第 2 部　CTD の概要

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

2.6.6　毒性試験の概要文
トレメリムマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.1.1 毒性試験プログラムの概要 5
2.6.6.1.2 動物種の選択 5
2.6.6.1.3 主な所見 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.2.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（試験 00-1985-06；GLP 非適用） 8
2.6.6.2.2 トレメリムマブのカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（試験 99-1985-01；GLP 適用） 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.3.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験及び 2 カ月間回復性試験（試験 00-1985-04；GLP 適用） 9
2.6.6.3.2 トレメリムマブのカニクイザルを用いた 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験（試験 2004-0150；GLP 適用） 11
2.6.6.4 遺伝毒性試験 13
2.6.6.5 がん原性試験 13
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 14
2.6.6.6.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験 2501-001；GLP 適用） 14
2.6.6.7 局所刺激性試験 15
2.6.6.8 その他の毒性試験 15
2.6.6.8.1 トレメリムマブの正常ヒト組織（試験 IM676；GLP 適用）及びカニクイザル組織（試験 IM645；GLP 適用）を用いた組織交差反応性試験 15
2.6.6.9 考察及び結論 16
2.6.6.10 参考文献 18

表目次

表 1 トレメリムマブの毒性試験 5
表 2 トレメリムマブのカニクイザル及びヒトにおける反復静脈内投与時の曝露量（平均 AUC [μg·hr/mL]） 7

表 3 試験 00-1985-06 の試験デザイン 8
表 4 試験 99-1985-01 の試験デザイン 9
表 5 試験 00-1985-04 の試験デザイン 10
表 6 試験 2004-0150 の試験デザイン 11
表 7 試験 2501-001 の試験デザイン 14
表 8 トレメリムマブのカニクイザルを用いた毒性試験における主な所見及び曝露量 17

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ADA	Antidrug antibody：抗薬物抗体
A/G	Albumin/Globulin：アルブミン／グロブリン
ALT	Alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ.
AST	Aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma/serum concentration-time curve：血漿/血清中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the plasma/serum concentration-time curve from time 0 to 24 hours：時間 0 から 24 時間後までの血漿/血清中薬物濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-Tlast}$	Area under the plasma/serum concentration-time curve from 0 to the time of last measurable concentration：時間 0 から濃度測定可能最終時点までの血漿/血清中薬物濃度-時間曲線下面積
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research：生物製品評価研究センター
CD	Cluster of differentiation：白血球分化抗原
C_{max}	Maximum observed concentration：最高血漿/血清中濃度
CRP	C-reactive protein：C 反応性蛋白
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated 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
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
FITC	Fluorescein isothiocyanate：フルオレセインイソチオシアネート
GD	Gestational Day：妊娠日
GGT	Gamma-glutamyl transferase：γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLP	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
HNSTD	Highest Non-Severely Toxic Dose：重篤な毒性が発現しない最大投与量
ICH	International Council for Harmonisation：医薬品規制調和国際会議
IgG2	Immunoglobulin G2：免疫グロブリン G2
IL	Interleukin：インターロイキン
IV	Intravenous(ly)：静脈内投与
PK	Pharmacokinetic(s)：薬物動態
SEA	Staphylococcal enterotoxin A：ブドウ球菌エンテロトキシン A
T3	Triiodo thyronine：トリヨウ素サイロニン
T4	Thyroxine：サイロキシン
TSH	Thyroid-stimulating hormone：甲状腺刺激ホルモン

2.6.6.1 まとめ

2.6.6.1.1 毒性試験プログラムの概要

トレメリムマブの非臨床安全性（トキシコキネティクスを含む）について、以下の試験により評価した。

表 1 トレメリムマブの毒性試験

Study Type	Study Number	Study Title	Species/ ROA	Study Site	GLP
Single dose toxicity	00-1985-06	CP-675,206 Single Dose Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	[redacted]	No
	99-1985-01	CP-675,206 Acute IV Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	[redacted]	Yes
Repeated dose toxicity	00-1985-04	CP-675,206 1 Month Intravenous Toxicity Study with a 2 Month Post-Dose Observation in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	[redacted]	Yes
	2004-0150	6-Month Intravenous Toxicity Study of CP-675,206 In Monkeys	Cynomolgus monkey/IV	[redacted]	Yes
Reproductive and developmental toxicity	2501-001	CP-675,206 Intravenous Embryo-Fetal Development Study in the Cynomolgus Monkey	Cynomolgus monkey/IV	[redacted]	Yes
Tissue Cross-Reactivity	IM676	Cross-Reactivity of CP-675,206 with Normal Human Tissues	Human tissue/ *In vitro*	[redacted]	Yes
	IM645	Cross-Reactivity of CP-675,206 with Normal Cynomolgus Monkey Tissues	Cynomolgus monkey tissue/ *In vitro*	[redacted]	Yes

CP-675,206 = tremelimumab; IV = intravenous; GLP = Good Laboratory Practice; ROA = route of administration.

本承認申請資料に記載したトレメリムマブの非臨床毒性試験は、切除不能な肝細胞癌の適応（デュルバルマブとの併用）に関する承認を目的としたものである。ICH S9 ガイドラインに従い、トレメリムマブとデュルバルマブの併用投与毒性試験は実施しなかった。本項では、非臨床安全性試験に用いた動物種の適切性及び毒性試験成績について要約する。各試験の報告書は第 4 部（モジュール 4）に収載した。

2.6.6.1.2 動物種の選択

トレメリムマブの非臨床安全性評価で使用する薬理学的に適切な動物種は、カニクイザルであると考えられた。トレメリムマブはアカゲザルの CTLA-4 にも結合するが、マウス、ラット、ハムスター及びウサギの CTLA-4 には結合しない（試験 15-CP -675,206、2.6.2.2.1.1 項）。トレメリムマブはヒトと同等の結合親和性でカニクイザルの CTLA-4 と結合し（試験 14-CP-675,206、2.6.2.2.1.1 項）、また、トレメリムマブはカニクイザルの活性化 T 細胞に結合する（試験 15-CP -675,206、2.6.2.2.1.1 項）。

トレメリムマブのカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で認められた一般状態変化や検査所見は、想定される薬理作用である CTLA-4 阻害によるリンパ球の持続的な活性化と一致するものであった（2.6.6.2 項及び 2.6.6.3 項）。このようにトレメリムマブの毒性試験の結果から、カニクイザルが薬理学的に適切な動物種であることが示されている。

2.6.6.1.3 主な所見

トレメリムマブをカニクイザルに静脈内投与したときに認められた毒性所見は、CTLA-4 阻害及びそれによるリンパ球の持続的な活性化並びに臨床的安全性の所見と一致するものであった。

単回投与毒性試験において、トレメリムマブを 100 mg/kg までの用量で静脈内投与したところ、下痢又は軟便の発現頻度及び発現回数の増加、並びに血中白血球数の可逆的な増加が認められ、これらの変化はトレメリムマブの薬理作用と一致するものであった。

カニクイザルを用いた 1 カ月間反復投与毒性試験（GLP 適用）において、トレメリムマブを 5、15 及び 50 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与したときに、投与期間中に間歇的な下痢又は軟便が一部の動物で用量依存的に認められた。これらの所見は、2 カ月間の回復期間中に 5 及び 15 mg/kg 群では完全に回復し、50 mg/kg 群では部分的に回復した。病理組織学的所見として、15 及び 50 mg/kg 群で肝臓門脈周囲の単核細胞浸潤がみられ、すべての用量で脾臓のリンパ組織過形成が認められたが、2 カ月間の休薬により完全又は部分的に回復した。以上の所見より、本試験におけるトレメリムマブの無毒性量は 5 mg/kg/週、HNSTD は 50 mg/kg/週と判断された。

カニクイザルを用いた 6 カ月間反復投与毒性試験（GLP 適用）において、トレメリムマブを 5、15 及び 50 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与したときに、一般状態変化及び高用量での明らかな状態悪化が認められた。一般状態変化として、消化管の慢性炎症を伴う持続性の下痢、食欲減退、体重減少、リンパ節腫脹、並びに皮疹、痂皮及び開放創がみられ、50 mg/kg 群では発現頻度及び重症度が最も高く、支持治療が必要であった。一般状態変化の発現頻度及び重症度は用量依存的であり、50 mg/kg 群では一般状態変化が認められたため、週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断し、動物愛護の観点から試験 44～79 日に 12 例中 7 例を早期安楽死させた。また、試験 79 日に 50 mg/kg 群の残りの動物及び回復性試験に割り付けていた対照群の動物を新たに 99 日間の回復性試験群とした。早期安楽死例で認められたトレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見の多くは免疫活性化に関連するものであり、トレメリムマブの作用機序と一貫するものであった。一般状態変化に関連した所見として、盲腸及び結腸の炎症、皮膚の単核細胞炎症並びに末梢リンパ節のリンパ組織過形成が認められた。病理組織学的所見として、脈絡叢、食道、結膜、心臓、肝臓、骨格筋、膵臓、上皮小体、下垂体、前立腺、唾液腺、甲状腺、舌及び子宮などの多数の器官で単核細胞浸潤及び炎症が認められたが、関連する一般状態変化はみられず、毒性所見とは判断されなかった。15 及び 50 mg/kg 群で、中等度から重度の甲状腺萎縮並びにこれに関連した甲状腺ホルモンの減少及び TSH の増加が認められた。トレメリムマブ投与に関連したすべての病理組織学的所見に関して、概ね回復又は回復傾向が認められた。

