腹腔内	ラット、マウス
単回投与毒性（Ca-DTPA）		

	腹腔内 静脈内	マウス ウサギ、イヌ
反復投与毒性（Ca-DTPA） 14 日間 1 ヵ月間	 静脈内 静脈内	 ウサギ、イヌ イヌ
反復投与毒性（Zn-DTPA） 5 又は 9 日間 19 日間	 皮下 皮下	 ラット イヌ
遺伝毒性（Ca-DTPA） 姉妹染色分体交換試験	 *In vitro*	 ヒトリンパ球
生殖発生毒性（Ca-DTPA） 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 胚・胎児発生に関する試験 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	 腹腔内 腹腔内 静脈内 皮下	 ラット ラット イヌ マウス
生殖発生毒性（Zn-DTPA） 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 胚・胎児発生に関する試験 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	 腹腔内 皮下 腹腔内 皮下	 ラット マウス、ラット ラット マウス
安全性薬理試験（Zn-DTPA） 心血管系に及ぼす影響	 静脈内	 ラット、イヌ

8.11.3.1 単回投与毒性試験

（1）DTPAの試験
ラット（各群雌 10 匹）及びマウス（各群雄 10 匹）にそれぞれ単回腹腔内投与した結果、ラットにおけるLD50 は 587 mg/kg[22]、マウスにおけるLD50 は 543 mg/kg[23]であった。

（2）Ca-DTPA の試験
C3H 系マウス（各群雄 10 匹）に単回腹腔内投与した結果、LD50 は 6216.9 mg/kg であった。また、非げっ歯類（ウサギ及びイヌ）の単回静脈内投与毒性試験では LD50 は算出されておらず、最小致死量は 1133.4 mg/kg（ウサギ）及び 1809 mg/kg（イヌ）と報告されている。

（3）Zn-DTPA の試験
Zn-DTPA の単回投与毒性試験は実施されていないが、反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験では単回投与後の死亡は認められていない。よって、ラットにおける最小致死量は腹腔内投与で 960.0 mg/kg、皮下投与では 6021.0 mg/kg をそれぞれ超える量であると考えられた。また、致死率を指標とした Ca-DTPA との毒性の比較において、投与回数が一定である場合に Ca-DTPA と同程度の毒性作用を Zn-DTPA で得るためには、物質量として Ca-DTPA の 2.5 倍必要であることが報告されている。

8.11.3.2 反復投与毒性試験

DTPA の反復投与毒性試験の情報はないが、Ca-DTPA 及び Zn-DTPA として該当する非臨床試験が実施されている。

（1）Ca-DTPA の試験

1）イヌ 14 日間反復静脈内投与毒性試験

各群雌雄 2 匹のイヌ（雑種、月齢及び体重不明）に Ca-DTPA を 18.09 及び 180.9 mg/kg の用量で 14 日間反復静脈内投与した。その結果、特記すべき所見は認められなかった。

2）イヌ 1 ヵ月間反復静脈内投与毒性試験

雌雄合計 3 匹のビーグル犬（8 歳齢、体重不明）に生理食塩液に溶解させた Ca-DTPA（pH7.2）を 74.6 mg/kg の用量で、1 ヵ月間反復静脈内投与した。血清の総 Ca 濃度、イオン化 Ca 濃度及び pH は単回投与により変化しなかった。投与 4 週目に有意な体重減少を認めたが、その他一般状態では特記すべき所見は認められなかった。血液生化学的検査では、1 例で AST と ALT の上昇が、他の 1 例で BUN とクレアチニンの上昇がそれぞれ認められた。剖検では、全例に小腸粘膜での軽微なうっ血が認められた。病理組織学的検査では、小腸の粘膜固有層及び腎臓の近位尿細管におけるリンパ球の増加、並びに肝臓の変性が認められた。

3）ウサギ 14 日間反復静脈内投与毒性試験

各群雌雄 2 匹のウサギ（系統不明：アルビノ、週齢及び体重不明）を用いた。Ca-DTPA を 18.09 及び 180.9 mg/kg の用量で 14 日間反復静脈内投与した。その結果、特記すべき所見は認められなかった。

（2）Zn-DTPA の試験

1）ラット 5 又は 9 日間反復皮下点滴投与毒性試験

3 ヵ月齢の雌 Heiligenberg 系ラットに Zn-DTPA を 2613.3 mg/kg の用量で頚背部皮下へ点滴により 5 日間（6 匹）又は 9 日間（8 匹）反復投与した。その結果、血尿と投与部位における軽微な局所刺激性を認めたものの、その他特記すべき所見は認められなかった。

2）イヌ 19 日間反復皮下投与毒性試験

2 匹のビーグル犬（性及び月齢不明：Adult、平均体重約 9 kg）にそれぞれ 1 回当たり 4.8 及び 5.1 mg/kg の用量で Zn-DTPA を 19 日間反復皮下投与した（投与間隔 5 時間、総投与回数 91 回）。その結果、1 匹で断続的な下痢、軽度の下血及び軽度の血尿を認めた。他の 1 匹では、ごく軽度の下血を認めたのみであった。下血や血尿は、検査で確認されたのみで肉眼的には判別不可能な程度であった。その他、特記すべき所見は認められなかった。

8.11.3.3 遺伝毒性試験

DTPA の遺伝毒性試験の情報はないが、Ca-DTPA の遺伝毒性試験が実施されている。

（1）Ca-DTPA の試験

1）ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 姉妹染色分体交換試験

ヒトリンパ球を Ca-DTPA の濃度 0.135、1.351 及び 13.51 µg/mL で 72 時間処理し、姉妹染色分体交換（SCE）の出現頻度を計測した（表 8.11.3.3-1）。高用量では分裂像が認められず、残りの 2 用量ではいずれも SCE 出現頻度が対照群を上回り、中用量（1.351 µg/mL）では統計学的有意差（$p<0.001$）がみられた。なお、中用量で認められた増加も、既知の陽性物質（キナクリンマスタード等）に比べると増加の程度はわずかであった。

表 8.11.3.3-1: Ca-DTPAのヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験成績

最終濃度（μg/mL）	細胞 1 個あたりの平均 SCE 数 [a]	検査細胞数
0（対照群）	9.17 ± 0.50	150
0.135	10.14 ± 0.61	35
1.351	12.41 ± 0.63[b]	100
13.51	−	−

[a] 平均値 ± 標準誤差

[b] 対照群と比べ有意な増加（P<0.001; Student's t）

−: 分裂中期の細胞なし

8.11.3.4 生殖発生毒性試験

DTPA の生殖発生毒性試験の情報はないが、Ca-DTPA 及び Zn-DTPA の生殖発生毒性試験が実施されている。

（1）Ca-DTPA の試験

1）ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

5 週齢の雌雄 Heiligenberg 系ラットに Ca-DTPA を 49.7 mg/kg の用量で週 2 回 44 週間反復腹腔内投与した。投与液量は 0.01 mL/g とし、対照群には同量の生理食塩液を同様に投与した。投与開始 6 ヵ月に雌雄それぞれについて未処置動物と交配させた。雌については、妊娠期間中は投与を実施せず、授乳期間中の投与経路は皮下とした。その結果、Ca-DTPA 投与群の雌と無処置動物の雄との交配で、統計学的に有意な差はなかったものの、出生児数の減少が認められた。この結果から、追加で 5 週齢の雌 Heiligenberg 系ラット各群 40 匹に 49.7 及び 99.5 mg/kg の用量で Ca-DTPA を週 2 回 26 週間反復腹腔内投与する試験を実施した。対照群は 20 匹とし、生理食塩液を同様に投与した。26 週間の投与終了後、直ちに各群の半数（20 匹）について無処置の雄と交配させた。残りの半数については、投与期間終了 2 週間後に無処置の雄と交配させた。妊娠 21 日に帝王切開により胎児を摘出した。（なお、対照群の交配時期の詳細については不明。）その結果、胎児数及び胎児体重は対照群と同等であった。また、肉眼的な奇形も認められなかった。

2）ラット胚・胎児発生に関する試験

妊娠 Wistar 系ラット（週齢不明）に Ca-DTPA を 14.3、114.2、228.4、456.8、685.1 及び 913.5 mg/kg の用量で、5 日間反復腹腔内投与した。投与時期は妊娠 8～12 日とした。対照群には生理食塩液を同様に投与した。妊娠 20 日に帝王切開を行った。114.2 mg/kg 群では、胎児の 1 匹で無眼球を認め、数匹に頭蓋骨の骨化減少及び第 13 肋骨下骨棘が認められた。228.4 mg/kg 群では、母動物の体重増加抑制が認められ、胎児死亡率が上昇し、生存胎児では平均体重の明らかな低下と、蜂巣状の外観を呈する水腎症が多数認められた。更に 456.8 mg/kg 以上の投与では、母動物の体重低下又は増加抑制が認められ、すべての胎児が死亡していた。その他、被験物質投与群の生存胎児では、内臓の暗色化がみられた。水腎症の発生頻度は増加しているものの、明らかな肉眼的異常の増加は認められなかった。

3）イヌ胚・胎児発生に関する試験

2 匹の雌ビーグル（月齢不明、動物番号はそれぞれ No.1 及び 2 とする）を用いた。体重は No.1 が 10.4 kg、No.2 が 8.6 kg であった。投与開始までに、それぞれ 3 回交尾させ、初回交尾の 15 日後から出産まで、14.9 mg/kg の用量で反復静脈内投与した。11 匹の出生児のうち、6 匹が 1 週間以内に死亡し、

剖検の結果そのうち2匹に滑脳症が認められた。生存例5匹については、1匹が成長不良であったが、残り4匹は約20週齢で正常体重に達した。生存例の1匹では、通常飼料の摂取開始が遅く、脳の障害が途中死亡した2匹のみではない可能性が示唆された。約6ヵ月齢での血液検査では、5匹中3匹で、程度は様々であるが好中球減少を認めた。他の血液検査データは正常範囲内であった。なお、本試験終了後に母動物を再度交配させたところ、出生児に異常は認められなかった。

4）マウス出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験
未交配の雌C57BL系マウス（67～99日齢）を雄マウスと18日間同居させ、同居4日後から新生児が13日齢になるまで、Ca-DTPAを179.0及び1442.3 mg/kgの用量で反復皮下投与した。投与容量は0.2 mLとした。雄マウス及び新生児には投与しなかった。対照群には生理食塩液（0.2 mL）を同様に投与した。低用量群及び対照群には雌12匹、高用量群には雌6匹をそれぞれ用いた。高用量群では生存出生児は認められなかった。その他、特記すべき所見は認められなかった。なお、高用量群の母動物の生殖能は恒久的な障害を受けたわけではなく、その後交配した際には正常な繁殖能を認めた（データの記載はなし）。

（2）Zn-DTPAの試験
1）ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
5週齢の雌雄Heiligenberg系ラットにZn-DTPAを52.3 mg/kgの用量で週2回44週間反復腹腔内投与した。投与容量は0.01 mL/gとし、対照群には同量の生理食塩液を同様に投与した。投与開始後6ヵ月に雌雄それぞれ、未処置動物と交配させた。雌については、妊娠期間中は投与を実施せず、授乳期間中の投与経路は皮下とした。剖検は44週間の反復投与後に実施した。その結果、Zn-DTPA投与による影響は認められなかった。また、出生児数は対照群と差がなく、出生児の異常も認められなかった。

2）マウス胚・胎児発生に関する試験1
未交配の雌のC57BL系マウス（3～4ヵ月齢、体重18～20 g）に、3010.5及び6021.0 mg/kgの用量で、皮下投与によりZn-DTPAを5日間反復投与した。投与時期は、妊娠2～6日又は7～11日の5日間とした。また、用いた被験物質は、1 molのZn-DTPAに対し、2 molのNaClを含むものであった。このことから、対照群には無処置対照群と、NaClの1380 μmol/mL溶液を投与する浸透圧対照群（NaClの2688.2 mg/kg）の2群を設けた。また、妊娠7～11日の投与群については、比較のためCa-DTPA（Geigy社）の716.2 mg/kgを投与する群を設けた。それぞれ、妊娠18日に帝王切開を行い、胎児の生死及び胚吸収の有無を確認した。また、生存胎児については、体重測定を行い、その後主要臓器を摘出し、残体をアリザリン染色し、器官及び骨格の異常の有無を確認した。妊娠2～6日及び7～11日のいずれの投与でも6021.0 mg/kg投与群及び浸透圧対照群で無処置対照群に比べ流産及び胚吸収が増加していた。なお、Ca-DTPA投与群でも、無処置対照群に比べ、流産及び胚吸収が増加していた。なお、確認された奇形は、Ca-DTPA投与群の生存胎児の1匹で脳ヘルニアが確認されたのみであった。

3）マウス胚・胎児発生に関する試験2
未交配の雌のC57BL系マウス（130～149日齢、体重不明）を用いた。雄マウスと11日間同居させた。同居開始4日後に投与を開始し、29日間又は出産まで、Zn-DTPAを1505.3、3005.3及び6010.6 mg/kgの用量で反復皮下投与した。Zn-DTPAはヒトの治療に用いられる高純度のもの（以下、Zn-DTPA-1）と、1 molのZn-DTPAに対し、2 molのNaClを含有するもの（以下、Zn-DTPA-2）を用いた。対照群

には、生理食塩液を投与する群と、浸透圧による影響を比較するための高張食塩液（81 g NaCl/L）を投与する浸透圧対照群を設けて、同様に投与した。なお、投与液の濃度は一定とし、投与液量により用量を調節し、Zn-DTPA 投与群では用量に応じて 0.2、0.4 及び 0.8 mL を投与した。また、生理食塩液対照群は 0.2 及び 0.8 mL、浸透圧対照群は 0.4 及び 0.8 mL（NaCl として 1344.1 及び 2688.2 mg/kg に相当）の用量段階をそれぞれ設けた。いずれの被験物質投与によっても、生存能のある新生児が認められた。Zn-DTPA-2 群の高用量を除き、いずれの群の産子数も生理食塩液対照群と同等であった。Zn-DTPA-2 群の高用量では、7 匹の母動物のうち、3 匹が途中死亡し、1 匹が流産した。正常な出産を認めたのは 2 匹だけであった。Zn-DTPA-1 群、浸透圧対照群及び Zn-DTPA-2 群のその他の用量では、いずれも 5 匹以上の母動物で出産が認められた。また、生理食塩液対照群では、16 匹中 15 匹で出産が認められた。なお、Zn-DTPA-2 群の高用量で途中死亡した母動物では、いずれも重度の腎障害が認められた。新生児に奇形は認められなかったものの、Zn-DTPA 投与群（-1 及び-2）の高用量では新生児体重の有意な低値が認められた。

4）ラット胚・胎児発生に関する試験（腹腔内投与）

雌の Wistar 系ラット（週齢及び体重不明）に Zn-DTPA を 15.0、120.0 及び 960.0 mg/kg の用量で 5 日間反復腹腔内投与した。投与時期は妊娠 8～12 日とした。対照群には生理食塩液を同様に投与した。妊娠 20 日に帝王切開を行った。15.0 mg/kg 群では、母動物及び胎児に特記すべき所見は認められなかった。120.0 mg/kg 群では生存胎児の 1 匹に水頭症を、2 匹（同腹子）に偶発所見と考えられる第 13 肋骨下の骨棘を認めたことを除き、特記すべき所見は認められなかった。960.0 mg/kg 群では、母動物の投与期間中の体重増加量が小さかった。同群の生存胎児では、1 匹に心室壁の菲薄化を、2 匹（同腹子）に第 13 肋骨下の骨棘を認めたほか、多数で蜂巣状の外観を呈する水腎症を認めた。その他、投与群の生存胎児では、対照群に比べて内臓が暗色化していた。

5）ラット胚・胎児発生に関する試験（皮下投与）
雌の Wistar 系ラット（10～14 週齢、230～280 g）を 1 群 8～10 匹として用いた。Zn-DTPA を 15.7、94.1、188.2、376.3 及び 564.5 mg/kg の用量で、皮下投与により 5 日間反復投与を行った。投与時期は妊娠 9～13 日とした。投与液量は 0.66 mL とし、対照群には 0.60 mL の生理食塩液を同様に投与した。また、無処置対照群も設けた。妊娠 20 日に帝王切開を行った。188.2 mg/kg 群の胎児 1 匹で多指を認めたことを除き、いずれの用量においても母動物及び胎児に異常は認められなかった。