5 及び 15 mg/kg 群では、下痢又は軟便及び皮膚病変がみられたものの忍容性が認められ、持続性の下痢のために支持治療が必要となったのは、5 mg/kg 群の 1 例のみであった。これらの投与群でみられた皮膚病変は、50 mg/kg 群で観察された所見と比較して全般的に重症度が低く、投与の継続とともに回復した。5 mg/kg 群の 2 例（雌雄各 1 例）が、トレメリムマブ投与とは関連性のない影響により死亡又は安楽死に至った。雄 1 例は支持治療が必要となり、重度の急性下痢により試験 52 日に死亡した。また、当該動物ではトレメリムマブを投与された動物でみられる慢性炎症よりも急性感染症に典型的な腸潰瘍が認められた。雌 1 例は、トレメリムマブ投与とは関連性のない右腕骨折により試験 94 日に安楽死させた。50 mg/kg 群で認められた病理組織学的所見と同様、5 及び 15 mg/kg 群でも結腸、盲腸、皮膚及びリンパ節を含む多くの組織における単核

細胞浸潤及び炎症が認められた。これらの所見の重症度及び／又は発現頻度は、50 mg/kg 群に比べ低かった。

以上より、50 mg/kg 群で支持治療を必要とする一般状態変化がみられたこと及びすべての用量で単核細胞浸潤性炎症が認められたことから、6 カ月間反復投与毒性試験におけるトレメリムマブの無毒性量は特定できなかった。当該試験におけるトレメリムマブの HNSTD は 15 mg/kg/週と判断された。6 カ月間反復投与毒性試験における平均血漿中曝露量（$AUC_{0\text{-}168hr}$）とヒトで予定している治療用量（300 mg、体重 30 kg 以下の場合は 4 mg/kg）における AUC との比較を表 2 に示す。

胚・胎児発生への影響を評価するため、トレメリムマブを妊娠カニクイザルの器官形成期（妊娠 20 日～妊娠 50 日）に週 1 回静脈内投与する試験を実施した。この試験において、30 mg/kg までの投与によっても出生前死亡率、胎盤重量、胎児の体重、器官重量及び身体測定値、並びに内臓及び骨格検査への影響は認められなかった。以上のように、トレメリムマブを器官形成期に静脈内投与した結果、母動物毒性、発生毒性及び催奇形性は認められなかった。

トレメリムマブの組織交差反応性について、正常ヒト組織及びカニクイザル組織を用いて評価した。ヒト及びカニクイザルともに、トレメリムマブに特異的な免疫染色が、扁桃、リンパ節、脾臓及び（非退縮）胸腺を含む種々のリンパ系組織のほか、消化管（大腸[結腸]及び胃）の粘膜下リンパ小節を含む粘膜関連組織に認められた。ヒト及びカニクイザルの組織でみられた組織交差反応性には高度な類似性が認められ、文献等で報告されているヒト組織内での CTLA-4 の免疫組織化学的分布とも一致した。

表 2　トレメリムマブのカニクイザル及びヒトにおける反復静脈内投与時の曝露量（平均 AUC [µg·hr/mL]）

Dose (mg/kg/week)	AUC (µg·hr/mL) [SD]	
	Monkey [a] 6-Month Repeat-Dose	Human [c, d]
4[b]		19104 [4872]
5	13200 [2500]	
15 HNSTD	33900 [3000]	
50	121000 [18000]	

AUC = area under the concentration-time; HNSTD = highest non-severely toxic dose; SD = standard deviation

[a] AUC from 0 to 168 hours

[b] Human dose of 300 mg is equivalent to 4 mg/kg assuming a 75 kg subject.

[c] The tremelimumab population PK analysis was based on a pooled dataset including 8 clinical trials: D4190C00002 (Phase 1), D4190C00006 (Phase 1b), D4190C00010 (Phase 1), D4880C00003 (DETERMINE, Phase 2b), D4884C00001 (BASKET, Phase 2), D419MC00004 (POSEIDON, Phase 3), D419CC00002 (HIMALAYA, Phase 3) and D4190C00022 (Study 22, Phase 1/2). The studied dose range was 1-10 mg/kg, or 75 to 750 mg Q4W or every 12 weeks (Q12W) or a 300 mg single priming dose from study D419CC00002.

[d] Derived AUC from the dosing interval (Cycle 1, 0-28 days); converted from µg·day/mL.

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（試験 00-1985-06；GLP 非適用）

本試験の目的は、カニクイザル（雌雄各 1 例）にトレメリムマブを 10 mg/kg の用量で単回静脈内（ボーラス）投与したときの薬物動態、薬力学及び忍容性を評価することであった。試験 00-1985-06 の試験デザインを表 3 に示す。

表 3 試験 00-1985-06 の試験デザイン

Group Number	Number of Animals (M/F)	ROA	Dose Level (mg/kg)	Number of Animals Necropsied (M/F)
1	1/1	IV	10	N/A[a]

M = male; F = female; ROA = route of administration; IV = intravenous; N/A = not applicable
a. Animals were returned to colony

2 例のカニクイザルにおけるトレメリムマブの全身曝露量は同程度であり、C_{max} は 242～295 µg/mL、$AUC_{0\text{-}tlast}$ は 30876～40237 µg·hr/mL の範囲であった。試験終了時（試験 86 日）までに雄におけるトレメリムマブの曝露量は PK 測定の定量下限に達しなかったことから、この動物の血漿サンプルは抗トレメリムマブ抗体の有無の評価には使用しなかった。雌では、中和抗トレメリムマブ抗体及び総抗トレメリムマブ抗体が投与後 26 日以降に検出された。薬力学活性を検討するため、SEA アッセイにより IL-2 産生に対するトレメリムマブの影響を調べた。トレメリムマブの薬理作用と符合して、SEA アッセイにおける IL-2 産生の増加が、両方の動物で静脈内投与後 0.5 時間より認められ、試験開始前値より高い値が試験期間を通して持続した。また、雄では試験 6 及び 13 日に約 1.5 倍のリンパ球数増加がみられたが、雌では認められなかった。トレメリムマブの 10 mg/kg 投与によっても、一般状態、摂餌量及び体重への影響は認められなかった。

2.6.6.2.2 トレメリムマブのカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（試験 99-1985-01；GLP 適用）

本試験の目的は、カニクイザルにトレメリムマブを単回静脈内（ボーラス）投与したときの局所毒性及び全身毒性を評価することであった。1 群雌雄各 3 例に、トレメリムマブを 10、30 及び 100 mg/kg の用量で、試験 1 日に静脈内投与した。対照群の雌雄各 3 例には、媒体（20 mM 酢酸ナトリウム、140 mM 塩化ナトリウム、0.2 mg/mL ポリソルベート 80［pH 5.5］）を投与した。対照群及び 100 mg/kg 群の計画剖検を、試験 106 日に実施した。対照群及び 100 mg/kg 群について病理組織学的検査を行った後、10 及び 30 mg/kg 群の動物はコロニーに戻した。試験 99-1985-01 のデザインを表 4 に示す。

表 4 試験 99-1985-01 の試験デザイン

Group Number	Number of Animals (M/F)	ROA	Dose Level (mg/kg)	Number of Animals Necropsied (Day 106) (M/F)
1	3/3	IV	0 (vehicle)	3/3
2	3/3	IV	10	N/A[a]
3	3/3	IV	30	N/A[a]
4	3/3	IV	100	3/3

M = male; F = female; ROA = route of administration; IV = intravenous; N/A = not applicable
a. Animals were returned to colony
Vehicle was 20 mM sodium acetate, 140 mM NaCl, 0.2 g/L polysorbate 80, pH 5.5

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}tlast}$ を指標としたトレメリムマブの全身曝露量は、ほぼ用量依存的に増加し、曝露量の明らかな性差は認められなかった。10、30 及び 100 mg/kg 群の平均 C_{max} 値はそれぞれ 251.16、688.37 及び 2967.30 µg/mL、平均 $AUC_{0\text{-}tlast}$ 値はそれぞれ 29000、66900 及び 209000 µg·hr/mL であった。総抗トレメリムマブ抗体及び中和抗トレメリムマブ抗体が、100 mg/kg 群の雌 1 例を除くすべてのトレメリムマブ投与動物で検出された。

トレメリムマブ投与により、下痢又は軟便の発現頻度及び発現回数が用量依存的に増加したが、これらの変化に伴う体重や摂餌量の変化は認められなかったことから、毒性所見とは判断しなかった。心電図、血圧、呼吸数、体温及び血清生化学的検査値の変化は認められなかった。血液学的検査では、30 及び 100 mg/kg 群の雌雄でリンパ球数増加が試験 8 日以降にみられ、すべての投与群の雌及び 100 mg/kg 群の雄で試験 15 日以降に好酸球数増加がみられた（個々の動物の試験開始前平均値との比較）。すべての血液学的検査値は、30 及び 100 mg/kg 群の雌における好酸球数の増加を除き、試験終了時（試験 106 日）には試験開始前値（平均値）と同程度になった。さらに、試験 106 日に剖検した 100 mg/kg 群の動物では、トレメリムマブ投与に関連した肉眼所見や病理組織学的所見はみられなかった。

以上のように、トレメリムマブを 100 mg/kg までの用量で単回静脈内投与したとき、下痢又は軟便の用量依存的な増加、及び薬理作用に起因した可逆的な血液学的検査値の変化が認められた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験及び 2 カ月間回復性試験（試験 00-1985-04；GLP 適用）

本試験の目的は、カニクイザルにトレメリムマブを 1 カ月間反復投与したときの局所毒性及び全身毒性を評価することであった。1 群雌雄各 5 例に、トレメリムマブを 5、15 及び 50 mg/kg の用量で、週 1 回（試験 1、8、15、22 及び 29 日）静脈内（ボーラス）投与した。対照群の雌雄各 5 例には、媒体（20 mM 酢酸ナトリウム、140 mM 塩化ナトリウム、0.2 mg/mL ポリソルベート 80［pH 5.5］）を同様の投与スケジュールで投与した。計画剖検を試験 30 日（1 群雌雄各 3 例）及び 2 カ月間の回復期間後（試験 105 日；1 群雌雄各 2 例）に実施した。試験 00-1985-04 の試験デザインを表 5 に示す。

表 5 試験 00-1985-04 の試験デザイン

Group Number	Number of Animals (M/F)	ROA	Dose Level (mg/kg/week)	Number of Animals Necropsied (M/F)	
				Day 30	Day 105
1	5/5	IV	0 (vehicle)[a]	3/3	2/2
2	5/5	IV	5	3/3	2/2
3	5/5	IV	15	3/3	2/2
4	5/5	IV	50	3/3	2/2

M = male; F = female; ROA = route of administration; IV = intravenous

a. Vehicle was 20 mM sodium acetate, 140 mM NaCl, 0.2 mg/ml polysorbate 80, pH 5.5.

C_{max} 及び AUC_{0-24} を指標とした試験 1 及び 29 日のトレメリムマブの全身曝露量は用量とともに増加し、曝露量の明らかな性差は認められなかった。いずれの用量においても、試験 1 日の平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-24} は試験 29 日の値より低く、反復投与による薬物の蓄積が確認された。5、15 及び 50 mg/kg 群における試験 1 日から 30 日にかけての $AUC_{0-tlast}$（平均値）は、それぞれ 69500、186000 及び 590000 µg·hr/mL であったのに対し、試験 1 日から投与後観察期間終了時までの $AUC_{0-tlast}$（平均値）は、それぞれ 88600、210000 及び 775000 µg·hr/mL であった。サルの総抗トレメリムマブ抗体及び中和抗トレメリムマブ抗体の評価は、曝露量が定量下限に到達した動物のみについて実施した。総抗トレメリムマブ抗体及（2 例を除く）び中和抗トレメリムマブ抗体が評価したすべての動物で検出された。

全例とも試験終了時まで生存した。トレメリムマブ投与に関連した一般状態変化として、間歇的な下痢又は軟便が投与期間中、すべてのトレメリムマブ投与群で用量依存的に認められた。また、50 mg/kg 群の雄 2 例では支持治療（補液投与）が必要となった。2 カ月間の回復期間中、下痢又は軟便が 50 mg/kg 群の動物のみに認められた。体重、摂餌量、眼科学的検査、身体検査、心電図検査、血圧測定、尿検査、器官重量及び剖検においては、トレメリムマブ投与に関連した変化は認められなかった。血液学的検査では、試験 15 日以降に、トレメリムマブの薬理作用によると考えられる末梢血リンパ球（絶対数及び比率）の増加がみられ、5 及び 15 mg/kg 群では増加傾向が、50 mg/kg 群では統計学的有意差が認められた。これらの変化に伴って、15 mg/kg 以上の群では $CD3^+CD4^+$ T 細胞の増加が、50 mg/kg 群では $CD3^+$ T 細胞及び $CD20^+$ B 細胞の増加がみられ、すべての投与動物で同様の傾向が認められた。また、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットのごく軽微な減少が 50 mg/kg 群の雄にみられた。これらのパラメータは、いずれも 2 カ月間の回復期間終了時には投与開始前値にまで回復した。

試験 30 日の剖検後の病理組織学的検査において、トレメリムマブ投与に関連した変化が肝臓、脾臓及び腸間膜リンパ節に認められた。肝臓では、主に胆管周囲における少数のマクロファージ及び多形核細胞を伴ったリンパ球の浸潤を特徴とする、門脈周囲でのごく軽微から軽度の単巣性ないし多巣性の混合型単核細胞浸潤が、15 mg/kg 群の雌雄各 3 例中 1 例及び 50 mg/kg 群の雌雄各 3 例中 2 例に認められた。GGT、総ビリルビン及び胆汁酸の値には変化はみられず、門脈機能障害を示唆するデータは認められなかった。15 mg/kg 群の 2 例で散発的な ALT 及び AST の増加がみられたが、関連する病理組織学的所見が認められなかったことから、トレメリムマブ投与との関連性はないと考えられた。脾臓では、リンパ系細胞による胚中心ないしマントル帯及び辺縁帯の拡張を特徴とする、ごく軽微から軽度のリンパ組織過形成が 5 mg/kg 群の雄 3 例中 1 例及び 50 mg/kg 群の全例に認められた。腸間膜リンパ節では、ごく軽微なリンパ組織過形成が 50 mg/kg 群の全例にみられ、その特徴はリンパ濾胞及び胚中心の拡張並びに／又は傍皮質領域、髄索及び類洞におけるリンパ系細胞の増加であった。免疫組織化学的検査により、脾臓及び

リンパ節のリンパ組織過形成に付随して、抗 CD3、抗 CD4、抗 CD79a 及び／又は抗 CD25 抗体の染色性増加がみられ、T 細胞数及び B 細胞数の増加が示唆された。

2 カ月間の回復期間後の試験 105 日に実施した剖検において、肝臓門脈周囲の混合型単核細胞浸潤が 15 mg/kg 群の雄 2 例中 1 例及び 50 mg/kg 群の雄 2 例中 2 例で引き続き観察され、細胞浸潤の発現頻度や程度には変化は認められなかった。2 カ月間の回復期間後の雌では、いずれの用量においても門脈周囲の混合型単核細胞浸潤はみられなかった。ごく軽微なリンパ組織過形成が、試験 105 日に 15 mg/kg 群の雄 2 例中 1 例の脾臓で観察され、5 mg/kg 群の雌 2 例中 1 例でも腸間膜リンパ節で認められた。

以上のように、トレメリムマブを 5、15 又は 50 mg/kg の用量で週 1 回、1 カ月間静脈内（ボーラス）投与したとき、すべての投与群の一部の動物で投与期間中に間歇的な下痢又は軟便が観察され、2 カ月間の回復期間には 50 mg/kg 群の一部の動物のみに認められた。トレメリムマブ投与に関連して、15 及び 50 mg/kg 群で薬理作用によると考えられる末梢血リンパ球（絶対数及び比率）の可逆的な増加がみられ、それに伴い血中 T 細胞及び B 細胞の増加が認められた。病理組織学的検査では、トレメリムマブ投与に関連した肝臓門脈周囲の単核細胞浸潤が 15 及び 50 mg/kg 群でみられ、2 カ月間の回復期間後には雌で回復がみられたが、雄では回復が認められなかった。更に、脾臓及び腸間膜リンパ節のリンパ組織過形成がすべての用量で認められた。これらの変化はトレメリムマブの薬理作用によるものと考えられ、2 カ月間の回復期間後に回復又は回復傾向が認められた。以上の結果より、本試験におけるトレメリムマブの無毒性量は 5 mg/kg/週、HNSTD は 50 mg/kg/週と判断された。

2.6.6.3.2 トレメリムマブのカニクイザルを用いた 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験（試験 2004-0150；GLP 適用）

本試験の目的は、カニクイザルにトレメリムマブを 6 カ月間反復投与したときの局所毒性及び全身毒性を評価することであった。1 群雌雄各 4 例に、トレメリムマブを 5、15 及び 50 mg/kg の用量で、試験 1 日から 176 日まで週 1 回、計 26 回にわたり静脈内（ボーラス）投与した。対照群の雌雄各 4 例には、媒体（20 mM 酢酸ナトリウム、140 mM 塩化ナトリウム、0.2 mg/mL ポリソルベート 80［pH 5.5］）を同様の投与スケジュールで投与した。対照群及び 50 mg/kg 群には、1 群雌雄各 2 例を追加し、最終投与後に 2 カ月間の回復期間を設けた。計画剖検を、試験 177/178 日（1 群雌雄各 4 例）及び 2 カ月間回復期間後の試験 246 日（1 群雌雄各 2 例）に実施した。試験 2004-0150 の試験デザインを表 6 に示す。

表 6　試験 2004-0150 の試験デザイン

Group Number	Number of Animals (M/F)	ROA	Dose Level (mg/kg/week)	Number of Animals Necropsied (M/F)		
				Day 44-79[b]	Day 177/178[b]	Day 246[b]
1	6/6	IV	0 (vehicle)[a]	--	6/6	--
2	4/4	IV	5	--	3/3[c,d]	--
3	4/4	IV	15	--	4/4	--
4	6/6	IV	50[b]	4/4[b]	2/2	--

M = male; F = female; ROA = route of administration; IV = intravenous

a. Vehicle was 20 mM sodium acetate, 140 mM NaCl, 0.2 mg/ml polysorbate 80, pH 5.5.

b. Due to severe adverse effects, Group 4 animals only received 6 or 7 weekly doses. One male was last dosed on Day 37 and the remainder of the group was last dosed on Day 43 or 44 for females or males, respectively. Following cessation of dosing, 4 animals/sex were terminated between Days 44 to 79 due to poor clinical condition. On Day 79, the remaining 2 animals/sex at 50 mg/kg and the 2 control animals intended for the recovery phase were placed into a newly designated 99-day treatment-free period, and terminated Day 177/178.

c. One male was found dead on Day 52 due to severe peracute diarrhoea that was considered due to an acute infection and not directly related to treatment with tremelimumab.
d. One female was euthanized on Day 94 due to a non-treatment-related compound fracture of the right arm.