6）マウス出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験
未交配の雌 C57BL 系マウス（67～99 日齢）を用いた。雄マウスと 18 日間同居させ、同居 4 日後から新生児が 13 日齢になるまで、188.2 及び 1515.7 mg/kg の用量で Zn-DTPA を反復皮下投与した。投与容量は 0.2 mL とした。雄マウス及び新生児には投与しなかった。対照群には生理食塩液（0.2 mL）を同様に投与した。Zn-DTPA 投与群には雌 6 匹、対照群には雌 12 匹をそれぞれ用いた。本試験で特記すべき所見は認められなかった。

8.11.3.5 DTPAに含有される金属不純物についての安全性評価

添加物として用いる DTPA の金属不純物については、[redacted]の方法に準じた[redacted]により、規格値を[redacted]%以下と規定している【モジュール 2.3.P.4.2】。Ipilimumab 50 mg バイアル（10 mL）には DTPA が 0.39 mg 添加されており、重金属試験の規格値より DTPA 由来金属

不純物含有量は最大[redacted] μg/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。

8.11.3.6 DTPAの安全性評価に関する考察及び結論

DTPA の安全性について、公表されている DTPA、Ca-DTPA 及び Zn-DTPA の非臨床試験成績に基づき評価した。なお、DTPA、Ca-DTPA 及び Zn-DTPA の毒性量については、物質量（モル）に換算して比較した。

DTPA の単回投与試験の結果、ラット及びマウスにおける腹腔内投与の LD50 値はそれぞれ 587 及び 543 mg/kg であった。また、Ca-DTPA のマウスにおける腹腔内投与の LD50 値は 6216.9 mg/kg であった。Ipilimumab の臨床投与経路とは異なるものの、腹腔内投与の LD50 値を指標とした毒性は、DTPA が Ca-DTPA の約 11 倍高かった。これは、Ca-DTPA と比較して、DTPA が生体内の Ca との錯体形成能も有することと関連すると考えられた。

DTPA の反復投与毒性試験の情報はないが、Ca-DTPA のウサギ及びイヌを用いた 14 日間反復静脈内投与試験及びイヌを用いた 1 ヵ月間反復静脈内投与試験並びに Zn-DTNP のラットを用いた 5 又は 9 日間反復皮下投与試験及びイヌを用いた 19 日間反復皮下投与試験の成績を以て評価した。Ca-DTPA のウサギおよびイヌを用いた 14 日間反復静脈内投与試験では、特記すべき変化は認められなかった。イヌ 1 ヵ月間静脈内反復投与試験では、74.6 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 2521 倍）で AST、ALT、BUN 及びクレアチニンの上昇が認められ、病理組織学的検査で肝細胞の変性、腎臓の近位尿細管でのリンパ球の増加及び小腸粘膜固有層でのリンパ球増加が認められた。以上のことから、Ca-DTPA の過量投与や反復投与により肝臓、腎臓及び消化管が影響を受ける可能性が考えられたが、いずれも休薬により回復性が認められた。Zn-DTPA の反復投与毒性試験では特記すべき変化は認められなかったが、別途評価した安全性薬理試験でラット及びイヌへの静脈内投与による心血管系に及ぼす影響を検討したところ、それぞれ検討に用いた最小用量である 313.6 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 10087 倍）及び 156.8 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 5043 倍）で、血圧等に影響が認められた。このことから、心血管系が Zn-DTPA の毒性標的器官と考えられたが、これらは Ipilimumab 製剤の投与による DTPA の予測投与量を大きく超える投与量における変化であった。また、DTPA を添加物として含む製剤を用いたサルの重要な反復毒性試験の一部として実施した心血管系の評価では、投与に関連した変化は認められなかった。

DTPA の遺伝毒性については、Ca-DTPA のヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換試験の成績を以て評価した。その結果、高用量では分裂中期の細胞が認められず、中用量で SCE の有意な増加を認めたものの、その程度は他の変異原陽性物質（10^{-6} M のキナクリンマスタードで誘導される SCE = 121.1/cell）と比較してわずかであり、Ca-DTPA が染色体構造異常を誘導する可能性は限定的で、主要な毒性作用とは考えられなかった。更に、Ca-DTPA の最も投与期間の長い試験として報告されている週 2 回 44 週間反復腹腔内投与試験において、腫瘍病変等は報告されていない。

DTPAの生殖発生毒性については、Ca-DTPAのラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びイヌ胚・胎児発生に関する試験及びマウス出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験、Zn-DTPAのラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、マウス及びラット胚・胎児発生に関する試験及びマウス出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験の成績により評価した。

Ca-DTPA は、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験で生殖能及び初期胚発生に影響を及ぼさなかったが、ラットにおける胚・胎児発生に関する試験では妊娠期間初期の曝露で胚吸収や胎児死亡が増加し、妊娠中期から後期の曝露では脳や骨等での奇形がみられた。イヌでは、1 用量のみ実施した 14.9 mg/kg の静脈内投与で影響を認めており、無毒性量は確立していないが、ラットにおいては 14.3 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 483 倍）の腹腔内投与が胚・胎児発生に関する無毒性量と報告されている。

Zn-DTPA は、マウスにおける 6010.6 及び 6021.0 mg/kg の皮下投与により、胚吸収の増加、出生児体重の低下などを認めている。しかし、同試験では、3005.3 及び 3010.5 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 96662 倍及び 96829 倍）の用量では特記すべき所見を認めていない。ラットでは 960.0 mg/kg の腹腔内投与により胎児における水腎症の発生増加を認めている。同試験ではその他、960.0 mg/kg 投与群の胎児の 1 例で心室壁非薄化、120.0 mg/kg 投与群の胎児の 1 例で水頭症をそれぞれ認めたのみで、15.0 mg/kg 群（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 482 倍）では特記すべき所見を認めていない。また、皮下投与による 564.5 mg/kg（投与量比として Ipilimumab 製剤中 DTPA の 18156 倍）までの投与では、特記すべき所見を認めていない。

以上より、DTPAの毒性はその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[24]。

以上の評価結果から、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、安全性は確認されたものと判断した。

9 考察

Ipilimumab の長期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。最長 6 ヵ月間のサルにおける反復投与毒性試験では Ipilimumab 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、薬理学的試験（サル 3 ヵ月間間歇静脈内投与探索的毒性・生物活性試験及びサル 4 ヵ月間間歇静脈内投与薬理試験）において、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 Ipilimumab を 10 mg/kg の用量で月 1 回又は 2 回の頻度で投与した各 1 例に認められた。大腸炎を示した例は安楽死させたが、BMS-663513（抗 CD137 完全ヒト型モノクローナル抗体）との併用投与で発疹を示した例には抗ヒスタミン剤とステロイド剤による治療を施し、症状は投与終

了後 4 ヵ月間以内に回復した。これらの毒性所見は irAE と考えられ、CTLA-4 阻害作用による予測された変化であり臨床試験における腫瘍治療効果に関連する変化と考えられた。1 ヵ月間試験（週 1 回計 4 回投与）における Ipilimumab と MDX-1106（抗 PD-1 抗体）の併用投与では、それぞれ 3 mg/kg 以上及び 10 mg/kg 以上の用量で同様の irAE（下痢、摂餌量減少及び体重減少を伴う大腸の炎症性変化、脾臓の濾胞及び辺縁帯の拡張、脾臓及びリンパ節の胚中心減少）の発現頻度が増加したが、これらの所見はそれぞれの単剤において同様の用量で認められている変化であり、概して両剤の免疫賦活作用によるものと考えられた。更に、4 ヵ月間薬理試験で 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月 2 回反復併用投与した 1 例で Day 58 に、Ipilimumab 投与約 5 分後の infusion reaction が認められた。約 5 ヵ月後、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惹起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。

Ipilimumab の全身曝露は概して用量比を上回って増加し、投与間隔（約 3 日～28 日）より長い半減期（最大約 13 ± 4 日）のために蓄積する傾向を示した。Ipilimumab の薬物動態に性差はみられず、プロセス A 又は B 及びプロセス B 又は C で製造した Ipilimumab の薬物動態及び毒性学的プロファイルに差はなかった。Ipilimumab はサルで顕著な免疫原性を示さず、ADA 陽性反応率は約 8%であった。Ipilimumab を MDX-1106 と併用した場合、陽性反応率は比較的高かった（32%）。ADA の存在は Ipilimumab の速やかな消失に関連すると考えられた。

2 週間、1 ヵ月間、3 ヵ月間（79 日間）及び 6 ヵ月間投与毒性試験における曝露量を臨床用量におけるヒト曝露量と比較した（表 9-1）。

表 9-1: 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)	C max (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（週 1 回×4 週間）[e]	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、最終投与後の雌雄合計平均値（T は AUC 算出の期間）。

[b] ヒトの 3 週間曝露に換算。

[c] 予定臨床用量 3 mg/kg（3 週間に 1 回）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

非臨床試験成績より、サルにおける最も一般的な毒性変化は Ipilimumab に関連する irAE と予測されたが、ヒトとサルで組織結合プロファイルは同様であり、曝露量も同等であるにもかかわらず、サルにおける irAE の発現頻度はヒトよりも低かった。

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における Ipilimumab 投与に関連した irAE が報告されている。比較的よくみられた irAE は皮膚及び消化管の irAE であり、サルにおいても同様に認められた。また、最も多く報告されている重篤な irAE は下部消化管に関するものであり、臨床症状として下痢が認められた。Ipilimumab は GALT に発現した CTLA-4 と結合することがサル及びヒトの組織を用いた結合性試験で確認されており、これらのリンパ球（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。更に、MDX-1106 はヒト組織を用いた結合性試験で GALT に結合することが報告されており、Ipilimumab との併用でサルにおける毒性が増加したことに関与していると考えられた。臨床で報告されている事象の大部分では、大腸炎の症状をステロイド剤の使用などで抑制することが可能であった。これらの irAE（特に重篤な症状）は、T 細胞の調節における CTLA-4 の主要な機能に基づき予測された Ipilimumab の抗腫瘍作用に関連したものと考えられた。その他、臨床試験で報告された比較的少数の irAE として、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、肺炎、髄膜炎、膵炎及び腎炎などが認められたが、これらに類似した症状はサルの毒性試験では認められなかった。

*In vitro*試験結果より、CTLA-4 の直接的な架橋が細胞周期の進行、サイトカインの放出及び細胞増殖を妨げる一方で、（Ipilimumabのような）可溶性抗CTLA-4 モノクローナル抗体はT細胞の活性を亢進することが示された [25,26,27,28]。サルの毒性試験では、Ipilimumabの投与により抗原（SK-mel細胞、HBsAg及びKLH）に対するTDARが亢進（全試験を通して対照群の 2～7 倍）することが示された。免疫寛容を生じる条件下でのペプチドワクチン接種により、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 がアネルギーの誘導に活発に関わっていることを示唆していた [29]。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 [30]。現在までの知見を薬理試験の概要文【モジュール 2.6.2】に詳述した。サル 3 ヵ月間間歇投与毒性・生物活性試験（10 mg/kg、q4w×3）では、Tregに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 [31,32,33]。しかし、IpilimumabによるCTLA-4 の機能阻害は、T細胞サブセットの変化、*ex vivo*又は*in vitro*での非特異的なT細胞活性化及び増殖、サル反復投与試験における全身性の多臓器自己免疫病変を惹起しなかった。更に、投与間隔の短いサル 1 ヵ月間試

験（10 mg/kgを週 1 回、計 4 回）においてANA量に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 抗体は自己免疫反応を増大させた [34]。Ipilimumab投与に関連して認められたirAEは、その薬理作用であるCTLA-4 阻害作用が関与していると考えられたが、進行期悪性黒色腫患者においてはこれらの症状は概して管理可能と考えられた。

静脈内投与された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を引き起こす infusion reaction を誘導する可能性を持っている。4 ヵ月間薬理試験で Ipilimumab を急速静脈内投与した 1 例のサルにみられた 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抗 Ipilimumab 抗体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、投与速度を下げることにより改善された [1]。蛋白製剤の免疫原性により infusion reaction が生じ、特に投与速度が早い場合は高率に発現することが知られており [6,7]、ケタミンのような麻酔薬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症状を引き起こす可能性が示唆されている [2,3,4,5]。更に、約 5 ヵ月後に実施した投与速度を制御したワクチン接種を伴わない Ipilimumab 単独投与による再惹起では、同様に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 infusion reaction は惹起されなかった。したがってこの反応の発現は ADA 存在下での急速静注又は SIV DNA ワクチンの投与に起因する可能性が考えられた。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 匹）では認められなかった。臨床試験における投与時間 90 分の Ipilimumab 投与で infusion reaction が認められた例は 5%未満であった。更に、Ipilimumab を単剤又は BMS-663513 又は MDX-1106 と併用した複数の提供者から採取したヒト PBMC に曝露し *in vitro* における細胞増殖及びサイトカイン放出を評価した試験で、Ipilimumab は軽微な細胞増殖作用及び無作用～軽微な選択的サイトカイン放出を誘導したのみであった。したがって、この動物で認められた反応の原因は明らかではないが、本反応は Ipilimumab の直接的な影響又は標的受容体（CTLA-4）への結合による影響ではないと考えられた。

組織結合性試験では、Ipilimumab は正常ヒト組織又はカニクイザル組織及びその両方の組織中（扁桃腺、消化管、リンパ系組織、肺、腎臓、肝臓、皮膚及び末梢血）の活性化されたリンパ球に発現した CTLA-4 に特異的に結合した。更に、Ipilimumab はヒト及びカニクイザルの胎盤の結合組織及びカニクイザルの卵巣の結合組織に特異的に結合し、ヒトの卵巣には特異的に結合しなかった。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リンパ球上に一過性に発現するという報告と一致した [10]。Ipilimumab はマウス、ラット及びウサギのリンパ系組織には特異的な結合を示さなかった。

カニクイザルの ePPND 試験では、妊娠サルに Ipilimumab を 21 日間隔で妊娠初期の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。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 ヵ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。

ヒトにおける早期陣痛の最大の原因の一つは炎症性サイトカインの放出である [11,12,13,14,15]。早期陣痛では、感染症のない状態で可溶性 IL-2 受容体濃度の増加が認められる。また、母体 - 胎児接点においてホルモン - サイトカインネットワークは胚盤胞の着床及び妊娠の維持に重要な役割を担っていることが示唆されている。ヘルパーT 細胞（Th）1 と Th2 による相反するサイトカインの放出が妊娠の転帰に関与していると考えられており、マウスでは母動物 - 胎児接点におけるサイトカイン産生が Th1 型から Th2 型に切り替わることが妊娠の維持に関与していることが報告されている [15]。更に、Th2 型サイトカイン（IL-4 及び IL-10）の産生及び白血球抑制因子（LIF）の局所的な発現不全と、妊娠損失との間に関連性がある可能性が報告されている [14]。妊娠期間中に免疫抑制作用を示すことが知られているプロゲステロンは、母動物 - 胎児接点における Th2 への切り替えに少なくとも部分的に関与していると考えられる。Th2 から産生される IL-4 は子宮内膜への着床と胚の発達に必要とされる LIF の T 細胞における産生を亢進する。IL-4 及び IL-10 は Th1 及びマクロファージの機能を抑制することにより、同種移植の拒絶反応を阻害する。本ネットワークの障害が胎児死亡の原因となると考えられる [11]。したがって、母動物 - 胎児接点の病理学的及び免疫学的な裏付けはないものの、Ipilimumab 投与による局所環境での Th1 及び Th2 サイトカインバランスの変化が妊娠損失に関与していると推察された。