トレメリムマブ投与に関連した有害な一般状態変化として、持続性の下痢、食欲減退、体重減少及び皮膚状態悪化がみられ、50 mg/kg 群では発現時期がより早く、発現頻度及び重症度が最も高かった。この投与群の 6 例では支持治療（補液投与）が必要となった。この用量でみられた皮膚病変は、眼瞼腫脹、皮膚の乾燥、ひび割れ、鱗状化又は硬化、皮疹又は皮膚発赤、痂皮部位及び皮膚黄色化を伴う開放創であった。これらの皮膚病変は、5 及び 15 mg/kg 群と比較して発現時期が早く（試験 33～79 日）、発現頻度はより高かった（12 例中 9 例）。一般状態変化がみられたため、50 mg/kg 群では週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断した。50 mg/kg 群の一部の動物では投与中止後数週間で一般状態が改善せず、16～35%の体重減少がみられたため、動物愛護の観点から 12 例中 7 例（雄 4 例、雌 3 例）を試験 44～79 日に安楽死させた。50 mg/kg 群の 4 例目の雌は比較的良好な状態であったが、試験 79 日に安楽死させ、この群の残りの動物（雌雄各 2 例）及び試験開始時に回復性試験に割り付けられた対照群の動物（雌雄各 2 例）について、新たに 99 日間の回復期間を設け、試験 177/178 日に剖検した。

5 及び 15 mg/kg 群における一般状態変化は概して発現頻度及び重症度がより低く、持続性の下痢のために支持治療が必要となったのは 5 mg/kg 群の 1 例のみであった。5 mg/kg 群の雌 1 例及び 15 mg/kg 群の雄 1 例で皮膚病変として全身性の瘤及び痂皮が試験後半に認められたが、投与の継続とともに回復した。5 mg/kg 群の 2 例（雌雄各 1 例）が早期死亡又は安楽死に至った。雄 1 例は重度の急性下痢により試験 52 日に死亡が発見された。当該動物では、持続性の下痢がみられたため補液投与を行ったが、病理組織学的検査で腸に潰瘍性変化が認められた。この病変はトレメリムマブ投与動物に典型的な慢性炎症ではなく、急性感染症で一般的にみられるものであることから、当該動物の死亡はトレメリムマブに直接関連するものではないと考えられた。また、雌 1 例は、トレメリムマブ投与と関連のない右前肢の開放骨折のため試験 94 日に安楽死させた。残りの動物は、いずれも計画剖検時まで生存した。眼科学的検査、心電図検査及び尿検査においては、トレメリムマブ投与に関連した変化は認められなかった。トレメリムマブの薬理作用と一致した、投与に関連した変化として一過性の白血球数、すなわち $CD3^+$リンパ球数（主に $CD3^+CD4^+$ T リンパ球、やや少ない $CD3^+CD8^+$ T リンパ球）の増加が、特に 15 mg/kg 群の雄及び 50 mg/kg 群の雌雄に認められた。血中リンパ球数は、試験 30 日には試験開始前のレベルまで減少する傾向がみられたが、その後のサンプル採取時点では個体間の変動が認められた。トレメリムマブ投与に関連した血清生化学的変化として、A/G 比の低下が 50 mg/kg 群でみられ、グロブリンのごく軽度の増加を反映していた。また、甲状腺ホルモン値（T3 及び T4）の減少及びそれに対応する TSH の増加が、15 mg/kg 群の雌 1 例及び 50 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。これらの変化に伴って、病理組織学的検査では中等度から重度の甲状腺萎縮が観察された

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ を指標とした試験 1 及び 29 日のトレメリムマブの全身曝露量は、5～50 mg/kg の用量範囲でほぼ用量に比例して増加し、曝露量の明らかな性差は認められなかった。試験 1 日には、用量の 3 倍（5 mg/kg から 15 mg/kg）及び 10 倍（5 mg/kg から 50 mg/kg）の増加に伴って、C_{max} はそれぞれ 2.9 倍及び 9.7 倍に増加し、$AUC_{0\text{-}24}$ はそれぞれ 2.8 倍及び 9.6 倍に増加した。試験 29 日には、用量の 3 倍及び 10 倍の増加に伴って、C_{max} はそれぞれ 2.2 倍及び 8.7 倍に、$AUC_{0\text{-}24}$ はそれぞれ 1.8 倍及び 8.5 倍に増加した。最後に、試験 176 日には、用量の 3 倍の増加に伴って、C_{max} は 2.3 倍に、$AUC_{0\text{-}24}$ は 2.0 倍に増加した。50 mg/kg 群の動物では、試験 43/44 日に投与を中断した後も、試験 79 日の途中剖検時まで、引き続き測定可能なトレメリムマブの曝露が認められた。新たに設定した 99 日間の回復性試験群において、4 例中 2 例では血中トレメリムマブ濃度が試験 49 日に定量下限に達したが、残りの 2 例では最終サンプル採取時まで引き続きトレメリムマブが検出された。5 mg/kg 群の 1 例、15 mg/kg 群の 4 例及び 50 mg/kg 群の

2 例ではサル抗ヒト抗体の形成によりトレメリムマブの曝露が制限されたが、曝露量には大きな変化は認められなかった。

トレメリムマブ投与に関連した剖検所見は、50 mg/kg 群における皮膚病変及びすべての投与群で認められたリンパ節腫大の発現頻度の用量依存的な増加のみであった。器官重量の変化として、絶対肝臓重量の増加が 5 mg/kg 群の雌で、肝臓重量体重比（%）及び脳重量比（%）の増加が 5 及び 15 mg/kg 群で、対照群と比較して認められた。病理組織学的検査では、肝臓門脈周囲の単核細胞浸潤の発現頻度増加が 5 及び 15 mg/kg 群でみられたが、これにより肝臓重量増加が説明できる可能性は低いと考えられた。投与により認められたその他の病理組織学的所見の多くは免疫活性化に関連するものであり、全体的にトレメリムマブの薬理作用と符合する。50 mg/kg 群でみられた一般状態変化に関連した病理組織学的所見として、盲腸及び結腸の炎症、皮膚の単核細胞炎症並びに末梢リンパ節のリンパ組織過形成が認められた。これらの所見は 5 及び 15 mg/kg 群でも認められ、トレメリムマブ投与に関連した所見であるが、発現頻度及び重症度がより低かった。トレメリムマブ投与群の全例において、用量に依存した単核細胞浸潤及び炎症の発現頻度増加が、膵外分泌腺、副腎、脈絡叢、結膜、食道、心臓、腎臓、肝臓（門脈域）、乳腺、骨格筋、皮膚、上皮小体、下垂体、前立腺、唾液腺、甲状腺、舌及び子宮を含む多くの器官で観察された。すべてのトレメリムマブ投与動物で末梢リンパ節及び骨髄のリンパ組織過形成がみられた。また、15 及び 50 mg/kg 群で脾臓のリンパ組織過形成が観察された。トレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見は 99 日間の回復期間後に概ね回復したが、軽微な唾液腺の炎症が 4 例中 1 例に、皮膚の軽微な炎症が 4 例中 3 例に認められた。

以上のように、トレメリムマブを 50 mg/kg の用量で静脈内投与したところ、有害な一般状態変化（持続性の下痢、皮膚病変）がみられ、支持治療が必要となったため、週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断し、当該用量におけるすべての動物（回復性試験群を除く）を試験 44～79 日に安楽死させた。5 及び 15 mg/kg 群における一般状態変化の発現頻度及び重症度はより低く、持続性の下痢のために支持治療が必要となったのは 5 mg/kg 群の 1 例のみであった。投与に関連した病理組織学的所見は免疫活性化に関連するものと考えられ、可逆的な変化であり、トレメリムマブの薬理作用と一致するものであった。一般状態変化に関連した病理組織学的所見として、盲腸及び結腸の炎症、皮膚の単核細胞炎症並びに末梢リンパ節のリンパ組織過形成が認められた。これらの所見に加えて、多くのリンパ系組織及び非リンパ系組織における用量に関連した単核細胞浸潤及び炎症の発現頻度増加が認められた。これらの所見はトレメリムマブの薬理作用と一致するものと考えられ、回復又は回復傾向が認められた。トレメリムマブ投与により、50 mg/kg 群では支持治療を必要とする一般状態変化（持続性の下痢、皮膚病変）が認められたこと及び全ての用量で単核細胞浸潤性炎症が認められたことから、本試験においてトレメリムマブの無毒性量は特定できなかった。本試験における HNSTD は 15 mg/kg/週と判断された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

トレメリムマブは高分子タンパク質であり、核膜やミトコンドリア膜を通過せず、DNA やその他の染色体物質との直接的な相互作用を示さないと考えられることから、ICH S6（R1）ガイドラインに従い、トレメリムマブの遺伝毒性試験は実施しておらず、実施する予定もない。

2.6.6.5 がん原性試験

ICH S6（R1）及び ICH S9 ガイドラインに従い、トレメリムマブの特性及び予定している臨床適用を考慮し、トレメリムマブのがん原性試験は実施しておらず、実施する予定もない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 トレメリムマブのカニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験 2501-001；GLP 適用）

本試験の目的は、妊娠カニクイザルの器官形成期にトレメリムマブを投与したときの胚毒性及び催奇形性を評価することであった。妊娠カニクイザル 64 例を 4 群（各群 16 例）に割り付け、トレメリムマブを 5、15 又は 30 mg/kg の用量で妊娠確認日（妊娠 20 日）から器官形成期（妊娠 20～50 日）を通して週 1 回、すなわち妊娠 20、27、34、41 及び 48 日に投与した。対照群には、媒体（0.0564% L-ヒスチジン、0.0343% L-ヒスチジン塩酸塩、8.4% α-トレハロース二水和物、0.02%ポリソルベート 80）を同様の投与スケジュールで投与した。妊娠 48 日の最終投与の後も動物を飼育し、妊娠 100 ± 1 日に帝王切開を実施して胎児検査を行った。試験 2501-001 の試験デザインを表 7 に示す。

表 7 試験 2501-001 の試験デザイン

Group Number	Number of Animals (F)	ROA	Dose Level (mg/kg/week) During the Period of Organogenesis (GD 20-GD 50)	Number of Live Foetuses at Caesarean Section (GD 100 ± 1)
1	16	IV	0 (vehicle)[a]	13
2	16	IV	5	12
3	16	IV	15	14
4	16	IV	30	12

F = female; IV = intravenous; ROA = route of administration; GD = gestation day

a. Vehicle was 0.0564% L-histidine, 0.0343% L-histidine HCl, 8.4% α-trehalose dihydrate, 0.02% polysorbate 80

C_{max} 及び AUC_{0-24} を指標とした妊娠 20 及び 48 日の妊娠動物におけるトレメリムマブの全身曝露量は、5 mg/kg から 30 mg/kg への用量増加に伴って、ほぼ用量依存的に増加した。妊娠 20 日の初回投与後には 6 倍の用量増加（5 mg/kg から 30 mg/kg）に伴って、C_{max} 及び AUC_{0-24} がそれぞれ 6.2 倍及び 6.6 倍に増加し、妊娠 48 日の最終投与後では同パラメータがそれぞれ 6.6 倍及び 6.5 倍に増加した。

試験期間中に予期せぬ死亡例は認められず、トレメリムマブ投与に関連した一般状態変化として、対照群に比べて下痢の発現頻度の軽微な上昇のみが認められた。妊娠母動物において体重、膣垢検査、胎盤の重量及び外観、並びに流産率／出生前死亡率にトレメリムマブ投与に関連した影響は認められなかった。帝王切開後の胎児検査では、胎児体重、外表、内臓及び骨格検査、並びに器官重量において、トレメリムマブ投与に関連した影響は認められなかった。

以上のように、妊娠カニクイザルの器官形成期（妊娠 20～50 日）にトレメリムマブを 5、15 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した結果、母動物毒性、発生毒性及び催奇形性は認められなかった。したがって、本試験におけるトレメリムマブの無毒性量は検討した最高用量である 30 mg/kg/週と判断された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

トレメリムマブの静脈内投与による局所刺激性について、単回投与毒性試験（2.6.6.2 項）及び反復投与毒性試験（2.6.6.3 項）の一環として評価した。これらの試験における注射部位の観察及び病理組織学的評価では、トレメリムマブ投与に関連した注射部位の変化は認められなかった。なお、トレメリムマブ又は媒体を投与した動物の一部でみられた注射部位の局所変化は、概ね投与手技によるものであり、トレメリムマブ又は媒体に関連したものではないと考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 トレメリムマブの正常ヒト組織（試験 IM676；GLP 適用）及びカニクイザル組織（試験 IM645；GLP 適用）を用いた組織交差反応性試験

GLP 適用の組織交差反応性試験（2 試験）を実施し、トレメリムマブの正常ヒト組織（試験 IM676）及び正常カニクイザル組織（試験 IM645）に対する交差反応性を評価した。ヒト及びカニクイザルの組織パネルには、欧州委員会指令 75/318/EEC「モノクローナル抗体の作製及び品質管理」の別冊 II にある「モノクローナル抗体の交差反応性の免疫組織化学的又は細胞化学的検討のために使用するヒト組織の推奨リスト」に収載されているすべての組織が含まれる。また、1997 年に米国 FDA/CBER から発出された「ヒト使用のためのモノクローナル抗体製品の製造及び試験における考慮すべき点」で推奨されているすべての組織が含まれる。蛍光標識したトレメリムマブ（トレメリムマブ-FITC）に加えて、アイソタイプが同じ陰性対照抗体（HuIgG2-FITC）についても、同じ組織に対するスクリーニングを実施した。

トレメリムマブ-FITC 及び HulgG2-FITC を 12 及び 4 μg/mL の濃度で、正常なヒト及びカニクイザルの組織の凍結切片に適用した。トレメリムマブ-FITC 及び HulgG2-FITC は、陰性対照組織としたヒトの脳（小脳）には結合しなかった。一方、陽性対照組織（ヒト扁桃腺）ではリンパ球へのトレメリムマブ-FITC の結合が観察されたが、HulgG2-FITC では結合は認められなかった。更に、トレメリムマブ-FITC 又は HulgG2-FITC を染色反応から除外した場合（アッセイコントロール）、特定の染色反応はみられなかった。

ヒト及びカニクイザルの組織において、トレメリムマブに特異的な染色が、扁桃、リンパ節、脾臓及び（非退縮）胸腺を含む種々のリンパ系組織に認められた。ヒト及びカニクイザルのいずれにおいても、特異的な染色が、消化管（大腸、小腸及び／又は胃）の粘膜下リンパ小節を含む粘膜関連リンパ系組織のリンパ球においても、稀に又は散発的に認められた。ドナー1 例から採取したヒト組織では、非リンパ系組織（甲状腺）の小型間質リンパ小節においても稀にリンパ球が染色された。トレメリムマブによって染色された細胞は、その典型的な形態及びそれぞれの組織内での位置（例えば T:B リンパ球相互作用に関連する部位、特にリンパ濾胞の明帯）からリンパ球と判断された。

以上より、ヒト及びカニクイザルの組織でみられた組織交差反応性は高度に類似性があり、ヒトにおける CTLA-4 の免疫組織化学的分布（Xerri et al 1997, Alegre et al 1998, Vandenborre et al 1998）と一貫するものと考えられた。

2.6.6.9 考察及び結論

切除不能な肝細胞癌の適応に関する承認を目的とし、トレメリムマブの非臨床毒性試験としてカニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（2 試験）、最長 6 カ月間の反復静脈内投与毒性試験、及び静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験を実施した。更に、正常ヒト及びカニクイザル組織を用いた組織交差反応性試験（2 試験）を実施した。

組織交差反応性試験において、トレメリムマブは CTLA-4 発現細胞を含むと考えられる組織中の細胞のみに結合した。単回及び反復投与毒性試験では、いずれの用量においても心電図検査パラメータ、血圧、呼吸数、尿検査、局所刺激性評価及び眼科学的検査における有害な影響は認められなかった。

非臨床毒性試験成績、並びにトレメリムマブの作用機序及び臨床的安全性の所見との一貫性に基づき、消化管、皮膚、肝臓、甲状腺、リンパ系及び血液系がトレメリムマブの潜在的な標的臓器として特定された。6 カ月間反復静脈内投与毒性試験において、トレメリムマブ投与に関連した一般状態変化として、用量依存的な下痢、皮膚の状態悪化及び末梢リンパ節腫脹が認められた。結果として、50 mg/kg 群では週 1 回投与を 6 回又は 7 回行った後に投与を中断したが、持続性の下痢、体重減少及び／又は皮膚の状態悪化のため 12 例中 7 例を早期安楽死させた。下痢及び皮膚の状態悪化に相関して、大腸及び皮膚で単核細胞浸潤及び炎症が認められた。末梢リンパ節腫脹については、病理組織学的変化としてリンパ組織過形成が認められた。

血液学的検査所見として、白血球数、リンパ球数及び $CD3^+$リンパ球数（主に $CD3^+CD4^+$ T リンパ球、やや少ない $CD3^+CD8^+$ T リンパ球）の一過性の増加、好酸球数の増加、並びに赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの可逆的な軽微な減少が認められた。血液生化学的検査所見としては、6 カ月間反復投与毒性試験の 50 mg/kg 群でみられた平均 A/G 比の低下のみであった。甲状腺ホルモン値（T3 及び T4）の減少及びそれに伴う TSH の増加が、15 mg/kg 群の雌 1 例及び 50 mg/kg 群の雄 1 例でみられ、関連する病理組織学的所見として中等度から重度の甲状腺萎縮が認められた。更に、15 mg/kg 群の 2 例で散発的な ALT 及び AST の増加がみられたが、関連する病理組織学的所見が認められなかったことから、トレメリムマブ投与との関連性はないと考えられた。

トレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見として、末梢リンパ節、骨髄及び脾臓のリンパ組織過形成、並びに多くのリンパ組織／非リンパ組織で単核細胞浸潤及び炎症の用量依存的な発現頻度増加が認められたが、これらの所見はトレメリムマブの薬理作用に関連したものであり、有害な影響ではないと考えられた。肝臓門脈周囲の単核細胞浸潤がみられたが、関連する GGT、総ビリルビン及び胆汁酸の値に変化は認められなかった。

トレメリムマブ投与に関連した病理組織学的所見は概して可逆性の変化であった。一部例外として、1 カ月間反復投与毒性試験の 15 及び 50 mg/kg 群で認められた肝臓門脈周囲の単核細胞浸潤（雌では回復性がみられたが、雄では回復性が認められなかった）並びに 6 カ月間反復投与毒性試験の 50 mg/kg 群でみられた唾液腺の軽微な炎症（雄 2 例中 1 例）及び皮膚の軽微な炎症（雄 2 例中 1 例、雌 2 例中 2 例）については回復性が認められなかった。

カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験において、トレメリムマブ投与により対照群に比べて下痢の発現頻度の軽微な上昇が認められた。妊娠母動物において体重、膣垢検査、胎盤の重量及び外観、並びに流産率／出生前死亡率にトレメリムマブ投与に関連した影響は認められなかった。帝王切開後の胎児検査では、胎児体重、外表、内臓及び骨格検査、並びに器官重量において、トレメリムマブ投与に関連した影響は認められなかった。以上のように、トレメリムマブ投与により、母動物毒性、発生毒性及び催奇形性は認められなかった。

表 8　トレメリムマブのカニクイザルを用いた毒性試験における主な所見及び曝露量

Dose (mg/kg)	Key Findings	C_{max}[a] (μg/mL)	AUC[a] (μg·hr/mL)
Single-dose with 3-month observation period after dosing (3 animals/sex)			
10	↑ eosinophil counts; ADA detected	251	29000
30	↑ eosinophil counts loose stools;↑ lymphocyte counts; ADA detected	688	66900
100	↑ eosinophil counts loose stools;↑ lymphocyte counts; ADA detected No gross or microscopic findings after 3-month observation period	2970	209000
1-month repeat-dose with 2-month observation period after dosing (5 animals/sex)[b]			
5 (NOAEL)	Loose stools; lymphoid hyperplasia in the spleen and mesenteric lymph nodes; ADA detected	107 164	69500 88600
15	Loose stools; lymphoid hyperplasia in the spleen; ↑ peripheral blood CD3+CD4+ T cells; periportal infiltration of mononuclear cells ADA detected	357 433	186000 210000
50 (HNSTD)	Loose stools with supportive care; lymphoid hyperplasia in the spleen;↑ peripheral blood lymphocytes; ↑ peripheral blood CD3+CD4+ T cells, CD3+ T cells, and/or CD20+ B cells; ↓ RBC, hemoglobin, and hematocrit	1090 1480	590000 775000
6-month repeat-dose (4 or 6 animals/sex)[c]			
5	Diarrhoea requiring supportive care; skin rash; lymphoid hyperplasia; ↑incidence and severity of mononuclear cell infiltration and/or inflammation in skin and tissues that have a spontaneous background incidence of mononuclear cell aggregates; ADA detected	145 234 192	94700
15 (HNSTD)	Diarrhoea; skin rash (requiring supportive care in 1 male); lymphoid hyperplasia; ↑ incidence and severity of mononuclear cell infiltration and/or inflammation in skin and tissues that have a spontaneous background incidence of mononuclear cell aggregates; ↑ CD3+CD4+ peripheral blood lymphocytes; inflammation of cecum and colon; thyroid atrophy; ADA detected	418 505 444	212000
50	Diarrhoea; skin rash; lymphoid hyperplasia; ↑ incidence and severity of mononuclear cell infiltration and/or inflammation in skin and tissues that have a spontaneous background incidence of mononuclear cell aggregates; ↑ CD3+CD4+ peripheral blood lymphocytes; inflammation of duodenum, cecum, and colon; acinar pancreatic and thyroid atrophy; ADA detected; early euthanasia due to progressive skin condition, diarrhea, and ↓ body weight	1400 2030 NC	776000
Embryo-Fetal Development (16 females/group)[d]			
5	Slight increase in diarrhoea	154 187	76800
15		498 707	208000
30 (NOAEL)		954 1230	454000

↑ = increased; ↓ = decreased; ADA = antidrug antibody; AUC = area under the plasma concentration-timecurve; $AUC_{0\text{-}Tlast}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to last measurable concentration; $AUC_{Days1\text{-}30}$ = area under the plasma concentration-time curve from Day 1 to Day 30; $AUC_{Day\ 20\text{-}49}$ = area under the concentration-time curve from GD 20 to GD 49; C_{max} = maximum observed concentration; GD = gestation day; NC = not calculated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; HNSTD = highest non-severely toxic dose; RBC = redblood cell.

a. In the single-dose study, AUC is $AUC_{0\text{-}Tlast}$ from Day 1 through Day 105. In the 1-month repeat-dose study, C_{max} values are on Day 1 and Day 29 and AUC values are $AUC_{Days1\text{-}30}$ and $AUC_{0\text{-}Tlast}$, where T_{last} is from Day 1 through the end of the observation period (Day 105). In the 6 month repeat-dose study, C_{max} values are from Days 1, 29 and 176 and AUC values are $AUC_{Days1\text{-}30}$. In the EFD study, C_{max} values are from GD 20 and 48 and AUC values are $AUC_{GD20\text{-}49}$
b. Tremelimumab was administered on Days 1, 8, 15, 22, and 29.
c. Tremelimumab at dose levels of 5 and 15 mg/kg was administered once weekly for 26 consecutive weeks,and at dose level of 50 mg/kg once weekly for 7 consecutive weeks.
d. Tremelimumab was administered on GD 20, 27, 34, 41, and 48.

結論として、最長 6 カ月間の毒性試験においてトレメリムマブの静脈内投与により認められた毒性所見は薬理作用と一貫するものであり、トレメリムマブの CTLA-4 への結合により CD80/CD86 相互作用が阻害されることで生じるリンパ球の持続的な活性化によるものと考えられる。更に、トレメリムマブのカニクイザルにおける非臨床安全性プロファイルから、消化管への影響、皮膚の発疹、甲状腺機能低下等の内分泌障害を含む臨床的安全性の所見が予測された。非臨床試験でみられた毒性所見の大部分は、回復又は回復傾向を示すものであった。全体として、トレメリムマブの非臨床安全性試験成績から、予測／管理可能及び可逆的な副作用からなる安全性プロファイルが示されている。

トレメリムマブの非臨床毒性プロファイルは、本承認申請における適応を支持するものと考えられる。

2.6.6.10 参考文献

Alegre et al 1998

Alegre M-L, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. The Journal of Immunology. 1998; 161(7): 3347-56.

Vandenborre et al 1998

Vandenborre K, Delabie J, Boogaerts MA, De Vos R, Lorre K, De Wolf-Peeters C, 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. The American journal of pathology. 1998; 152(4): 963-73.

Xerri et al 1997

Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Olive D, Birg F. In vivo expression of the CTLA4 inhibitory receptor in malignant and reactive cells from human lymphomas. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 1997; 183(2): 182-7.

第 2 部　CTD の概要

トレメリムマブ

版番号：[redacted]

2.6.7　毒性試験概要表
トレメリムマブ

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 6
2.6.7.5 単回投与毒性試験 7
2.6.7.5.1 カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（Non-pivotal） 7
2.6.7.5.2 カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（Pivotal） 8
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 9
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 10
2.6.7.7.1 カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験 10
2.6.7.7.2 カニクイザルを用いた 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験 20
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 37
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 37
2.6.7.10 がん原性試験 37
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 37
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 37
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 38
2.6.7.13.1 カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験 38
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：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 40
2.6.7.15 新生児を用いた試験 40
2.6.7.16 局所刺激性試験 40
2.6.7.17 その他の毒性試験 40
2.6.7.17.1 組織交差反応性試験 40

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Type of Study	Study Number	Species and Strain	ROA	Number of Doses	Dose (mg/kg)	GLP Compliance	Study Site	Location in CTD
Single-dose toxicity	00-1985-06	Cynomolgus monkey	IV	1	10	No	[redacted]	4.2.3.1.1
	99-1985-01	Cynomolgus monkey	IV	1	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted]	4.2.3.1.2
Repeat-dose toxicity	00-1985-04	Cynomolgus monkey	IV	5	0, 5, 15, 50	Yes	[redacted]	4.2.3.2.1
	2004-0150	Cynomolgus monkey	IV	26	0, 5, 15, 50 [a]	Yes	[redacted]	4.2.3.2.2
Genotoxicity	Studies evaluating genotoxicity were not conducted.							
Carcinogenicity	Studies evaluating carcinogenicity were not conducted.							
Reproductive and developmental toxicity	2501-001	Cynomolgus monkey	IV	5	0, 5, 15, 30	Yes	[redacted] Germany	4.2.3.5.2.1
Studies in juvenile animals	Studies in juvenile animals were not conducted.							
Local tolerance	No stand-alone studies assessing local tolerance of tremelimumab were conducted. The IV injections sites were evaluated as part of single and repeat dose toxicity studies.							
Other toxicity studies - TCR	IM676	Human tissue	*In vitro*	NA	NA	Yes	[redacted]	4.2.3.7.7.1
Other toxicity studies - TCR	IM645	Cynomolgus monkey tissue	*In vitro*	NA	NA	Yes	[redacted]	4.2.3.7.7.2

IV = intravenous; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable; ROA = route of administration; TCR = tissue cross-reactivity

[a] Dosing at 50 mg/kg was suspended after 6 or 7 weekly doses due to adverse clinical signs.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of Study	Species and Strain	ROA	Dose (mg/kg)	Study Number	GLP Compliance
Single-dose	Cynomolgus monkey	IV	10	00-1985-06	No
Single-dose	Cynomolgus monkey	IV	0, 10, 30, 100	99-1985-01	Yes
1-Month repeat-dose	Cynomolgus monkey	IV	0, 5, 15, 50	00-1985-04	Yes
6-Month repeat-dose	Cynomolgus monkey	IV	0, 5, 15, 50 [a]	2004-0150	Yes
Reproductive and developmental toxicity	Cynomolgus monkey	IV	0, 5, 15, 30	2501-001	Yes

IV = intravenous; GLP = Good Laboratory Practice; ; NA = not applicable; ROA = route of administration.