早期陣痛における胎盤の炎症は、Ipilimumabが正常ヒト及びカニクイザル組織を用いた組織結合性試験において、活性化リンパ球に発現したCTLA-4 だけでなくヒト及びカニクイザルの胎盤結合組織に特異的結合を示したため、Ipilimumabの標的であるCTLA-4 の関与との関連性が考えられる。また、CTLA-4 蛋白が胎盤の線維芽細胞に発現していることが報告されている[8,9]。しかし、胎盤に発現しているCTLA-4 の機能については明らかでなく、CTLA-4 の発現が細胞内部かIpilimumabの結合により生物学的作用を示すと推定される細胞表面のいずれかについても明らかでない[8]。更に、胎児・出生児死亡を認めた母動物の胎盤（0、10 及び 30 mg/kg群のそれぞれ 4、5 及び 6 例並びに無処置対照の 3 例）及び臍帯（0、10 及び 30 mg/kg群のそれぞれ 0、1 及び 2 例）について病理組織学的検査を実施した結果、Ipilimumab投与に関連した炎症性変化は認められなかった。また、中等度又は顕著な胎盤の梗塞が対照群及び投与群のいずれにも認められ、これらの変化は広範囲の絨毛の損傷による胎児死亡との関連性が疑われたが[35,36]、Ipilimumab投与との関連性はないと考えられた。中等度又は顕著な胎盤の梗塞は、2 例に認められた偶発的な臍帯の捻転と関連したものと考えられた。流産・死産胎児の外表、内臓、心臓及び病理組織学的検査所見にはIpilimumab投与に関連した影響は認められなかった。したがって、胎盤におけるCTLA-4 の発現及びePPND試験の投与期間に相当する時期におけるIpilimumabのカニクイザル及びヒト胎盤組織への結合の可能性を、ePPND試験の妊娠第 3 三半期で認められた胎児死亡及び新生児死亡と明確に関連付けることはできないが、完全に否定することもできなかった。

病理組織学的検査で間質の出血が認められたことから、胎児死亡の 1 例に臍帯の狭窄が関連している可能性が考えられた。10 mg/kg群の母動物 1 例（妊娠 143 日に死産）に子宮の急性炎症が認められたが、胎盤の一部が滞留したことに関連した変化であり分娩後に生じたものと考えられた。その他の子宮の所見は、その発生頻度に関わらずいずれも正常な子宮の退縮に伴うものであった[37,38,39,40,41]。しかしながら、本試験では妊娠第 3 三半期の妊娠損失、妊娠期間の短縮、早産及び出生児の死亡が認められ、Ipilimumabの作用機序（CTLA-4 の阻害による免疫賦活化）及び標的分子が胎盤に局所的に発現していることから、胎児及び出生児の死亡の増加はIpilimumabの薬理作用と関連している可能性が高いと考えられた。

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形成不全、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 ヵ月まで対照群を上回り、生後 6 ヵ月では 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、外部形態測定、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 ヵ月まで 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[31,32,33]。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 ヵ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、Ipilimumabを投与した合計 100 例以上のカニクイザルにおいて、10 mg/kgを月 1 回静脈内投与した薬理試験で 2 回目の投与後に大腸炎により 1 例を安楽死させ、10 mg/kgを他の免疫調節抗体及びSIV DNAワクチンと併用しておおよそ月 2 回投与（投与日：Day 4、9、30、32、58、60、86 及び 88）した試験で 3 ヵ月間の投与終了 4 週間後に鼠径部の皮膚炎・発疹及び末梢リンパ節腫脹が 1 例に認められた。これらのirAEは臨床試験で報告されている症状と類似しており、Ipilimumabの薬理作用に一致する変化と考えられた。上記の 2 例以外では、Ipilimumabを最高用量 30 mg/kgで 1 週間（3 日に 1 回、3 回投与）、10 mg/kgを週 1 回 1 ヵ月間（4 回投与）、1 mg/kgを週 1 回 10 週間（10 回投与）及び 10 mg/kgを月 1 回最長 6 ヵ月間投与した試験において、有害な毒性変化は認められなかった。また、妊娠サルの器官形成期から分娩まで、10 及び 30 mg/kgの用量（3 mg/kgを 21 日間隔で投与したヒトAUCのそれぞれ 3.2 倍及び 7.3 倍に相当）で 3 週間に 1 回投与した結果、選択的な発生毒性が認められた。母動物では、10 mg/kg以上で薬理作用に関連した血清中免疫グロブリン濃度の上昇が妊娠第 3 三半期に認められたのみであり、30 mg/kgでは妊娠期間の短縮が認められた。出生児においては、妊娠第 3 三半期後期の流産及び死産の増加、早産及び出生児体重の減少が認められた。サル生殖毒性試験の結果に基づき、Ipilimumabの妊婦及び妊娠可能な女性への使用は、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。これらの非臨床毒性試験の結果は、臨床における進行期悪性黒色腫患者を対象としたIpilimumab 3 mg/kgの静脈内投与治療の安全性を担保するものである。

10 参考文献

[1] Misbah SA, Chapel HM. Adverse effects of intravenous immunoglobulin. Drug Safety. 1993; 9(4):254-262.

[2] Soetens FM. Anaphylaxis during anaesthesia:diagnosis and treatment. Acta Anaesthesiol Belg. 2004; 55(4):229-237.

[3] Mertes PM, Laxenaire MC. Allergic reactions occurring during anaesthesia. Eur J Anaesthesiol. 2002; 19(4):240-262.

[4] 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.

[5] Ochsner AJ. Cardiovascular and respiratory responses to ketamine hydrochloride in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Lab Anim Sci. 1977; 27(1):69-71.

[6] 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 alpha inhibitor infliximab. Arthritis Rheum. 2006; 54(12):3782-3789.

[7] Mayer L, Young Y. Infusion reactions and their management. Gastroenterol Clin N Am. 2006; 35:857-866.

[8] Kaufman KA, Bowen JA, Tsai AF, et al. The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts. Mol Hum Reprod. 1999; 5(1):84-87.

[9] Tsai AF, Kaufman KA, Walker MA, et al. Transmission disequilibrium of maternally-inherited CTLA-4 microsatellite alleles in idiopathic recurrent miscarriage. J Repro Immunol. 1998; 40:147-157.

[10] 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.

[11] Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, et al. 2007. The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. Seminars in Reproductive Medicine. 25(1): 21-39.

[12] Kemp MW, Saito M, Newnham JP, et al. 2010. Preterm Birth, Infection, and Inflammation Advances From the Study of Animal Models. Reprod Sci. 17(7):619-628.

[13] Muglia LJ and Katz M. 2010. The Enigma of Spontaneous Preterm Birth. N Engl J Med. 362: 529-535.

[14] Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, et al. 2000. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. J of Neuroimmunology. 109(1):30-33.

[15] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, et al. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_H2 phenomenon? Immunol. Today. 14:353–356.

[16] Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, et al. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. Immunity. 1996; 4(6):535-543.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] ジトリペンタートカル静注1000 mg／アエントリペンタート静注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).

[22] Srivastava RC, Dwivedi PP, Behari JR, et al. Evaluation of LD50 of some polyaminocarboxylic acids used as chelating drugs in metal intoxication. Toxicol Lett. 1986; 32:37-40.

[23] Tandon SK, Srivastava L. Chelation in metal intoxication XVII: Antidotal efficacy of polyaminocarboxylic acids on acute chromate toxicity. Arch Toxicol. 1985; 57:212-213.

[24] 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.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 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.

[28] 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.

[29] Perez VL, Parijs LV, Biuckians A, et al. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. Immunity. 1997; 6(4):411-417.

[30] 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.

[31] 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.

[32] 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.

[33] 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.

[34] 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.

[35] Bunton TE. Incidental lesions in nonhuman primate placentae. Vet. Pathol 23:431-438, 1986.

[36] Joshi V. Handbook of Placental Pathology. IGAKU-SHOIN, 1994.

[37] Anderson WR, Davis J. Placental site involution. Am J Obstet Gynecol. 102:23-33, 1968.

[38] Sharman A. Post-partum regeneration of the human endometrium. J Anat. 87:1-14, 1953.

[39] Sternberg SS. Histology for Pathologists. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1997.

[40] Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 5th ed. Springer, 2002.

[41] Cullen TS. Cancer of the Uterus – Its Pathology, Symptomatology, Diagnosis, and Treatment, also The Pathology of Diseases of the Endometrium. D. Appleton and Company, 1900.

[42] Alegre ML, Shiels H, Thompson CB, et al. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. J Immunol. 1998; 161(7):3347-3356.

[43] Vandenborre K, Delabie J, Boogaerts MA, et al. Human CTLA-4 is expressed in situ on T lymphocytes in germinal centers, in cutaneous graft-versus-host disease, and in Hodgkin's disease. Am J Pathol. 1998; 152(4):963-973.

[44] Xerri L, Devilard E, Hassoun J, et al. In vivo expression of the CTLA4 inhibitory receptor in malignant and reactive cells from human lymphomas. J Pathol. 1997; 183(2):182-187.

CTD 第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

ブリストル・マイヤーズ株式会社

Table 2.6.7.1 Toxicology: Overview **Test Article:** Ipilimumab[b]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No./ Document Control Number	Location in Dossier
Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 4, 7 Necropsy Day 14	3	No	[redacted]	126-002/ 930009967	4.2.3.2-1
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 4, 7 Necropsy Day 14	3, 10	Yes[c]	[redacted]	[redacted]-0919-128/ 930009982	4.2.3.2-2
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 4, 7 Necropsy Day 14	3, 30	Yes[d]	[redacted]	7114-100/ 930009970	4.2.3.2-3
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 8, 15, 22 Necropsy Days 24 and 91/92	0, 10[f]	Yes[g]	Bristol-Myers Squibb	DS06064/ 930021064	4.2.3.2-4
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 29 Necropsy Day 64	0[e], 10	No	[redacted]	[redacted]-0992-128/ 930009968	4.2.3.2-5
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 29, 57, 140 Necropsy Day 154	0, 10	No	[redacted]	SUV00006/ 930021733	4.2.3.2-6
Repeat Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 4, 9, 30, 32, 58, 60, 86, 88	0, 10[h]	No	Bristol-Myers Squibb	TIB-06-001/ 930022368	4.2.1.1-9
	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 0, 28, 56, 84, 140 Necropsy Day 167/168	0, 10	Yes[i]	[redacted]	01-3460/ 930009980	4.2.3.2-8

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.1 Toxicology: Overview **Test Article:** Ipilimumab[b]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No./ Document Control Number	Location in Dossier
Reproductive and Developmental Toxicity Studies	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Once every 3 weeks to pregnant monkeys starting on GD20-22 through parturition	0, 10, 30	Yes[p]	[redacted]	DN10020/ 930056635	4.2.3.5.3-1
Combination Toxicity Studies	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 8, 15, 22 Necropsy Days 30 and 59	3/10, 10/50 Ipilimumab/MDX-1106[q]	Yes	[redacted]	[redacted]00106/ 930036346	4.2.3.7.7-2
Product Comparability/ Single-Dose Studies	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	1 day	10 Process B[k] Process C[l]	No	Bristol-Myers Squibb	DS07167/ 930032302	4.2.3.7.7-1
Product Comparability/ Repeat-Dose Toxicity Studies	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Once monthly for 3 months Necropsy Day 79	10 MDX-[redacted][m] 0, 0.1, 1, 10 MDX-[redacted][n]	Yes[o]	[redacted]	[redacted]-1416-128/ 930009973	4.2.3.2-7
			Once weekly for 10 weeks Necropsy Day 79	1 MDX-[redacted][n]				

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.1 Toxicology: Overview **Test Article:** Ipilimumab[b]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No./ Document Control Number	Location in Dossier
Tissue-binding Studies	Human	In vitro	1 hr[j]	2.5, 10 µg/mL fluoresceinated MDX-010	Yes[d]	[redacted]	[redacted]578/ 930009993	4.2.3.7.7-3
	Human	In vitro	1 hr[j]	2, 10 µg/mL fluoresceinated MDX-010	Yes[d]	[redacted]	[redacted]933/ 930010006	4.2.3.7.7-4
	Mouse/CD-1, Rat/SD, Rabbit/ New Zealand White, Monkey/ Cynomolgus, Human	In vitro	30 min[j]	1, 10 µg/mL biotinylated MDX-010	Yes[d]	Bristol-Myers Squibb	DS05067/ 930021297	4.2.3.7.7-5
Cytokine Release Studies	Human	In vitro	6 and 24 hr for cytokine release assessment[j] 66 hr for proliferation assessment[j]	0, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10, or 50 µg/well for dry coat assay[r,s] 0.08, 0.4, 2, 10, and 50, and 250 µg/ml for antibody capture assay[r,s] 2 µg/well IgG1 isotype control for dry coat assay 0.4 µg/mL IgG1 isotype control for antibody capture assay	No	Bristol-Myers Squibb	930034490/ 930034490	4.2.3.7.7-6

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.1 Toxicology: Overview **Test Article:** Ipilimumab[b]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No./ Document Control Number	Location in Dossier
Cytokine Release Studies	Human	In vitro	4 or 24 hr[j]	0, 10, 100 μg/mL[t,u] 100 μg/mL IgG1 isotype control + 100 μg/mL IgG4 isotype control	No	Medarex	MDX-1106/010-008-R / 930036361	4.2.3.7.7-7

[a] Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the highest NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.

[b] Ipilimumab is also referred to in individual toxicology studies as MDX-010, MDX-CTLA4, human anti-CTLA4, anti-CTLA4/10D1, mAb10D1, and BMS-734016.

[c] The analysis of pharmacokinetic, antibody, and flow cytometry samples was not conducted under GLP regulations. The characterization of MDX-010 was conducted under GMP rather than GLP regulations.

[d] The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations. Also, this study was conducted in compliance with GLP regulations, with the exception of the determination of the content and stability of biotinylated/fluoresceinated ipilimumab.

[e] Control animals received 10 mg/kg of an isotype-matched control human IgG (MAbRSV) specific for respiratory syncytial virus.

[f] An additional group received ipilimumab at 10 mg/kg in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody) intravenously at 100 mg/kg.

[g] The phenotypic analysis of peripheral-blood natural killer (NK) cells was not fully validated. The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.

[h] An additional group received ipilimumab at 10 mg/kg in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody) intravenously at 10 mg/kg.

[i] Biopsy evaluations by Pathology Associates International, immunological assays, and pharmacokinetic assays were not conducted under GLP regulations. The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.

[j] Duration of incubation with ipilimumab.

[k] Process B ([redacted]).

[l] A process of utilizing [redacted] and modifications to [redacted] processes.

[m] [redacted] (Process A).

[n] [redacted] ipilimumab (Process B, development grade).

[o] Preparation, characterization and/or analysis of the SKMel vaccine and the HBsAg vaccine, immunologic assays were not conducted under GLP Regulations. The characterization of ipilimumab and ipilimumab-[redacted] was conducted under GMP rather than GLP regulations.

All footnotes are available as table end notes.

[p] Exceptions to GLPs included the following study elements: Characterization and stability testing of the test article was performed in compliance with the Good Manufacturing Practice (GMP) regulations (21 CFR Part 211), the milk toxicokinetic (TK) analysis was performed using a qualified non-GLP assay, the monkey chorionic gonadotropin (mCG) assay was conducted non-GLP by [redacted] microbiological culture of amniotic fluid or other tissues collected were performed in a non-GLP regulated environment by [redacted]. In addition, a partial validation of the flow cytometry method using the CD45/CD4/CD8/CD25/FoxP3 antibody panel in cynomolgus monkey blood (EDTA) was conducted at [redacted] Study No. I-000059. The method was previously validated at [redacted] (Study Nos. 27491 and 27842) in cynomolgus monkey blood (EDTA). A partial validation was also conducted to obtain total lymphocyte counts determined using BD TruCount™ tubes which was previously validated at [redacted] (Study No. 27491). The partial validation was performed concurrent and an approved method was not available at study initiation. The results of the partial validation indicated the methods were valid.

[q] All animals received ipilimumab in combination with MDX-1106, an immunostimulatory anti-PD-1 monoclonal antibody. There were no single agent arms in this study.

[r] Ipilimumab was tested alone (with a control IgG4 isotype antibody) or in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody). The mouse anti-human superagonistic CD28 mAb 5.11A1 (TGN1412 is the IgG4 humanized version of 5.11A1) was also used as a positive control and comparator in these assays at the same concentrations as the test mAbs.