[a] Dosing at 50 mg/kg was suspended after 6 or 7 weekly doses due to adverse clinical signs.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

	Dose (mg/kg)	$AUC_{(0\text{-}tlast)}$[a] (μg· h/mL)	C_{max}[a] (μg/mL)	Study Number
Single-Dose Toxicity Studies				
Single-dose	10	35600	267	00-1985-06
Single-dose	10	29000	251	99-1985-01
	30	66900	688	
	100	209000	2970	
Repeat-Dose Toxicity Studies				
1-month toxicity study [b]	5	3260	164	00-1985-04
	15	7440	433	
	50	28200	1480	
6-month toxicity study [c]	5	3870	192	2004-0150
	15	7820	444	
	50	39300[d]	2030[d]	
Reproductive and Developmental Toxicity Studies				
Reproductive toxicity/embryo-foetal development [e]	5	3680	187	2501-001
	15	12900	707	
	30	23800	1230	

$AUC_{0\text{-}tlast}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to last measurable concentration; C_{max} = maximal concentration.

[a] Excluding Study 2501-001, AUC and C_{max} values indicate combined male and female mean plasma concentrations.

[b] Reported values were obtained on Day 29.

[c] Reported values were obtained on Day 176.

[d] Toxicokinetic parameters for the 50 mg/kg/week group are for Day 29 (and AUC is 0-24h) due to suspension of dosing in this group after the 6th or 7th dose.

[e] Reported values were obtained Gestation Day 48.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article	Batch Number	Specified Impurities	Study Number	Type of Study
Tremelimumab	[redacted]	None	00-1985-06	Single-dose toxicity
Tremelimumab	[redacted]	None	99-1985-01	Single-dose toxicity
Tremelimumab	[redacted]	None	00-1985-04	Repeat-dose toxicity
Tremelimumab	[redacted]	Mouse DNA ([redacted] pg DNA/mg, host cell protein ([redacted] ng/mg), 不純物H* ([redacted] ng/mg), [redacted] ([redacted] EU/mg)	2004-0150	Repeat-dose toxicity
Tremelimumab	[redacted]	Mouse DNA ([redacted] pg DNA/mg, host cell protein ([redacted] ng/mg), 不純物H* ([redacted] ng/mg), [redacted] ([redacted] EU/mg)	2501-001	Embryofoetal toxicity
Tremelimumab	[redacted]	None	IM676	Human TCR
Tremelimumab	[redacted]	None	IM645	Cynomolgus monkey TCR

EU = endotoxin unit; TCR = tissue cross-reactivity

2.6.7.5 単回投与毒性試験

2.6.7.5.1 カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（Non-pivotal）

Design of Study 00-1985-06, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Study Number: 00-1985-06	Test Article: Tremelimumab	Test Article Lot: [redacted]		Number of Doses: 1
Control Article: NA				Species: Cynomolgus monkey
Route of Administration: Intravenous bolus	**Duration of Post-dose Treatment-free Period**: 12 weeks			**GLP Compliance:** No
Study Type: Single-dose toxicity with 12-week treatment-free observation period				
Study Objective: To assess the potential local/systemic toxicity and toxicokinetics of tremelimumab				
Group	**Test Article**	**Number of Animals (M/F)**	**Dose Level (mg/kg)**	**Number of Animals Necropsied Day 106 (M/F)**
1	Tremelimumab	1/1	10	0/0
Toxicokinetics (individual values (M/F))				
Dose Level (mg/kg)	10			
$AUC_{0\text{-tlast}}$ (µg·h/mL)	40237/30876			
C_{max} (µg/mL)	295/242			
ADA incidence (number of M/F) and percentage positive	0/1 100% [a]			
Endpoints Evaluated: mortality, clinical signs, body weight, food consumption, haematology, ex vivo activity in SEA assay.				
Noteworthy Findings				
Haematology: a ~1.5 fold increase in lymphocyte counts was observed on Day 6 and 13 in the male but nor the female animal. SEA assay: tremelimumab, increased IL-2 production ex vivo in both animals from 0.5 h post IV administration, with IL-2 levels remaining elevated over the course of the study compared to pre-study values.				

ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximal concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; SEA = Staphylococcus Enterotoxin A.

[a] The male animal could not be evaluated for ADAs due to assay interference and tremelimumab levels not reaching the lower limit of quantitation.

2.6.7.5.2 カニクイザルを用いた単回静脈内投与毒性試験（Pivotal）

Design of Study 99-1985-01, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Study Number: 99-1985-01	Test Article: Tremelimumab	Test Article Lot: [redacted]	Number of Doses: 1
Control Article: 20 mM Na acetate, 140 mM NaCl, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.5			**Species:** Cynomolgus monkey
Route of Administration: Intravenous bolus	**Duration of Post-dose Treatment-free Period**: 15 weeks		**GLP Compliance:** Yes
Study Type: Single-dose toxicity with 15 week treatment-free observation period			
Study Objective: To assess the potential local/systemic toxicity and toxicokinetics of tremelimumab			

Group	Test Article	Number of Animals (M/F)	Dose Level (mg/kg)	Number of Animals Necropsied Day 106 (M/F)
1	Vehicle	3/3	0	3/3
2	Tremelimumab	3/3	10	0/0
3	Tremelimumab	3/3	30	0/0
4	Tremelimumab	3/3	100	3/3

Toxicokinetics (group mean value, M and F combined)

Dose Level (mg/kg)	0	10	30	100
$AUC_{0\text{-tlast}}$ (μg·h/mL)	NA	29000 ± 4,870	66900 ± 14,900	209000 ± 46,400
C_{max} (μg/mL)	NA	251.16 ± 76.48	688.37 ± 251.73	2967.30 ± 809.33
ADA incidence (number of M/F) and percentage positive	NA	3/3 100%	3/3 100%	3/3 100%

Endpoints Evaluated: mortality, clinical signs, body weight, food consumption, vital signs (heart rate, respiration rate, and body temperature), physical examinations, safety pharmacology (ECG, respiration rate, blood pressure, neurobehavioral screening), haematology, clinical chemistry, inspection of administration site, gross pathology, microscopic pathology.

Noteworthy Findings

Clinical observations: dose-dependent increase in incidence and frequency of diarrhea/loose stool (1/3 F in control group; 1/3F in 10 mg/kg group; 1/3 M and 2/3 F in 30 mg/kg group; 3/3 M and 1/3 F in 100 mg/kg group).

Haematology: increase in lymphocyte counts in M and F at ≥ 30 mg/kg beginning on Day 8, persisting in some animals through Day 106; increase in eosinophil counts in F at all dose levels and M in 100 mg/kg group beginning on Day 15, persisting in some animals through Day 106.

ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximal concentration; ECG = electrocardiogram; F = female; M = male; NA = not applicable.

2.6.7.6　　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 カニクイザルを用いた 1 カ月間反復静脈内投与毒性試験

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Study Number: 00-1985-04	**Test Article: Tremelimumab**	**Test Article Lot:** [redacted]	**Number of Doses: 5**
Control Article: 20 mM Na acetate, 140 mM NaCl, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.5			**Species:** Cynomolgus monkey
Route of Administration: Intravenous bolus	**Duration of Post-dose Treatment-free Period:** 2-months		**GLP Compliance:** Yes
Study Type: 1-month repeat-dose toxicity with a 2-month treatment-free observation period			
Study Objective: To assess the potential local/systemic toxicity and toxicokinetics of tremelimumab			

Group	Test Article	Number of Animals (M/F)	Dose Level (mg/kg)	Number of Animals Necropsied (M/F)	
				Day 30	Day 105
1	Vehicle	5/5	0	3/3	2/2
2	Tremelimumab	5/5	5	3/3	2/2
3	Tremelimumab	5/5	15	3/3	2/2
4	Tremelimumab	5/5	50	3/3	2/2