[s] Two immobilization assays were conducted, a dry-coat assay and a captured mAb assay. In the dry coat assay, test mAb (alone or in combination) was immobilized by dry coating it directly to the plates whereas in the captured mAb assay, the test mAb was immobilized by binding to anti-human immunoglobulin previously applied to the plates.

[t] Ipilimumab was tested alone or in combination with MDX-1106 (immunostimulatory anti-PD-1 monoclonal antibody). The mouse anti-human CD3 mAb UCHT-1 was also used as a positive control and comparator in these assays at the same concentrations as the test mAbs.

[u] Test mAb was added in soluble (nonimmobilized) format (alone and in combination) to whole blood in the absence of exogenous antigenic stimuli.

Table 2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies **Test Article:** Ipilimumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study No./ Document Control Number	Location in Dossier
Repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	3, 10	Yes	[redacted]-0919-128/ 930009982	4.2.3.2-2
Repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	3, 30	Yes	7114-100/ 930009970	4.2.3.2-3
Repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 10[a]	Yes	DS06064/ 930021064	4.2.3.2-4
Repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	0[b], 10	No	[redacted]-0992-128/ 930009968	4.2.3.2-5
Repeat-dose toxicity[c]/ product comparability	Cynomolgus monkey	Intravenous	Process A: 10 (monthly) Process B: 0, 0.1, 1, or 10 (monthly) 1 (weekly)	Yes	[redacted]-1416-128/ 930009973	4.2.3.2-7
Repeat-dose toxicity/ pharmacology	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 10	No	SUV00006/ 930021733	4.2.3.2-6
Repeat-dose toxicity/ pharmacology	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 10[d]	No	TIB-06-001/ 930022368	4.2.1.1-9
Repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 10	Yes	01-3460/ 930009980	4.2.3.2-8
Reproductive and developmental toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 10, 30	Yes	DN10020/ 930056635	4.2.3.5.3-1

[a] An additional group received ipilimumab at 10 mg/kg in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody) intravenously at 100 mg/kg.

[b] Control animals received 10 mg/kg of an isotype-matched control human IgG (MAbRSV) specific for respiratory syncytial virus.

[c] Samples collected after the first dose but prior to the second dose were also used to calculate single-dose pharmacokinetic values.

[d] An additional group received ipilimumab at 10 mg/kg in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody) intravenously at 10 mg/kg.

Table 2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data **Test Article:** Ipilimumab

Dose (mg/kg)	Monkeys			Humans[a]		
	Cmax (µg/mL)	AUC (0-T) (µg•hr/mL)	AUC (3 weeks)[b] (µg•hr/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC (0-T) (µg•hr/mL)	AUC (3 weeks) (µg•hr/mL)
10 IV	339 486[c]	31,600[d] 47,800[e]	94,800[f] 35,850[g]	100[c]	15,654 (0-21 d)	15,654
30 IV[h]	817[i] 890[j]	115,000[i,k] 146,000[j,k]	115,000[i] 146,000[j]	-	-	-

[a] Sources of human data were Study MDX010-15 (n=13) and Study CA184007/CA184008 (n=16) and are based on normalization of mean human values for Cmax and AUC (0-21d) at steady state at 10 mg/kg (after 4th dose for MDX010-15 and 3rd dose for CA184007/008) to a dose of 3 mg/kg. Patients received ipilimumab at 10 mg/kg during Weeks 1, 4, 7, and 10.

[b] AUC normalized for 3 weeks of exposure in humans, where necessary.

[c] Sample collected ~24 hours following last dose.

[d] Values for monkeys receiving ipilimumab alone or in combination with another immunomodulatory antibody were combined as there was no effect of the combination therapy on the PK of ipilimumab. T=7 days.

[e] Values for monkeys receiving Process A and Process B were combined as there were no differences in PK parameters between processes (n= 12). T= 28 days.

[f] AUC (0-T), where T=7 days, was multiplied by 3 to normalize for 3 weeks of exposure; exposures were determined after the 4th dose in a 1-month, once weekly, intravenous study in monkeys (Study DS06064).

[g] The AUC (INF) after the dose on Day 1, which is equivalent to the AUC (0-T) where T=28 days, at steady state, from the 79-day study (Study 1416-128) was multiplied by 0.75 to normalize for 3 weeks of exposure.

[h] Data obtained from pregnant monkeys on Gestation Days 125-127 (monkeys were dosed every 3 weeks from GD20-22 until parturition).

[i] Values reported are with inclusion of animals with sustained positive serum anti-ipilimumab antibodies.

[j] Values reported are with exclusion of animals with sustained positive serum anti-ipilimumab antibodies.

[k] T= 21 days.

Abbreviations: IV = intravenous, AUC(0-T) = area under the plasma concentration-time curve during the dosing interval, Cmax = maximum observed plasma concentration.
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.4 Toxicology Drug Substance **Test Article:** Ipilimumab

Batch No.	Protein[a] mg/mL	Protein[b] mg/vial	Comments	SDS PAGE[c, d]	Type of Study	Study No./ Document Control Number
[redacted]-16	5	25	Research Lot used as a reference standard	Equivalent	Repeat-dose toxicity	126-002/ 930009967
[redacted]-01[redacted]	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-01[redacted]; Process A)	Equivalent	Repeat-dose toxicity	[redacted]-0919-128/ 930009982
[redacted]-01[redacted]	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-01[redacted]; Process A)	Equivalent	Repeat-dose toxicity	7114-100/ 930009970
[redacted]544 ([redacted]004)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]229; Process B [redacted]-L)	Equivalent	Repeat-dose/combination toxicity	DS06064/ 930021064
[redacted]-01[redacted]	5	25	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-01[redacted] Process A)	Equivalent	Repeat-dose toxicity	[redacted]-0992-128/ 930009968

Abbreviations: SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, N/A = not applicable, ND = not determined.

Table 2.6.7.4 **Toxicology Drug Substance** **Test Article:** Ipilimumab

Batch No.	Protein[a] mg/mL	Protein[b] mg/vial	Comments	SDS PAGE[c, d]	Type of Study	Study No./ Document Control Number
[redacted]001	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-01[redacted]; Process A)	Equivalent	Repeat-dose toxicity/ product comparability	[redacted]-1416-128/ 930009973
[redacted]-01[redacted]	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-03[redacted] Process B - [redacted]-L scale)			
[redacted]-05[redacted] ([redacted]895)	5	25	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-04[redacted]; Process B [redacted]-L)	Equivalent	Repeat-dose toxicity/ pharmacology	SUV00006/ 930021733
[redacted]359 [redacted]530)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]518; Process B [redacted]-L)	Equivalent	Repeat-dose toxicity/ pharmacology	TIB-06-001/ 930022368
[redacted]-01[redacted]	7.9	79	Process A Drug Substance	Equivalent	Repeat-dose toxicity	01-3460/ 930009980
[redacted]001	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]-01[redacted] Process A)			

Table 2.6.7.4 **Toxicology Drug Substance** **Test Article:** Ipilimumab

Batch No.	Protein[a] mg/mL	Protein[b] mg/vial	Comments	SDS PAGE[c, d]	Type of Study	Study No./ Document Control Number
[redacted][e]	3.4	N/A	[redacted]	ND	Tissue-binding study	[redacted]578/ 930009993
[redacted]-03[redacted][e]	0.9	N/A	Drug Substance Process B - [redacted]-L scale	ND	Tissue-binding study	[redacted]933/ 930010006
[redacted]544[f] ([redacted]004)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]229; Process B [redacted]-L)	Equivalent	Tissue-binding study	DS05067/ 930021297
[redacted]-01[redacted] ([redacted]248)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]430; Process B [redacted]-L)	Equivalent	Combination repeat-dose toxicity	[redacted]00106/ 930036346
[redacted]887 ([redacted]703)	5	200	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]194[redacted] Process B [redacted]-L	Equivalent	Product comparability/ single-dose	DS07167/ 930032302
[redacted]S29[redacted] ([redacted]W04[redacted])	5	N/A	(Drug Substance Process C - [redacted]-L scale)	Equivalent		
[redacted]407 ([redacted]871, [redacted]626)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]477; Process B [redacted]-L)	Equivalent	In vitro cytokine release	930034490/ 930034490

Abbreviations: SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, N/A = not applicable, ND = not determined.

Table 2.6.7.4 Toxicology Drug Substance **Test Article:** Ipilimumab

Batch No.	Protein[a] mg/mL	Protein[b] mg/vial	Comments	SDS PAGE[c, d]	Type of Study	Study No./ Document Control Number
[redacted]-03[redacted] ([redacted]379)	5	50	Drug Product (Drug Substance Lot [redacted]573; Process B [redacted]-L)	Equivalent	In vitro cytokine release	MDX-1106/010-008-R / 930036361
[redacted]392 ([redacted]105)	5	200	Drug Product (Drug Substance Lots [redacted]255 and [redacted]262; Process C [redacted]-L)	Equivalent	Reproductive and developmental toxicity	DN10020/ 930056635

[a] Protein content (mg/mL) at A280 for drug substance. Target concentration is reported if result within ± 10%.

[b] Protein content (mg/vial) at A280 for lyophilized drug product (% of label claim adjusted for fill volume).

[c] SDS-PAGE: Reduced and Non-reduced (Coomassie Blue and Silver stain).

[d] Visually equivalent in band migration pattern to reference material run on the same gel (SDS-PAGE).

[e] Represents fluoresceinated ipilimumab lot.

[f] Lot represents stock lot of ipilimumab prior to biotinylation.

Abbreviations: SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, N/A = not applicable, ND = not determined.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 1, 4, and 7 Necropsy Day 14	3	2 F	3	None	126-002/ 930009967
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Day 1 and Day 29 Necropsy Day 64	10 (Ipilimumab or Negative Control Ab MAbRSV)[a]	2M, 2 F	10	No adverse toxicities occurred. Stimulatory effects on antigen-specific (HBsAg) T cell-dependent antibody response and ex vivo antigen specific intracellular T-cell activation occurred with similar effects as oligo CpG and were consistent with the pharmacologic activity of ipilimumab. No evidence of nonspecific immune-cell activation was observed.	[redacted]-0992-128/ 930009968

DTH = delayed-type hypersensitivity, IM = intramuscular, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, KLH = keyhole limpet hemocyanin
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	(Phase 1) Day 1, 29, 57[b] (Phase 2) Day 140 Necropsy Day 154	10[b]	3 M, 3 F	10	One monkey developed severe colitis (acute to subacute inflammation, crypt abcesses, and erosion of the colon extending into the rectum) after the 2nd dose of ipilimumab and was euthanatized moribund on Day 42. Findings preceding death included persistent diarrhea, inappetance, and body-weight loss with agonal changes of shallow breathing, moderate dehydration, low blood pressure, decreased heart rate and body temperature, azotemia and electrolyte imbalance. Secondary findings included mixed-cell infiltrates in the adrenals, liver, and renal glomeruli, thickened glomerular mesangia, hyperplasia of adrenal cortex, and lymphoid depletion of thymus, spleen, and gut-associated lymphoid tissue. In surviving monkeys, there were no drug-related toxicologic changes. Increased cellular (DTH challenge scores for HBsAg, ~2-fold controls) and humoral (≤~5-fold to SKMel-3 and HBsAg) immune responses, and an increased (≤77%) peripheral-blood CD4 central memory T-cell population were observed in monkeys given ipilimumab.	SUV00006/ 930021733
Monkey/	Intravenous	Once weekly for	3/10, 10/50 Ipilimumab/MD	5 M, 5 F	< 3/10	At both dose combinations (3/10 or 10/50 mg/kg ipilimumab/MDX-1106),	[redacted]00106/

DTH = delayed-type hypersensitivity, IM = intramuscular, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, KLH = keyhole limpet hemocyanin
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Cynomolgus		4 weeks[c]	X-1106[d]			a dose-dependent increase in the incidence of watery feces (accompanied by reduced food consumption and body-weight loss at the high dose); increased spleen weights and decreased thymus weights; partially reversible, dose-related inflammation of the large intestine (colon, cecum, and/or rectum) with secondary decreases in albumin and increases in globulins and neutrophil counts; minimal to mild increases in the size/number of lymphoid follicles and/or marginal zone expansion in the spleen; and minimal to marked decreases in the size and/or cellularity of germinal centers in the spleen and lymph nodes (inguinal, mandibular, mesenteric, colonic, and axillary). At the high combination dosages, highly variable increases in total circulating T-lymphocyte and T-helper lymphocytes and an early death of 1 high-dose male monkey on Day 23 attributed to acute gastric dilatation (bloat). Additional drug-related findings secondary to stress included lymphoid hypocellularity of the cortex and/or medulla of the thymus at both doses and acinar cell degranulation in the pancreas at the high dose only. Effects on the T-cell dependent	930036346

DTH = delayed-type hypersensitivity, IM = intramuscular, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, KLH = keyhole limpet hemocyanin
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
						antibody response to KLH were consistent with the immunostimulatory activity of ipilimumab and MDX-1106. Following KLH administration on Day 10 (2 days after the second weekly dose), an enhancement of the KLH-specific antibody response (IgM or IgG) was observed at both doses to a similar magnitude (1.4x to 2.5x control for IgM on Days 15 and/or 24 and 2.3x to 3.2x control for IgG on Day 24).	
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Days 4, 9, 30, 32, 58, 60, 86, and 88	10 mg/kg Ipilimumab ± 10 mg/kg BMS-663513[e]	4 M, 2 F	10 ± BMS-663513	One monkey receiving ipilimumab at 10 mg/kg developed an infusion reaction while under ketamine sedation immediately after dosing on Day 58 with ipilimumab at 10 mg/kg and SIV DNA vaccines. Approximately 5 minutes after ipilimumab injection and ~2 to 3 minutes following administration of SIV DNA vaccines, the monkey had cyanosis, thready pulse, and muffled heart sounds. The monkey was intubated, administered oxygen, and treated for shock. The monkey stabilized ~45 minutes later. Approximately 5 months later (Day 211), this animal was rechallenged while under ketamine anesthesia with a controlled, timed (3 mL/min) infusion of ipilimumab at 10 mg/kg (without vaccine challenge). Following rechallenge, there were no adverse	TIB-06-001/ 930022368

DTH = delayed-type hypersensitivity, IM = intramuscular, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, KLH = keyhole limpet hemocyanin
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
						clinical signs. Similar reactions have occurred following rapid IV injection of immunoglobulins due to acute cytokine release, and quickly resolve after decreasing the infusion rate. The cause of the infusion reaction and its relationship to ipilimumab are unknown, but is unlikely to be a direct result of ipilimumab binding to its targeted receptor (CTLA-4). A second monkey receiving ipilimumab at 10 mg/kg in combination with BMS-663513 SIV DNA vaccines developed dermatitis/rash in the inguinal area accompanied by peripheral lymphadenopathy on Day 113 (approximately 4 weeks following the last dose of ipilimumab and BMS-663513). Treatment with antihistamine transiently resolved the rash but the rash returned ~ 1 month later and spread to the back of the knees, at which time prednisone treatment was initiated. Skin biopsies obtained from the affected area indicated mild epidermal thickening/proliferation (increased nuclear proliferation antigen Ki67+) with the underlying dermis containing mild perivascular edema and infiltrates of lymphocytes (mostly CD8+), macrophages (CD68+), and mast cells. The rash resolved within ~ 2	

DTH = delayed-type hypersensitivity, IM = intramuscular, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, KLH = keyhole limpet hemocyanin
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies **Test Article:** Ipilimumab

Species/Strain	Method of Administration(Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
						months. No infectious etiology was present in the biopsy sections. These findings were compatible with a DTH reaction. Rash has been observed clinically with both ipilimumab and BMS-663513 and is consistent with the pharmacologic effect of both compounds. The drug regimen was well tolerated by other monkeys on the study.	

[a] Two groups received 10 mg/kg of ipilimumab, both were also adminstered HBsAg, intramuscularly (IM) at 10 μg (0.5 mL) on Days 2 and 30 and one of the groups also received 500 μg oligo CpG added to the HBsAg antigen. Two control groups received an isotype-matched control human IgG antibody specific for respiratory syncytial virus (MAbRSV) at 10 mg/kg on Days 1 and 29, and HBsAg, IM at 10 μg (0.5 mL) in the presence or absence of oligo CpG.

[b] All monkeys received HBsAg and SKMel on Days 1, 29 and 57 (intramuscular and subcutaneous injections, respectively) and DNP Ficoll on Days 1 and 29 (intradermal injection). To evaluate delayed type hypersensitivity (DTH), all monkeys received 0.1 mL each of HBsAg, SKMel and saline by intradermal injection on Day 42.

[c] Although this study was conducted in compliance with GLP regulations, the study was not considered pivotal to support ipilimumab as monotherapy as it did not contain any groups in which ipilimumab was administered alone.

[d] All animals received ipilimumab in combination with MDX-1106, an immunostimulatory anti-PD-1 monoclonal antibody.

[e] All animals received ipilimumab or BMS-663513 alone or incombination with each other. In addition, three SIV DNA vaccines expressing the proteins for the gag (pSIVgag), env (pSIVenv), and pol (pSIVpol) portions of SIV, were administered IM at 2 mg each on Study Days 1, 2, 29, 30, 57, 58, 85, and 86.

Table 2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Report Title: A 2-Week Toxicity Study of Human Anti-CTLA4 Administered by Intravenous Injection to Cynomolgus Monkeys **Study No.** [redacted]-0919-128

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus **Duration of Dosing:** Days 1, 4, and 7 **Document Control Number:** 930009982

Initial Age: ~4 to 7 years **Duration of Postdose:** 7 days **Location in Dossier:** 4.2.3.2-2

Date of First Dose: [redacted] **Method of Administration:** Intravenous

Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline **GLP Compliance:** Yes[e]

Special Features: Lymphocyte subpopulation phenotyping - CD3 (T cells), CD20 (B cells), CD3/CD4 (T-helper cells), CD3/CD8 (T-cytotoxic cells), CD3/CD25 (activated T-cell subset), CD3/CD29 (T cell subset), CD3/CD69 (activated T-cell subset), CD3/HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype)

No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg

Daily Dose (mg/kg):	**3**		**10**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics:				
Mean Serum Levels (μg/mL)				
Predose	0	NA	0	0
Day 4	38.0	NA	120.6	125.0
Day 7	83.9	NA	237.8	241.7
Day 14	79.0[a]	NA	269.2	239.1
Noteworthy Findings				
Died or Sacrificed Moribund	--	NA	--	--
Physical Examinations	--	NA	--	--
Ophthalmic Examinations	--	NA	--	--
Body Weights	--	NA	--	--
Clinical Observations	--	NA	--	--
Hematology	--	NA	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009982 **(Continued)** **Study No.** [redacted]-0919-128

Daily Dose (mg/kg):	**3**		**10**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Serum Chemistry	--	NA	--	--
Coagulation	--	NA	--	--
Urinalysis	--	NA	--	--
Anti-ipilimumab Antibody Response (Number Responding/ Number Evaluated)[b]				
Anti-ipilimumab IgG[c]	1/2	NA	0/2	0/2
Peripheral-Blood Lymphocyte Phenotype Analysis[d]				
% CD3+ (T-cells)				
Predose	58.9	NA	59.0	
Day 7	63.3	NA	66.6	
Day 14	67.1	NA	67.4	
% CD20+ (B-cells)	--	NA	--	
% CD3+expressing CD4 (Helper T-cells)				
Predose	42.1	NA	40.3	
Day 7	47.2	NA	51.3	
Day 14	52.8	NA	56.9	
% CD3+expressing CD8 (Cytotoxic T-cells)				
Predose	43.8	NA	43.6	
Day 7	45.9	NA	43.4	
Day 14	47.3	NA	36.4	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable.
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009982 **(Continued)** **Study No.** [redacted]-0919-128

Daily Dose (mg/kg):	**3**		**10**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
% CD3+ expressing CD25 (Activated T-cell subset)				
Predose	−0.9	NA	−0.7	
Day 7	3.2	NA	4.4	
Day 14	3.3	NA	3.6	
% CD3+ expressing CD29 (T-cell subset)				
Predose	26.3	NA	33.5	
Day 7	54.6	NA	60.7	
Day 14	62.0	NA	67.7	
% CD3+ expressing CD69 (Activated T-cell subset)	--	NA	--	
% CD3+ expressing HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype)				
Predose	4.3	NA	1.7	
Day 7	10.0	NA	11.2	
Day 14	13.3	NA	14.2	
Organ Weights	--	NA	--	--
Gross Pathology	--	NA	--	--
Histopathology	--	NA	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable.
All footnotes are available as table end notes.

[a] The value of one animal was below detectable limit, therefore, the actual value of the remaining animal is shown.

[b] Drug-specific antibodies directed to the ipilimumab $F(ab')_2$ were evaluated using a direct -format ELISA. Titers were determined as the lowest dilution that achieved the background levels established by prestudy controls. A titer/dilution of > 4-fold the prestudy value was considered positive.

[c] The anti-ipilimumab IgG titer for one low-dose male increased from 1:400 prestudy to 1:6400 on Day 14.

[d] Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis was performed on all animals using a flow cytometric method. Relative comparisons were made between individuals and groups of monkeys. Group means (combined sexes at 10 mg/kg) are shown.

[e] The analysis of pharmacokinetic, antibody, and flow cytometry samples was not conducted under GLP regulations. The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Report Title: 14-Day Intravenous Toxicity Study with mAb 10D1 in Cynomolgus Monkeys **Study No.:** 7114-100

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus **Duration of Dosing:** Days 1, 4, and 7 **Document Control Number:** 930009970

Initial Age: ~2 to 8 years **Duration of Postdose:** 7 days **Location in Dossier:** 4.2.3.2-3

Date of First Dose: [redacted] **Method of Administration:** Intravenous

Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline **GLP Compliance:** Yes[d]

Special Features: Lymphocyte subpopulation phenotyping - CD3 (T cells), CD20 (B cells), CD3/CD4 (T-helper cells), CD3/CD8 (T-cytotoxic cells), CD3/CD25 (activated T-cell subset), CD3/CD29 (T cell subset), CD3/CD69 (activated T-cell subset), CD3/HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype)

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg

Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics:				
Mean Serum Levels (μg/mL)				
Predose	0	NA	0	0
Day 4	20.0	NA	423.7	316.1
Day 7	48.8	NA	719.1	644.8
Day 14	55.3	NA	624.8	426.6
Noteworthy Findings				
Died or Sacrificed Moribund	--	NA	--	--
Physical Examinations	--	NA	--	--
Ophthalmic Examinations	--	NA	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Body Weights	--	NA	--	--
Clinical Observations	--	NA	--	--
Hematology				
Red Blood Cell Count (10^6/μL)				
Day −6	5.39	NA	5.92	6.69
Day 14	5.33	NA	5.30	6.35
Hemoglobin (g/dL)				
Day −6	12.6	NA	12.1	12.0
Day 14	12.5	NA	10.9	11.4
Hematocrit (%)				
Day −6	39.8	NA	40.3	41.6
Day 14	42.9	NA	38.5	40.9
White Blood Cell Count (10^3/μL)				
Day −6	10.8	NA	11.0	10.6
Day 14	11.5	NA	23.0	20.8

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Neutrophil Count (10^3/ µL)				
Day −6	4.2	NA	5.1	3.4
Day 14	2.0	NA	8.9	6.4
Lymphocyte Count (10^3/ µL)				
Day −6	6.3	NA	5.0	6.1
Day 14	9.2	NA	12.5	12.4
Monocyte Count (10^3/ µL)				
Day −6	0.3	NA	0.3	0.4
Day 14	0.3	NA	0.6	1.0
Basophil Count (10^3/ µL)				
Day −6	0.0	NA	0.0	0.0
Day 14	0.1	NA	0.3	0.3

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Serum Chemistry				
Total Protein (g/dL)				
Day −6	8.3	NA	8.4	8.2
Day 14	8.8	NA	9.2	9.3
Globulin (g/dL)				
Day −6	3.1	NA	3.7	4.0
Day 14	3.8	NA	5.0	4.9
Coagulation	--	NA	--	--
Urinalysis	--	NA	--	--
Anti-ipilimumab Antibody Response (Number Responding/ Number Evaluated)[a]				
Anti-ipilimumab IgG[b]	0/2	NA	0/2	1/2

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
Peripheral Blood Lymphocyte Phenotype Analysis[c]				
% CD3+ (T-cells)				
Predose	59.1	NA	50.8	
Day 4	58.1	NA	50.9	
Day 7	64.5	NA	65.6	
Day 14	58.9	NA	61.0	
% CD20+ (B-cells)				
Predose	26.6	NA	18.4	
Day 4	22.5	NA	14.9	
Day 7	21.1	NA	9.8	
Day 14	23.7	NA	10.5	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
% CD3+CD4+ (T-helper cells)				
Predose	36.6	NA	46.9	
Day 4	20.2	NA	34.2	
Day 7	34.3	NA	48.1	
Day 14	39.5	NA	64.7	
% CD3+CD8+ (T cytotoxic cells)				
Predose	48.2	NA	47.8	
Day 4	53.6	NA	50.7	
Day 7	54.9	NA	39.2	
Day 14	56.1	NA	31.9	
% CD3+ expressing CD25 (Activated T-cell subset)	--	NA	--	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009970 **(Continued)**			**Study No.** 7114-100	
Daily Dose (mg/kg):	**3**		**30**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 2**
% CD3+ expressing CD29 (T-cell subset)				
Predose	56.4	NA	61.0	
Day 4	55.9	NA	67.6	
Day 7	66.2	NA	61.7	
Day 14	67.5	NA	75.1	
% CD3+ expressing CD69 (Activated T-cell subset)	--	NA	--	
% CD3+ expressing HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype)	--	NA	--	
Organ Weights	--	NA	--	--
Gross Pathology	--	NA	--	--
Histopathology	--	NA	--	--

[a] Drug-specific antibodies directed to the ipilimumab $F(ab')_2$ were evaluated using a direct -format ELISA. Titers were determined as the lowest dilution that achieved the background levels established by prestudy controls. A titer/dilution of > 4-fold the prestudy value was considered positive.

[b] One high-dose female had an increase in anti-ipilimumab IgG titer from 1:400 prestudy to 1:25600 on Day 14.

[c] Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis was performed on all animals using a flow cytometric method. Relative comparisons were made between individuals and groups of monkeys. Group means (combined sexes at 30 mg/kg) are shown.

[d] The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** BMS-663513 and ipilimumab

Report Title: One-Month Intravenous Combination Toxicity Study in Monkeys **Study No.** DS06064

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus **Duration of Dosing:** Once weekly for 4 weeks **Document Control Number:** 930021064

Initial Age: 2 to 3 years **Duration of Postdose:** 9 weeks **Location in Dossier:** 4.2.3.2-4

Date of First Dose: [redacted] males, females **Method of Administration:** Intravenous

Vehicle: **For BMS-663513:** 5mM sodium succinate buffer containing 2 mg/mL pluronic F68 surfactant in 0.9% sodium chloride for injection. **GLP Compliance:** Yes[a]

For ipilimumab: 0.9% sodium chloride for injection. The formulation for ipilimumab was 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% mannitol, 100 µM DTPA, 0.01% Polysorbate 80.

Special Features: For combination-treatment and the vehicle-control groups, 2 separate infusions were given. A 9.8 mL/kg volume of the BMS-663513 dosing solution or its corresponding vehicle was administered. Within 15 minutes after the start of the BMS-663513 dose, a 1.9 mL/kg volume of the ipilimumab dosing solution or its corresponding vehicle was administered at the same rate.

No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg-BMS-663513 and 10 mg/kg ipilimumab

Daily Dose:	**(0) Control**		**100 mg/kg BMS-663513/ 10 mg/kg ipilimumab**		**10 mg/kg ipilimumab**	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics:[b]						
AUC(0-48 h) (µg•h/mL) Day 1	♦	♦	7,730	6,580	7,070	7,220
AUC(0-168 h) (µg•h/mL) Day 1	♦	♦	18,800	16,100	17,500	17,700
AUC(0-48 h) (µg•h/mL) Day 22	♦	♦	12,000	10,100	13,000	12,600[c]
AUC(0-168 h) (µg•h/mL) Day 22[d]	♦	♦	33,450	24,800	36,400	32,000
AUC(0-1512 h) (µg•h/mL) Day 22[d]	♦	♦	103,300	60,500	108,050	90,200[e]
Cmax (µg/mL) Day 1	♦	♦	225	212	209	233
Cmax (µg/mL) Day 22	♦	♦	351	286	352	368[c]
MRT (h) Days 22-85[d]	♦	♦	426	385	486	429
T1/2 (h) Days 29-85[d]	♦	♦	228	331	328	339

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable, * indicates significantly different from control based on Tukey multiple comparison procedure ($P < 0.05$), AUC = area under the serum concentration-time curve, Cmax = maximum observed serum concentration, Ig = immunoglobulin, KLH = keyhole limpet hemocyanin, MRT = mean residence time, T1/2 = half-life, ♦ = Not evaluated. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** BMS-663513 and ipilimumab

Document Control Number: 930021064 **(Continued)** **Study No.** DS06064

Daily Dose (mg/kg):	**(0) Control**		**100 mg/kg BMS-663513/ 10 mg/kg ipilimumab**		**10 mg/kg ipilimumab**	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Body Weights	--	--	--	--	--	--
Food Consumption	--	--	--	--	--	--
Physical Examinations	--	--	--	--	--	--
Clinical Observations	--	--	--	--	--	--
Ophthalmoscopy	--	--	--	--	--	--
Electrocardiography	--	--	--	--	--	--
Hematology	--	--	--	--	--	--
Coagulation	--	--	--	--	--	--
Serum Chemistry	--	--	--	--	--	--
Urinalysis	--	--	--	--	--	--
Organ Weights	--	--	--	--	--	--
Gross Pathology	--	--	--	--	--	--
Histopathology	--	--	--	--	--	--
Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis[f]						
CD2+CD20− (T-cells)	--	--	--	--	--	--
CD4+CD8− (T-helper cells)	--	--	--	--	--	--
CD8+CD4− (T-cytotoxic cells)	--	--	--	--	--	--
CD20+CD2− (B-cells)	--	--	--	--	--	--
CD16+CD3− (NK-cells)	--	--	--	--	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable, * indicates significantly different from control based on Tukey multiple comparison procedure ($P < 0.05$), Ig = immunoglobulin, KLH = keyhole limpet hemocyanin. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** BMS-663513 and ipilimumab

Document Control Number: 930021064 **(Continued)** **Study No.** DS06064

Daily Dose (mg/kg):	**(0) Control**		**100 mg/kg BMS-663513/ 10 mg/kg ipilimumab**		**10 mg/kg ipilimumab**	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
KLH Specific Antibody Response (IgG, M, or A isotype)[g]						
Day 15	405	803	789	1,036	310	492
Day 23	14,581	21,623	102,438*	137,083*	57,306*	101517*
Day 29[d]	13,860	46,264	235,895	172,432	113,367	224,193
Day 36[d]	14,416	65,477	239,773	172,206	124,344	239,281
Immunogenicity[h]						
Anti-ipilimumab antibodies Day 15[i]	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
Anti-BMS-663513 antibodies Day 15[i]	0/5	0/5	0/5	0/5	NA	NA
Anti-Nuclear Antibody Levels[j]	--	--	--	--	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable, * indicates significantly different from control based on Tukey multiple comparison procedure ($P < 0.05$), Ig = immunoglobulin, KLH = keyhole limpet hemocyanin. All footnotes are available as table end notes.

[a] The phenotypic analysis of peripheral-blood natural killer (NK) cells was not fully validated. The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.
[b] Mean toxicokinetic parameters for ipilimumab alone or in combination with BMS-663513.
[c] N=4.
[d] Mean of 2 animals/sex/group.
[e] N=1.
[f] Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis was performed on all animals pretest and during Week 4 and 13 using a flow cytometric method.
[g] Results are expressed as mean of endpoint titers.
[h] Immunogenicity assessed on Days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 and 85.
[i] Results indicate number of animals with a positive antibody response.
[j] Anti-nuclear antibody levels assessed pretest and Week 4.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, NA = Not applicable, * indicates significantly different from control based on Tukey multiple comparison procedure ($P < 0.05$), Ig = immunoglobulin, KLH = keyhole limpet hemocyanin. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7D Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study **Test Article:** Ipilimumab

Report Title:	A Repeated Dose Toxicity and Efficacy Study of MDX-010 or MDX-010-[redacted] in Combination with HBsAg and SKMel Vaccines in Cynomolgus Monkeys			**Study No.**	[redacted]-1416-128
Species / Strain:	Monkey/ Cynomolgus	**Duration of Dosing:**	Group 1-5 monkeys received saline, MDX-010-[redacted] or MDX-010-[redacted] on Days 1, 29, and 57. Group 6 monkeys received MDX-010-[redacted] on Days 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, and 64. All monkeys received HBsAg and SKMel vaccines on Days 1, 29, and 57.	**Document Control Number:**	930009973
Initial Age:	1.8 to 3.8 years	**Duration of Postdose:**	15 to 22 days	**Location in Dossier:**	4.2.3.2-7
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Saline, MDX-010, and MDX-010-[redacted] given IV. HBsAg (10 μg) given IM. SKMel (5×10^6 cells) given SC.		
		Vehicle/Formulation:	Phosphate buffered saline	**GLP Compliance:**	Yes[r]

Special Features: Non-routine endpoints evaluated: T-dependent IgG antibody response to HBsAg and SK-mel; peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis - CD3 (T cells), CD3/CD4 (T-helper cells), CD3/CD8 (T-cytotoxic cells), CD3/CD25 (activated T-cell subset), CD3/CD69 (activated T-cell subset), CD3/HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype), antigen-specific T cell activation as measured by intracellular cytokine production (TNF-α, IFN-γ), delayed-type hypersensitivity to three antigens (Saline, SK-mel cells, and HbsAg ;0.1 mL each) administered intradermally on Days 41/44 and 71.

No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg monthly, 1 mg/kg weekly

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *$p \leq 0.05$. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**										**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		**(Continued)**								**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics:												
Mean plasma levels[a] (μg/mL)												
Day 1, 1 hour	♦		411.97		1.80[b]		24.61		506.10		23.09	
Day 1, 2 hour	♦		420.81		1.66[b]		22.13		480.09		23.64	
Day 1, 4 hour	♦		421.94		1.51[b]		19.59		430.60		20.31	
Day 1, 6 hour	♦		393.78		♦		13.92		406.52		19.20	
Day 1, 8 hour	♦		322.12		♦		16.43		313.11		16.85	
Day 1, 24 hour	♦		183.32		♦		7.57		211.24		7.09	
Day 4	♦		175.08		♦		4.73		159.91		7.56	
Day 8 (predose)	♦		85.48		♦		3.92		87.47		5.05	
Day 11	♦		56.96		♦		3.34		57.05		14.64	
Day 14	♦		40.84		♦		2.65		54.50		9.45	
Day 29 (predose)	♦		10.98[c]		♦		1.26[b]		17.55[c]		16.62	
Day 30 (24 hours postdose)	♦		299.97		BLD		12.16		328.74		23.16	
Day 43 (predose)	♦		61.62		♦		3.59		67.05		28.27	
Day 57 (predose)	♦		16.42[c]		♦		1.70		21.22[c]		30.86	
Day 58 (24 hours postdose)	♦		288.64		1.34[b]		10.16		385.79		46.89	
Day 71	♦		56.66		♦		2.42		65.08		28.31	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**										**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973	**(Continued)**									**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Cmax (µg/mL)	♦		459	420	♦		♦		560	503	♦	
AUC(0-T) (µg•h/mL)	♦		44,900[d]	45,300	♦		♦		51,600	49,600	♦	
T1/2 (h)	♦		169	173	♦		♦		275	194	♦	
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Body Weight (weekly)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Food Consumption (daily)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Clinical Observations (twice daily)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Vaccine Injection Site Irritation	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
DTH (mean calculated score)[e]												
Saline, Day 41/44	--		--		--		--		--		--	
Saline, Day 71	--		--		--		--		--		--	
HBsAg, Day 41/44	4		7		6		6		10		10	
HBsAg, Day 71	3		6		4		7		8		6	
SKMel, Day 41/44	2		5		1		1		3		3	
SKMel, Day 71	--		--		1		2		1		1	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**										**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		**(Continued)**								**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Ophthalmoscopy (pretest and Day 74)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Hematology[f]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Serum Chemistry[f]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Urinalysis (Day 79)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Peripheral Blood Lymhocyte Phenotyping[g]												
% CD3+CD4+ cells expressing CD69												
Predose	7.2		4.9		6.9		7.0		4.8		7.3	
Day 2	12.7		16.3		13.0		14.5		16.9		17.0	
Day 30	11.4		9.5		11.9		11.5		9.6		10.9	
Day 58	8.3		7.7		5.9		6.7		9.7		7.6	
Day 79	12.3		9.3		7.7		11.2		10.6		10.5	
% CD3+CD8+ cells expressing CD69												
Predose	42.0		39.3		44.9		44.5		36.7		41.6	
Day 2	29.7		30.2		38.3		37.6		40.0		36.0	
Day 30	25.0		21.4		27.6		31.2		26.0		27.8	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**										**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		**(Continued)**								**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 58	25.5		25.5		23.6		29.1		30.2		29.4	
Day 79	31.5		28.2		30.4		35.5		32.8		34.0	
% CD3+CD4+ cells expressing HLA-DR												
Predose	16.7		12.4		13.1		17.1		14.1		17.8	
Day 2	20.2		19.1		14.8		20.5		18.7		17.4	
Day 30	22.0		19.4		17.8		27.6		16.8		22.5	
Day 58	25.3		17.4		15.1		21.2		17.2		21.7	
Day 79	23.6		17.8		16.3		21.9		17.5		21.2	
%CD3+CD8+ cells expressing HLA-DR												
Predose	32.5		35.9		32.6		34.0		28.3		35.7	
Day 2	28.7		32.3		31.0		34.6		28.8		33.7	
Day 30	28.8		36.8		28.1		36.7		27.8		32.2	
Day 58	34.0		37.5		27.3		34.0		26.4		34.8	
Day 79	30.4		34.1		28.9		32.2		27.8		35.6	
% CD3+CD4+ cells expressing CD25												
Predose	0.5		1.2		1.4		2.1		0.7		0.5	
Day 2	5.5		6.1		6.8		8.6		7.4		4.9	
Day 30	2.9		2.9		3.3		4.7		4.2		2.1	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study										Test Article:	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		(Continued)								Study No.	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	0 Saline Control monthly		10 MDX-010-[redacted] monthly		0.1 MDX-010-[redacted] monthly		1 MDX-010-[redacted] monthly		10 MDX-010-[redacted] monthly		1 MDX-010-[redacted] weekly	
Number of Animals:	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Day 58	3.1		4.0		3.9		5.3		3.5		2.9	
Day 79	2.0		2.0		2.6		3.5		2.0		2.7	
% CD3+CD8+ cells expressing CD25												
Predose	0.0		0.5		0.6		0.8		0.2		0.4	
Day 2	0.7		1.5		1.7		2.3		2.4		1.4	
Day 30	0.9		1.1		0.3		1.7		2.8		0.5	
Day 58	0.4		0.6		0.5		0.8		0.5		0.7	
Day 79	0.7		0.3		0.4		1.2		0.8		1.3	
Intracellular Cytokines[h]												
CD3+CD8+ (%TNF-α)												
Predose	0.15		0.30		0.13		0.20		0.12		0.10	
Day 43	0.19		0.27		0.34		0.02		0.75		0.22	
Day 79	0.04		0.73		0.00		0.10		0.08		0.40	
CD3+CD8− (%TNF-α)												
Predose	0.06		0.20		0.10		0.07		0.07		0.09	
Day 43	0.22		0.38		0.14		0.04		0.51		0.32	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**												**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		**(Continued)**										**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 79	0.10		0.43		0.01		0.25		0.07		0.61	
CD3+CD8+ (%IFN-γ)												
Predose	0.02		0.05		0.03		0.02		0.03		0.00	
Day 43	0.05		0.03		0.22		0.00		0.40		0.06	
Day 79	0.00		0.09		0.00		0.00		0.02		0.06	
CD3+CD8− (%IFN-γ)												
Predose	0.02		0.02		0.03		0.00		0.02		0.02	
Day 43	0.08		0.03		0.06		0.00		0.08		0.05	
Day 79	0.08		0.04		0.01		0.02		0.01		0.13	
Antibody response to ipilimumab, Day 71 (Number responding / total evaluated)[i]	♦	♦	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
Antibody Response to Sk-mel												
Flow Cytometry Method (Mean Fluorescence Intensity)[j]												
Pretest	11.67		9.00		7.83		6.83		7.00		8.00	
Day 14	47.33		94.83		74.67		25.50		36.83		30.67	
Day 43	445.17		871.17		166.00		226.17		963.17		81.67	
Day 71	472.83		1544.50		268.00		424.00		975.50		201.00	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**						**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973	**(Continued)**					**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**	**10 MDX-010-[redacted] monthly**	**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**	**1 MDX-010-[redacted] monthly**	**10 MDX-010-[redacted] monthly**	**1 MDX-010-[redacted] weekly**		
Number of Animals:	**M: 3 F: 3**	**M: 3 F: 3**	**M: 3 F: 3**	**M: 3 F: 3**	**M: 3 F: 3**	**M: 3 F: 3**		
Day 79	469.67	1677.83	271.50	354.33	1002.67	261.83		
ELISA Method (Mean OD405)[k]								
Pretest	0.08	0.05	0.08	0.08	0.10	0.09		
Day 14	0.06	0.05	0.06	0.07	0.11	0.10		
Day 43	0.10	0.13	0.06	0.07	0.17	0.11		
Day 71	0.09	0.27	0.09	0.11	0.27	0.12		
Day 79	0.10	0.37	0.09	0.11	0.32	0.13		
Antibody Response to HBsAg (mIU/mL)[l]								
Pretest	0	0	0	0	0	0		
Day 14	542	1302	1672	144	567	3050		
Day 43	4873	4785	3878	2870	6304	12935		
Day 71	10721	38026	13035	16783	22064	45683		
Day 79	7657	34654	12231	16449	17239	30356		
Organ Weights	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --		
Gross Pathology [m]	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --		
Histopathology (Incidence/Total evaluated)[n]								
Test Article/Vehicle Injection								

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D	**Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study**										**Test Article:**	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973		**(Continued)**								**Study No.**	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	**0 Saline Control monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**0.1 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] monthly**		**10 MDX-010-[redacted] monthly**		**1 MDX-010-[redacted] weekly**	
Number of Animals:	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Sites, IV												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	1/3	3/3	2/3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3	3/3	2/3	2/3	2/3
SK-mel Injection Sites												
SC												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
ID (Day 41 DTH)												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3	2/3	3/3	2/3	0/3	2/3	2/3	0/3
ID (Day 71 DTH)[o]												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
HBsAg Injection Sites												
IM (Day 1 site)												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	0/3	0/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	3/3	2/3	1/3
Granuloma Formation[p]	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ID (Day 41 DTH)												
Macrophage Infiltrate	1/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	3/3
Granuloma Formation[p]	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7D Repeat-Dose Toxicity/Product Comparability Study											Test Article:	Ipilimumab
Document Control Number:	930009973 (Continued)										Study No.	[redacted]-1416-128
Daily Dose (mg/kg):	0 Saline Control monthly		10 MDX-010-[redacted] monthly		0.1 MDX-010-[redacted] monthly		1 MDX-010-[redacted] monthly		10 MDX-010-[redacted] monthly		1 MDX-010-[redacted] weekly	
Number of Animals:	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
ID (Day 71 DTH)[q]												
Acanthosis	1/3	0/3	2/3	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3	0/3	1/3
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3
Macrophage Infiltrate	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Eosinophil infiltrate	2/3	0/3	2/3	3/3	1/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mononuclear Cell Infiltrate	1/3	0/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	3/3	0/3	1/3
Necrosis	2/3	0/3	1/3	2/3	0/3	1/3	0/3	1/3	2/3	3/3	1/3	0/3
Granuloma Formation[p]	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Saline Injection Sites												
ID (Day 41 DTH)												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	2/3	2/3	3/3	1/3	2/3	0/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
ID (Day 71 DTH)												
Mononuclear Cell Infiltrate, Perivascular	1/3	1/3	2/3	1/3	3/3	1/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	1/3

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

[a] Mean plasma levels were calculated by combining the sexes.

[b] Mean of 2 monkeys (0.1 mg/kg) or 1 monkey (1 mg/kg) with detectable levels. Other monkeys in this group has plasma drug levels below the limit of detection (1 μg/mL).

[c] Except for one Group 2 monkey, the predose plasma levels were above the detection limit on Days 29 and 57 and indicated continuous exposure to ipilimumab throughout the study. The absence of MDX-010-[redacted] n the single Group 2 monkey may have been due to the presence of anti-MDX-010-[redacted] antibody.

[d] For one animal, AUC(0-312 h) was used because the concentration at 672 h was below LLOQ. For the rest, the value used was AUC(0-672 h).

[e] Skin responses to DTH challenge (erythema/eschar and induration) were assessed 24 and 48 hours after the DTH challenge injections. Erythema and eschar formation were scored as follows: 0, no erythema; 1, very slight erythema; 2, well defined erythema; 3, moderate to severe erythema; 4, severe erythema to slight eschar formation. Induration was measured in mm. The final DTH score was calculated as follows: ([induration x erythema score]$_{24hr}$ + [induration x erythema score]$_{48hr}$) / 2. The mean DTH score was calculated by combining the sexes. Final DTH scores of zero were not included in the calculation of the mean.

[f] Evaluated predose and on Days 29, 58, and 74.

[g] Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis was performed on all animals predose and on Days 2, 30, 58, and 79 using a flow cytometric method. Relative comparisons were made between individuals and groups of monkeys. Group means of combined sexes are shown.

[h] Samples of heparinized whole blood were incubated overnight with costimulatory antibodies CD28 and CD49d in the presence or absence of HBsAg. Blood samples were also incubated with SEB and processed for use as a positive control. The next day, T cells were evaluated for CD3 and CD8 cell surface expression as well as intracellular expression of CD69, TNF-α, and IFN-γ using a flow cytometric method. Antigen-specific cytokine production (TNF-α and IFN-γ) by T cells expressing CD69 was evaluated by comparing to the unstimulated (no antigen added) controls for each of the subjects.

[i] Drug-specific IgG antibodies directed to the ipilimumab F(ab')$_2$ were evaluated using a direct -format ELISA. The data are expressed as a titer defined as the inverse of the highest dilution of the plasma sample that generates a correct OD nearest to 0.100, the assumed background OD. The results for each sample are expressed as a fold increase in titer relative to a pretreatment sample. Samples with greater than 4-fold increases were considered to be positive responses. One male given MDX-010-[redacted] monthly at 10 mg/kg had an anti-ipilimumab IgG antibody response at Day 71 of 256-fold the prestudy value, which appeared to accelerate the clearance of ipilimumab starting as early as Day 29. Two males given MDX-010-[redacted] weekly at 1 mg/kg had anti-ipilimumab IgG antibody responses at Day 71 of 16-fold the prestudy values. These monkeys generally had similar drug plasma levels as other animals in the group throughout the study.

[j] Freshly prepared SK-mel cells were incubated with the plasma samples at 4°C to allow antibody binding to surface molecules. After washing the cells, antibodies bound to the cells were detected with a phycoerythrin conjugated goat anti-human IgG F(ab')2. The cell associated fluorescence was analyzed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity (MFI) of the samples was reported. Group means are shown.

[k] Antibodies directed to a whole cell lysate prepared from SK-mel cells were evaluated using a direct ELISA format. The OD 405 for the samples was reported. Group means are shown.

[l] A commercially available kit was used for the quantitation of antibodies specific for HBsAg. Samples were analyzed according to manufacturer's instructions. The HBsAg antibody concentration (mIU/mL) is determined from the standard curve. The group means are shown.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

[m] No gross changes directly related to the test articles, MDX-010 and MDX-010-[redacted] were identified in any tissue in any animal. Gross changes identified in the ID injection sites used to evaluate DTH to HBsAg challenges at Days 41 and 71 for all groups consisted of focal, white, firm areas of increased thickness that were from 1 to 10 mm in diameter. This change correlated histologically with infiltrates of macrophages and/or other inflammatory cells, necrosis, and granuloma formation.

[n] No microscopic alterations considered directly related to the test articles, MDX-010 and MDX-010-[redacted], were identified in any tissue in any animal.

[o] The DTH sites did not differ between groups, although the degree of inflammation was, on average, slightly more severe at the Day 71 site than at the Day 41 site.

[p] The well-formed granulomas indicate a histologic sign of cell-mediated immunity.

[q] These findings indicate an accentuated inflammatory response to HBsAg that was more extensive at Day 71 than at Day 41.

[r] Preparation, characterization and/or analysis of the SKMel vaccine and the HBsAg vaccine and immunologic assays were not conducted under GLP Regulations. The characterization of ipilimumab and ipilimumab-[redacted] was conducted under GMP rather than GLP regulations.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, IM = intramuscular; IV = intravenous; SC = subcutaneous, ID = intradermally, HBsAg = hepatitis B surface antigen, SK-mel = whole cell human melanoma vaccine, DTH = delayed-type hypersensitivity, ♦ = not evaluated, BLD = below the limit of detection, M = male; F = female, NA = Not applicable, MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process A), MDX-[redacted] = [redacted] ipilimumab (Process B), Cmax = maximum observed plasma concentration, AUC = area under the plasma concentration-time curve, t1/2 = half life.
Statistical analysis: ANOVA followed by a multiple comparisons test, Shapiro-Wilk for normality of data and Levene's test for homogeneity of variance, if parametric, Dunnett's test was used and if nonparametric, Kruskal-Wallis was used. *p≤ 0.05. Immunologic assays were evaluated by non-statistical methods.

Table 2.6.7.7E Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Report Title: MDX-CTLA4: A 6-Month Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys **Study No.** 01-3460

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus **Duration of Dosing:** Days 0, 28, 56, 84, and 140 **Document Control Number:** 930009980

Initial Age: 7 years 5 month to 8 years **Duration of Postdose:** 27 or 28 days **Location in Dossier:** 4.2.3.2-8

Date of First Dose: [redacted] (Day 0) **Method of Administration:** Intravenous injection of Ipilimumab ± subcutaneous injection of 5 x 10^6 SK-mel cells

Vehicle/Formulation: Negative control, saline
Ipilimumab in PBS
SK-mel cells in saline[a] **GLP Compliance:** Yes[l]

Special Features: Non-routine endpoints evaluated: T-dependent IgG antibody response to SK-mel; peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis - CD3 (T cells), CD3/CD4 (T-helper cells), CD3/CD8 (T-cytotoxic cells), CD3/CD25 (activated T-cell subset), CD3/CD69 (activated T-cell subset), CD3/HLA-DR (T cells expressing MHC Class II - DR isotype), delayed-type hypersensitivity to four antigens (0.1 mL saline, 0.1 mL SK-mel cells, 0.04 to 0.1 mL dendritic cells, and 0.01 to 0.1 mL dendritic cells pulsed with SK-mel vaccine) administered intradermally.

No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg

Daily Dose:	**0 (Saline Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab**		**5 x 10^6 SK-mel cells (Vaccine Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab and 5 x 10^6 SK-mel cells**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics:								
Mean ipilimumab plasma levels[b] (μg/mL)								
Day 1	♦	♦	186.9		♦	♦	182.1	
Day 13	♦	♦	73.5		♦	♦	63.1	
Day 28	♦	♦	32.6		♦	♦	32.3	
Day 29	♦	♦	204.6		♦	♦	229.0	
Day 41	♦	♦	74.5		♦	♦	81.4	
Day 56	♦	♦	46.7		♦	♦	43.0	
Day 57	♦	♦	246.2		♦	♦	250.4	
Day 69	♦	♦	78.0		♦	♦	115.6	
Day 84	♦	♦	56.6		♦	♦	44.7	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings; ♦ = Not evaluated; SK-mel = whole cell human melanoma vaccine; M = male; F = female.
Data was evaluated using nonstatistical methods. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7E Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009980 **(Continued)** **Study No.** 01-3460

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Saline Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab**		**5 x 10^6 SK-mel cells (Vaccine Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab and 5 x 10^6 SK-mel cells**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics continued: Mean ipilimumab plasma levels[b] (µg/mL)								
Day 97	♦	♦	117.9		♦	♦	107.3	
Day 112	♦	♦	51.2		♦	♦	46.8	
Day 125	♦	♦	37.7		♦	♦	32.7	
Day 140	♦	♦	40.5		♦	♦	18.0	
Day 141	♦	♦	265.1		♦	♦	258.6	
Day 167/168	♦	♦	60.5		♦	♦	46.6	
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	--	--	--	--	--	--	--	--
Body Weight	--	--	--	--	--	--	--	--
Food Consumption	--	--	--	--	--	--	--	--
Clinical Observations	--	--	--	--	--	--	--	--
Physical Examinations	--	--	--	--	--	--	--	--
Irritation Evaluation at SK-mel subcutaneous injection sites (number with irritation)[c]								
Dose 1	♦	♦	♦	♦	--	--	--	--
Dose 2	♦	♦	♦	♦	--	--	--	--
Dose 3	♦	♦	♦	♦	--	--	--	--
Dose 4	♦	♦	♦	♦	--	--	1[d]	--
Dose 5	♦	♦	♦	♦	--	--	1	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings; ♦ = Not evaluated; SK-mel = whole cell human melanoma vaccine; M = male; F = female.
Data were evaluated using non-statistical methods. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7E Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009980 **(Continued)** **Study No.** 01-3460

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Saline Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab**		**5 x 10^6 SK-mel cells (Vaccine Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab and 5 x 10^6 SK-mel cells**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Delayed Type Hypersensitivity (number with response[e])								
Saline	♦	♦	♦	♦	0	0	0	0
Sk-mel cells	♦	♦	♦	♦	3	1	2	2
Dendritic cells	♦	♦	♦	♦	0	0	0	1
Dendritic cells pulsed with vaccine	♦	♦	♦	♦	0	0	1	0
Hematology	--	--	--	--	--	--	--	--
Coagulation	--	--	--	--	--	--	--	--
Serum Chemistry	--	--	--	--	--	--	--	--
Peripheral Blood Lymphocyte Phenotyping[f]								
% CD3+, CD4+ expressing CD25	--	--	--	--	--	--	--	--
% CD3+, CD8+ expressing CD25	--	--	--	--	--	--	--	--
% CD3+, CD4+ expressing CD69	--	--	--	--	--	--	--	--
% CD3+, CD8+ expressing CD69	--	--	--	--	--	--	--	--
% CD3+, CD4+ expressing HLA-DR	--	--	--	--	--	--	--	--
% CD3+, CD8+ expressing HLA-DR	--	--	--	--	--	--	--	--
Antibody response to ipilimumab (Number seroconverted[g] / total evaluated)	♦	♦	0/2	0/2	♦	♦	0/3	0/3
Antibody Response to Sk-mel[h]	♦		♦		1/6		5/6	

Abbreviations: -- = No noteworthy findings; ♦ = Not evaluated; SK-mel = whole cell human melanoma vaccine; M = male; F = female.
Data were evaluated using non-statistical methods. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.7E Repeat-Dose Toxicity **Test Article:** Ipilimumab

Document Control Number: 930009980 **(Continued)** **Study No.** 01-3460

Daily Dose (mg/kg):	**0 (Saline Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab**		**5 x 10^6 SK-mel cells (Vaccine Control)**		**10 mg/kg Ipilimumab and 5 x 10^6 SK-mel cells**	
Number of Animals:	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Mean Fluorescence Intensity[i]								
Pretest	♦		♦		60.8		56.8	
Day 13	♦		♦		80.2		169.0	
Day 41	♦		♦		324.7		1279.7	
Day 69	♦		♦		336.8		798.3	
Day 97	♦		♦		220.3		1029.0	
Day 125	♦		♦		281.3		629.8	
Day 167/168	♦		♦		148.2		453.7	
Mean OD405[j]								
Pretest	♦		♦		0.123		0.115	
Day 13	♦		♦		0.108		0.130	
Day 41	♦		♦		0.135		0.251	
Day 69	♦		♦		0.148		0.307	
Day 97	♦		♦		0.134		0.446	
Day 125	♦		♦		0.137		0.410	
Day 167/168	♦		♦		0.133		0.291	
Organ Weights (%[k])								
Testes	40.203 g	♦	−27	♦	−19	♦	−49	♦
Thyroid/parathyroids	--	0.583 g	--	−44	--	−31	--	−21
Gross Pathology	--	--	--	--	--	--	--	--
Histopathology	--	--	--	--	--	--	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings; ♦ = Not evaluated; SK-mel = whole cell human melanoma vaccine; M = male; F = female.
Data were evaluated using non-statistical methods. All footnotes are available as table end notes.

[a] SK-mel cells = human melanoma cell line. SK-mel cells were transfected with a commercially available vector to secrete human GM-CSF (InVivogen). The cells were grown to confluency, harvested by trypsinization, treated with mitomycin C (Sigma), and washed several times with saline. The cells were resuspended to 1 x 10^7/mL in saline and 0.5 mL of the cell preparation was drawn into syringes for injection.

[b] Mean plasma levels of ipilimumab were calculated by combining the sexes.

[c] Irritation was observed as very slight to slight erythema or edema.

[d] A 5 mm punch biopsy was taken from this animal and evaluated histologically and immunohistologically. The findings for the sampled skin and vasculature were consistent with a drug-induced, immune-mediate, local hypersensitivity reaction.

[e] Responses observed were very slight to slight erythema and/or edema at the site of the indicated antigen. Incidence indicates reactions at 24, 48, and/or 72 hours post challenge.

[f] Peripheral-blood lymphocyte phenotype analysis was performed on all animals predose and on Days 1, 29, 57, and 141 using a flow cytometric method. Relative comparisons were made between individuals and groups of monkeys.

[g] Drug-specific IgG antibodies directed to the ipilimumab $F(ab')_2$ were evaluated using a direct -format ELISA. The data are expressed as a titer defined as the inverse of the highest dilution of the plasma sample that generates a correct OD nearest to 0.100, the assumed background OD. The results for each sample are expressed as a fold increase in titer relative to a pretreatment sample. Samples with greater than 4-fold increases were considered to be positive responses.

[h] Data from sexes combined. After administration of multiple doses of vaccine (SK-mel cells).

[i] Freshly prepared SK-mel cells were incubated with the plasma samples at 4°C to allow antibody binding to surface molecules. After washing the cells, antibodies bound to the cells were detected with a phycoerythrin conjugated goat anti-human IgG Fc-specific reagent. The cell associated fluorescence was analyzed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity (MFI) of the samples was reported.

[j] Antibodies directed to a whole cell lysate prepared from SK-mel cells were evaluated using a direct ELISA format. The OD 405 for the samples was reported.

[k] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent differences for the absolute organ weights.

[l] Biopsy evaluations by Pathology Associates International, and immunological and pharmacokinetic assays were not conducted under GLP regulations. The characterization of ipilimumab was conducted under GMP rather than GLP regulations.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings; ♦ = Not evaluated; SK-mel = whole cell human melanoma vaccine; M = male; F = female.
Data were evaluated using non-statistical methods. All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Report Title: Ipilimumab (BMS-734016): Intravenous Study of Pre- and Postnatal Development in Cynomolgus Monkeys with a 6-Month Postnatal Evaluation

Test Article: Ipilimumab

Design similar to ICH 4.1.2 Yes

Duration of Dosing: GD20/21/22 then every 21 days until parturition

Study No.: DN10020

Day of Mating: GD0

Document Control Number: 930056635

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus

Method of Administration: Vascular (intravenous)

Location in Dossier: 4.2.3.5.3-1

Initial Age: 4.0-7.5 years

Vehicle/Formulation: 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP / 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% Mannitol, 100 µM DTPA, 0.01% polysorbate 80

Date of First Dose: [redacted]

GLP Compliance: GLP[a]

Special Features: Lymphocyte immunophenotyping (flow cytometry); T-cell-dependent antibody response (TDAR) to hepatitis B surface antigen (HBsAg) and tetanus; serum immunoglobulins; anti-nuclear antibody (ANA); toxicokinetics of ipilimumab in infant serum and mother's serum and milk; anti-drug antibodies (ADA) in infant and adult female serum

No Observed Adverse-Effect Level: **Adult Females:** 30 mg/kg

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	10	30
Adult Females:				
Toxicokinetics: ipilimumab[b]	Gestation Day			
C(3min) (µg/mL)	20, 21, or 22	--	285[c]/286	834/825
	125, 126, or 127	--	291/342	817/890
AUC (0-T) (µg•h/mL)	20, 21, or 22	--	42,400[c]/43,400	119,000[c]/126,000
	125, 126, or 127	--	50,500[c]/54,700	115,000[c]/146,000
Anti-drug Antibody (ADA) (number positive /total number evaluated)[d,e]		0	5/19	5/20

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Document Control Number: **(Continued)** **Test Article:** Ipilimumab

Study No.: DN10020

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30
Adult Females (Continued):			
Mean Serum Ipilimumab Concentration [f] and Mean Infant/Adult Ratio [g]			
Adult PPD3 µg/mL	<LLOQ	84.5	154
Adult PPD7, Infant/ BD7 µg/mL (Mean Infant/Adult Ratio)	<LLOQ	65.0, 56.9 (1.1)	112, 122 (1.4)
Adult PPD21, Infant/ BD21 µg/mL (Mean Infant/Adult Ratio)	<LLOQ	35.7, 31.7 (1.2)	60.6, 65.5 (1.7)
Adult PPD84, Infant/ BD84 µg/mL (Mean Infant/Adult Ratio)	<LLOQ	4.78, 3.00 (1.3)	6.02, 4.35 (1.6)
Adult PPD182, Infant/ BD182 µg/mL (Mean Infant/Adult Ratio)	<LLOQ	0.967, NA (NA) [h]	0.946, NA (NA) [h]
Mean Milk Ipilimumab Concentration [f] and Milk/Serum Mean Ratio			
Number serum and milk samples evaluated for Days 3, 7, 21	16, 15, 14	12, 12, 10	10, 9, 8
Adult PPD3 serum, milk µg/mL (Milk/Serum Mean Ratio)	<LLOQ, <LLOQ (NA)	84.5, 0.226 (0.003)	154, 0.407 (0.002)
Adult PPD7 serum, milk µg/mL (Milk/Serum Mean Ratio)	<LLOQ, <LLOQ (NA)	65.0, 0.142 (0.002)	112, 0.386 (0.003)
Adult PPD21 serum, milk µg/mL (Milk/Serum Mean Ratio)	<LLOQ, <LLOQ (NA)	35.7, 0.114 (0.004)	60.6, 0.177 (0.003)
No. Pregnant	20	19 [i]	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0
Adult Females (Continued):			
Pregnancy/Fetal Losses [j]			
Overall Loss (GD20-term) [k]	4/20 (20%)	5/19 (26.3%)	6/20 (30%)
First Trimester (GD20-50)	2/20 (10%)	1/19 (5.3%)	--
Second Trimester (GD51-100) [k]	2/20 (10%)	--	--

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Document Control Number: **(Continued)** **Test Article:** Ipilimumab

Study No.: DN10020

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30
Third Trimester (GD101-term)[k]	--	4/19 (21.1%)	6/20 (30%)
Third Trimester (GD140-term)[l]	--	3/19 (15.8%)	4/20 (20%)
No. Live Births: male,female	9,7	8,5	8,4
Mean Gestation Length of all Third Trimester Deliveries (Days)	159.9 ± 6.0	155.6 ± 12.5	150.8 ± 15.5
Mean Gestation Length of Live Births (Days)	159.9 ± 6.0	159.5 ± 9.5	154.8 ± 12.4
Gestation (GD0) through PPD182±1			
Clinical Observations (cage side) and Food Consumption	--	--	--
Postpartum Day 1 Observations (PPD1)	--	--	--
Body Weight	--	--	--
Embryo/Fetal Measurements by Ultrasound During Gestation	--	--	--
Adult Females (Continued):			
Gestation (GD0) through PPD182±1 (Continued)			
Serum Chemistry and Hematology	--	--	--
Flow Cytometry for Lymphocyte Phenotyping	--	--	--
Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)			
IgG, 72 hr Postdose, GD 125-127 (mg/mL)	14.73	17.59	20.91
Anti-Nuclear Antibody (ANA)	--	--	--
Adult Female Mortality			
Number Evaluated:			

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Document Control Number: **(Continued)** **Test Article:** Ipilimumab

Study No.: DN10020

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	10	30
Infant rejection/infant death [m]	3 (naïve) [m]	2	2	2
Aborted[l]	NA	4	3	4
Stillbirth[l]	NA	0	3	4
Gross Pathology	--	--	--	--
Histopathology	--	--	--	--[n]
Fetal evaluations:				
Number evaluated:				
Aborted (≥GD100), Stillborn (≥GD140), male, female	1,2 (naïve) [m]	0	3,2	4,2
Placenta/umbilical cord evaluation	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-
Infant Mortality (early death):				
Number evaluated (BD1 through BD15), male, female [o]:		1,1	3,0	2,2
Infant measurements and body weight		-	-	-
Organ weights		-	-	-
External and visceral evaluations		-	-	-
Heart evaluations		-	-	-
Histopathology		-	-	-[p]

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Document Control Number: **(Continued)** **Test Article:** Ipilimumab

Study No.: DN10020

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30
Infants (BD1 through BD182 ± 1):			
Number live births: male,female	9,7	8,5	8,4
Clinical Observations (cage side and detailed)	--	--	--
Body Weight (%[q]), BD1	336.08 g	--	-15*
Physical Examination/external assessment (head/body symmetry), BD1	--	--	--
Heart and respiration rates, BD1	--	--	--
Muscle tone assessment, BD1	--	--	--
Morphometric measures	--	--	--
Neurobehavioral assessment	--	--	--
Skeletal evaluation (radiographs)	--	--	--
Serum Chemistry and Hematology	--	--	--
Flow Cytometry for Lymphocyte Phenotyping	--	--	--
Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA)	--	--	--
TDAR to HBsAg and tetanus toxoid (antigen challenge)[r]	--	--	--
Anti-Nuclear Antibody (ANA)	--	--	--
Infants (BD1 through BD182 ± 1), Continued:			
Scheduled euthanasia (BD182 ± 1)			

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Document Control Number: **(Continued)** **Test Article:** Ipilimumab

Study No.: DN10020

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30
Number evaluated: male, female	8,6	5,5	6,2
Infant measurements and body weight	--	--	--
Organ weights	--	--	--
External and visceral evaluations	--	--	--
Heart evaluations	--	--	--
Histopathology	--	--	--

[a] Exceptions to GLPs included the following study elements: Characterization and stability testing of the test article was performed in compliance with the Good Manufacturing Practice (GMP) regulations (21 CFR Part 211), the milk toxicokinetic (TK) analysis was performed using a qualified non-GLP assay, the monkey chorionic gonadotropin (mCG) assay was conducted non-GLP by [redacted] microbiological culture of amniotic fluid or other tissues collected were performed in a non-GLP regulated environment by [redacted] In addition, a partial validation of the flow cytometry method using the CD45/CD4/CD8/CD25/FoxP3 antibody panel in cynomolgus monkey blood (EDTA) was conducted at [redacted] Study No. I-000059. The method was previously validated at [redacted] (Study Nos. 27491 and 27842) in cynomolgus monkey blood (EDTA). A partial validation was also conducted to obtain total lymphocyte counts determined using BD TruCount™ tubes which was previously validated at [redacted] (Study No. 27491). The partial validation was performed concurrent and an approved method was not available at study initiation. The results of the partial validation indicated the methods were valid.

[b] Values reported are with inclusion/exclusion of animals with sustained positive serum anti-ipilimumab antibodies.

[c] AUC(0-T) values reflect an average of AUC(0-504H) values and those with truncated AUCs because serum concentration values were less than LLOQ (0.800 µg/mL) of bioanalytical assay. T=168-504h.

[d] Drug-specific antibodies were evaluated using a validated bridging electrochemiluminescence (ECL) assay. All samples were analyzed in Tier 1 (screening). Samples that produced potentially positive results in Tier 1 were analyzed in Tier 2 (immunodepletion), and only samples that were confirmed positive in Tier 2 were analyzed in Tier 3 (titration) to determine the end point titer of the sample. Maternal samples were collected prestudy through PPD182 ± 1. Incidences shown indicate monkeys with robust, consistent, and/or sustained positive results. An additional 4 monkeys at 30 mg/kg had one time point each that met the positivity and confirmation criteria, but overall the titers were low in magnitude and were not observed during the post-partum period. In addition, 1 sample was positive only at pretest. There was no effect of these positive, titers on serum drug concentrations in these animals. Thus, these responses were notconsidered meaningful. In 3 of the 5 and 4 of the 5 sustained positive responses at 10 and 30 mg/kg, respectively, the ADA appeared to mildly to

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

significantly impact ipilimumab concentrations at 1 or more timepoints and/or overall exposures (either by acceleration of clearance or interference with detection of ipilimumab in the bioanalytical pharmacokinetic assay). There was no demonstrable relationship between ADA formation and pregnancy outcome.

[e] Positive ADA titers also noted in 2 infants; however, the ADA titers detected in these infants appear to have been maternal in origin and transferred prenatally based on the similar presence of ADA in the mothers and the magnitude and kinetics of the infant ADA titers (rapid elimination consistent with clearance of the drug levels. The presence of maternal antibodies in these animals did not appear to have any adverse effects on the infants.

[f] Mean concentration values were calculated with the inclusion of data from animals detected with anti-ipilimumab antibodies.

[g] Ratio values were calculated as the average of individual adult/infant (or serum/milk) concentration ratios.

[h] n=1 adult female (all other values were <LLOQ, 0.800 µg/mL); NA = Not applicable as all values were <LLOQ, 0.800 µg/mL.

[i] One female determined not pregnant by monkey chorionic gonadotropin (mCG) analysis and thus excluded from analysis.

[j] Number of losses/number of pregnancies (percent loss).

[k] Number excludes three fetal losses due to umbilical cord torsion/constriction (considered unrelated to ipilimumab).

[l] Fetal losses occurring prior to GD140 were considered abortions and those occurring on or after GD140 were considered stillbirths.

[m] Three naïve pregnant adult females (and their infants) were euthanized and a full necropsy conducted near the anticipated date of parturition or on the day of parturition (scheduled euthanasia). An adult female that rejected its infant or whose infant was euthanized prior to the scheduled terminal necropsy day (PPD182 ± 1) was euthanized (9 females). Three of these adult females (one at 10 mg/kg and two at 30 mg/kg) were not further evaluated (not shown in number evaluated). A full necropsy with gross and histopathology evaluation was conducted on the remaining 6 animals (2 each at 0, 10 and 30 mg/kg) as shown.

[n] There were no adverse histopathologic findings in adult females that could be definitively attributed to ipilimumab. However, mild glomerulopathy characterized by enlargement and distortion of glomeruli with accumulation of eosinophilic material, and periglomerular infiltrates were identified in the kidneys of one 30 mg/kg ipilimumab adult. While this finding was restricted to a single animal and had no clinical correlate, the well-recognized relationship of various types of glomerular pathology to chronic immune activation combined with the occurrence of this finding within the ipilimumab high-dose group suggested that a relationship to ipilimumab could not be completely ruled out. In addition, moderate mononuclear inflammation with consolidation or loss of glandular tissue was identified in the thyroid of one adult female in the 30 mg/kg ipilimumab group but not in controls. The severity of the inflammation, combined with its effect on the glandular elements was considered unusual, and despite its single incidence, the occurrence of this finding in the high-dose group suggested that a relationship to ipilimumab could not be completely ruled out.

[o] In 4 of the 9 mortalities (2, 1, 1 at 0, 10, and 30 mg/kg respectively), the cause of infant demise was clearly related to lack of maternal care, which is a background finding in primigravid cynomolgus monkeys. For the remaining 5 cases, the infants were moribund on BD1 (1 at 10 mg/kg), delivered at an early gestational age (<GD140) (1 at 10 mg/kg and 2 at 30 mg/kg), or had issues with injuries (1 at 30 mg/kg). Data included in table where applicable

[p] Developmental external or visceral abnormalities possibly related to ipilimumab were identified in the urogenital system of one female and one male 30 mg/kg early death infants (BD15 and BD2, respectively). The female had a visceral abnormality of unilateral agenesis of the left kidney and ureter. The male had an imperforate urethra with associated urinary obstruction and scrotal edema noted as increased thickness grossly.

[q] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

[r] Ipilimumab did not adversely affect the ability of infants to mount a TDAR to HBsAg. Mild enhancement of the group mean HBsAg-specific antibody response (1.6-1.8×) or the group mean tetanus toxoid-specific antibody response (1.6-2.3×) occurred following the Week 6 and/or Week 18 immunizations in infants born to mothers that received ipilimumab at 10 or 30 mg/kg.

Abbreviations: -- = No noteworthy findings, BD = Birth Day, GD = Gestation day, NA = Not applicable, PPD = Postpartum Day, TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response, <LLOQ = Below the lower limit of quantitation (0.800 µg/mL), *ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($p \leq 0.05$)

All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.16 Local Tolerance **Test Article:** Ipilimumab

Ipilimumab is administered intravenously in humans. The local tolerance of the drug product was assessed in the intravenous repeat-dose studies in monkeys with ipilimumab. Refer to the Tables 2.6.7.6 and 2.6.7.7A–E for specific information about these studies and injection site observations. No substantial injection-site irritation was observed in any of the studies.

Table 2.6.7.17A Tissue-Binding Studies

Test Article: Ipilimumab

Species/ Strain	Method of Administration	Concentrations (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Human	In vitro	2.5 or 10 µg/mL of fluoresceinated MDX-010 (10D1)	3 donors/tissue, comprehensive panel of tissues	MDX-010 specifically bound to lymphocytes expressing CTLA-4 in a few normal human tissues (tonsil, colon, and peripheral blood). No unanticipated cross-reactivities were observed.	[redacted]578/ 930009993
Human	In vitro	2 or 10 µg/mL of fluoresceinated MDX-010	3 donors/tissue, limited panel of tissues (blood, brain, colon, esophagus, small intestine, stomach, heart, kidney, liver, lung, skin, and tonsil)	MDX-010 specifically bound to lymphocytes expressing CTLA-4 in normal human tonsil, colon, esophagus, small intestine, stomach, lung, kidney, liver, and peripheral blood. No unanticipated cross-reactivities were observed.	[redacted]933/ 930010006

Abbreviations: M = male; F = female
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.17A Tissue-Binding Studies

Test Article: Ipilimumab

Species/ Strain	Method of Administration	Concentrations (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Mouse/CD-1, Rat/SD, Rabbit/ New Zealand White, Monkey/ Cynomolgus, Human	In vitro	1, 10 µg/mL biotinylated MDX-010	Tissues from at least 2M and/or 2F of each species, Sections of brain (cerebellum), gastrointestinal tract (colon-large intestine, esophagus, small intestine, stomach), heart, kidney, liver, lung, lymph node, ovary , pancreas, pituitary gland, placenta, skin, spleen, testes, thymus, and tonsil (rabbit, monkey, and human only)	BMS-734016 specifically bound not to tissues from mice, rats, and rabbits but to placenta, gastrointestinal tract, lymphoid system, and skin from cynomolgus monkeys and human, and to ovarian tissue from cynomolgus monkeys. No specific bindings to tissues from mice, rats, or rabbits were observed.	DS05067/ 930021297

Abbreviations: M = male; F = female
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.17B Other Toxicity Studies: Cytokine Release Studies

Test Article: Ipilimumab

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Human	In vitro	66 hours[a] 6 and 24 hours[b]	Ipilimumab and BMS-663513 (or positive control)[c] 0.016-50 μg/well for dry-coat assay[d] 0.08-250 μg/mL for the captured mAb assay[d] 2 μg/well IgG1 isotype control for dry coat assay 0.4 μg/mL IgG1 isotype control for antibody capture assay	10 donors	Using novel in vitro immobilization procedures (dry coat or antibody capture), in which ipilimumab and BMS-663513[c], either alone or in combination, were immobilized and exposed to human PBMC, indicated that ipilimumab alone induced minimal proliferation and corresponding cytokine release (primarily IL-2, IL-6, IL-8, and TNF-α at a much lower magnitude of mean peak stimulation indices or SI ranging from 2 to 6)in PBMC from some donors, as compared to the positive control anti-CD28 antibody 5.11A1 (mean SI up to 124), but that there was no additive or synergistic effect of ipilimumab in combination with BMS-663513.	930034490/ 930034490
Human	In vitro	4 or 24 hr[b]	0, 10, 100 μg/mL[e,f] 100 μg/mL IgG1 isotype control + 100 μg/mL IgG4 isotype control	10 donors	No substantial cytokine release from human PBMC was observed with ipilimumab using this soluble assay format, nor did the addition of MDX-1106 to ipilimumab produce an additive or synergistic effect.	MDX-1106/010-008-R / 930036361

[a] Incubation time for proliferation assessment.

[b] Incubation time for cytokine release assessment.

Abbreviations: PBMC = peripheral-blood mononuclear cells, IFN-γ = interferon gamma, IL = interleukin, TNF-α = tumor necrosis factor alpha
All footnotes are available as table end notes.

[c] Ipilimumab was tested alone (ie, with a control IgG4 isotype antibody) or in combination with BMS-663513 (immunostimulatory anti-CD137 monoclonal antibody). The mouse anti-human superagonistic CD28 mAb 5.11A1 (TGN1412 is the IgG4 humanized version of 5.11A1) was used as a positive control and comparator in these assays at the same concentrations as the test mAbs.

[d] Two immobilization assays were conducted, a dry-coat assay and a captured mAb assay. In the dry coat assay, test mAb (alone or in combination) was immobilized by dry coating it directly to the plates whereas in the captured mAb assay, the test mAb was immobilized by binding to anti-human immunoglobulin previously applied to the plates. Cytokines evaluated were IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, and IL-12.

[e] Ipilimumab was tested alone or in combination with MDX-1106 (immunostimulatory anti-PD-1 monoclonal antibody). The mouse anti-human CD3 mAb UCHT-1 was also used as a positive control and comparator in these assays at the same concentrations as the test mAbs.

[f] Test mAb was added in soluble (nonimmobilized) format (alone and in combination) to whole blood in the absence of exogenous antigenic stimuli.

Abbreviations: PBMC = peripheral-blood mononuclear cells, IFN-γ = interferon gamma, IL = interleukin, TNF-α = tumor necrosis factor alpha
All footnotes are available as table end notes.

Table 2.6.7.17C Other Toxicity Studies: Product Comparability Studies

Test Article: Ipilimumab

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No./ Document Control Number
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	Once monthly for 3 months Necropsy Day 79	10 MDX-[redacted][a]	3 M, 3 F	There were no substantial differences in Cmax or AUC parameters or immunogenicity of Process B ipilimumab compared to Process A.	[redacted]-1416-128/ 930009973
			0, 0.1, 1, 10 MDX-[redacted][b]			
		Once weekly for 10 weeks Necropsy Day 79	1 MDX-[redacted][b]			
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	1 day	10 Process B[c] Process C[d]	4 F	There were no substantial differences in Cmax or AUC parameters or immunogenicity of Process C ipilimumab compared to Process B.	DS07167/ 930032302

[a] [redacted] pilimumab (Process A).

[b] [redacted] pilimumab (Process B, development grade).

[c] Process B ([redacted]).

[d] A process of utilizing [redacted] and modifications to [redacted] processes.

Abbreviations: AUC = area under the plasma concentration-time curve , Cmax = maximum observed plasma concentration
All footnotes are available as table end notes.