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)		0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)		M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Toxicokinetics (group mean value, M and F combined)									
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	Day 1	NA		1810 ± 473		6,500 ± 698		19,800 ± 1120	
	Day 29	NA		3260 ± 1120		7440 ± 4200		28200 ± 4870	
$AUC_{0\text{-}tlast}$ (µg·h/mL)	Days 1-30	NA		69500 ± 5800		186000 ± 54900		590000 ± 47400	
	Days 1-105	NA		88600 ± 28500		210000 ± 83700		775000 ± 166000	
C_{max} (µg/mL)	Day 1	NA		107 ± 29.0		357 ± 54.5		1090 ± 120	
	Day 29	NA		164 ± 51.4		433 ± 181		1480 ± 176	
ADA incidence (number of M/F) and incidence positive [a]		NA		2/0 67%		1/1 100%		1/1 67%	
Endpoints Evaluated: mortality, clinical observations, body weight, food consumption, safety pharmacology (ECG, respiration rate, blood pressure, neurobehavioral screening), ophthalmology, haematology, immunophenotyping, clinical chemistry, urinalysis, inspection of administration site, gross pathology, organ weights, microscopic pathology									
Noteworthy Findings									
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations									
During dosing phase									
Loose stool		0	0	1	1	1	1	2	1
During treatment-free phase									
Loose stool		0	0	0	0	0	0	2	1
Body weight/Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Vital signs		-	-	-	-	-	-	-	-
ECG/blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology		-	-	-	-	-	-	-	-

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Hematology								
Lymphocytes (count/mm^3)								
Pre-study Day 8	8272.2	4928.4	4754.2**	4372.8	4620.0**	4215.6	4382.6**	5311.4
Pre-study Day 22	7755.4	4567.8	4850.0**	5068.2	4642.8**	4200.2	4448.0**	5766.6
Day 15	7754.0	4959.6	6158.6	5450.8	6195.0	5769.0	6632.8	10168.4*
Day 30	5834.0	4501.2	4985.2	4228.6	4750.6	3706.8	6115.0	6642.8
Recovery Day 13 (Day 42)	8621.5 (2)	4942.0 (2)	5972.5 (2)	5490.5 (2)	5535.0 (2)	5662.0 (2)	6153.0 (2)	6382.5 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	10872.5 (2)	5835.5 (2)	8055.5 (2)	5908.0 (2)	8020.5 (2)	5926.0 (2)	8544.0 (2)	6958.5 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	10217.0 (2)	5873.0 (2)	6497.5 (2)	5697.0 (2)	7416.5 (2)	6053.5 (2)	6820.5 (2)	5022.5 (2)
Change from mean pre-study to on-study measurements								
Day 15	-259.80	211.50	1356.50	730.30	1563.60	1561.10	2217.50*	4629.40**
Day 30	-2179.80	-246.90	183.10**	-491.90	119.20**	-501.10	1699.70**	1103.80
RBC (x10^6/mm^3)								
Pre-study Day 8	7.04	-	7.02	-	6.64	-	6.70	-
Pre-study Day 22	6.84	-	6.82	-	6.54	-	6.34	-
Day 15	6.64	-	6.64	-	6.34	-	6.18	-
Day 30	6.60	-	6.46	-	6.12	-	5.82*	-
Recovery Day 13 (Day 42)	6.90 (2)	-	6.80 (2)	-	6.60 (2)	-	6.20 (2)	-
Recovery Day 28 (Day 57)	7.20 (2)	-	6.80 (2)	-	6.90 (2)	-	6.55 (2)	-
Recovery Day 70 (Day 99)	7.40 (2)	-	7.35 (2)	-	7.10 (2)	-	6.65 (2)	-
Change from mean pre-study to on-study measurements								
Day 15	-0.30	-	-0.28	-	-0.25	-	-0.34	-
Day 30	-0.34	-	-0.46	-	-0.47	-	-0.70	-

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Hemoglobin (g/dL)								
Pre-study Day 8	12.96	-	12.12	-	12.60	-	12.66	-
Pre-study Day 22	12.86	-	12.08	-	12.70	-	12.34	-
Day 15	12.74	-	11.84	-	12.36	-	12.04	-
Day 30	12.56	-	11.44	-	11.72	-	11.20*	-
Recovery Day 13 (Day 42)	13.45 (2)	-	11.80* (2)	-	12.20* (2)	-	12.35* (2)	-
Recovery Day 28 (Day 57)	14.05 (2)	-	12.30** (2)	-	12.90* (2)	-	13.20 (2)	-
Recovery Day 70 (Day 99)	14.45 (2)	-	12.95 (2)	-	13.30 (2)	-	13.25 (2)	-
Change from mean pre-study to on-study measurements								
Day 15	-0.17	-	-0.26	-	-0.29	-	-0.46	-
Day 30	-0.35	-	-0.66	-	-0.93	-	-1.30*	-
Hematocrit (%)								
Pre-study Day 8	45.16	-	43.70	-	43.30	-	44.38	-
Pre-study Day 22	44.86	-	42.68	-	43.00	-	41.72	-
Day 15	43.20	-	42.08	-	42.12	-	41.36	-
Day 30	44.30	-	41.40	-	41.58	-	40.18*	-
Recovery Day 13 (Day 42)	44.95 (2)	-	42.10 (2)	-	41.85 (2)	-	41.90 (2)	-
Recovery Day 28 (Day 57)	47.95 (2)	-	42.45 (2)	-	44.20 (2)	-	44.80 (2)	-
Recovery Day 70 (Day 99)	48.10 (2)	-	45.05 (2)	-	46.40 (2)	-	45.00 (2)	-
Change from mean pre-study to on-study measurements								
Day 15	-1.81	-	-1.11	-	-1.03	-	-1.69	-
Day 30	-0.71	-	-1.79	-	-1.57	-	-2.87	-

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical chemistry								
ALT (U/L)								
Pre-study	37.0	49.8	36.6	44.4	39.8	46.6	38.4	51.4
Day 15	32.8	52.8	32.8	46.0	47.4	49.0	36.8	41.2
Day 30	41.8	54.6	42.4	45.8	55.0[f]	70.0	50.8	48.0
AST (U/L)								
Pre-study	36.4	29.0	35.2	31.4	31.6	33.0	30.8	29.8
Day 15	32.0	32.6	29.4	32.8	30.8	32.4	31.8	31.4
Day 30	54.0	43.6	57.2	52.2	69.8[f]	128.2	50.0	44.2
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral blood leukocyte counts								
$CD3^+CD4^+$ T cells (count/μL)								
Pre-study	2243	1408	1330	1648	1331	1409	1344	2053
Day 15	2392	1727	2131	2030	2241	2472	2734	4062
Day 30	1623	1540	1594	1803	1646	2120	2481	3129
Recovery Day 13 (Day 42)	2235 (2)	1883 (2)	1666 (2)	2335 (2)	1793 (2)	2561 (2)	2461 (2)	2785 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	2493 (2)	1728 (2)	2261 (2)	2295 (2)	2101 (2)	2331 (2)	2220 (2)	2524 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	2383 (2)	1772 (2)	1873 (2)	2009 (2)	2274 (2)	2204 (2)	1919 (2)	1623 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	149.60	318.90	800.60	382.10	910.00	1063.20	1390.70**	2008.80
Day 30	-619.60	131.90	263.80*	155.10	314.80*	711.00*	1137.30**	1075.80

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
$CD3^+CD4^+$ T cells (%)								
Pre-study	30.08	32.02	30.55	36.94	30.13	35.37	33.03	37.24
Day 15	33.22	37.92	37.08	44.82	39.02	49.80	49.80	54.90
Day 30	30.34	36.18	36.10	45.58	36.24	47.38	47.34	51.96
Recovery Day 13 (Day 42)	26.90 (2)	36.20 (2)	31.95 (2)	45.15 (2)	35.05 (2)	47.25 (2)	42.75 (2)	46.90 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	25.20 (2)	30.55 (2)	30.95 (2)	42.20 (2)	30.40 (2)	43.40 (2)	32.60 (2)	40.60 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	29.40 (2)	34.75 (2)	32.80 (2)	40.35 (2)	32.45 (2)	44.15 (2)	32.60 (2)	37.10 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	3.14	5.90	6.53	7.88	8.89*	14.43**	16.77**	17.66**
Day 30	0.26	4.16	5.55*	8.64	6.11*	12.01*	14.31**	14.72**
$CD3^+$ T cells (count/μL)								
Pre-study	4541	2540	2718	2734	2725	2376	2475	3932
Day 15	4717	2839	3727	3079	3737	3613	3892	5895
Day 30	3178	2561	2896	2701	2873	3068	3581	4621
Recovery Day 13 (Day 42)	4528 (2)	3021 (2)	2806 (2)	3468 (2)	2797 (2)	3791 (2)	3754 (2)	4147 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	5220 (2)	2939 (2)	4105 (2)	3482 (2)	3492 (2)	3358 (2)	3998 (2)	4235 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	4534 (2)	2931 (2)	3291 (2)	3063 (2)	4008 (2)	3504 (2)	3457 (2)	2909 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	176.30	298.60	1009.00	345.00	1011.40	1236.20	1416.70	1963.00**
Day 30	-1363.1	21.20	177.60*	-33.00	147.60*	691.60	1105.50**	688.80

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
$CD3^+$ T cells (%)								
Pre-study	60.93	56.47	59.25	59.92	61.70	60.11	58.82	69.09
Day 15	64.08	63.14	64.34	67.04	67.26	71.46	70.88	78.90
Day 30	58.44	60.22	61.56	67.28	63.50	67.52	68.90	75.08
Recovery Day 13 (Day 42)	54.05 (2)	57.95 (2)	52.50 (2)	65.40 (2)	53.60 (2)	66.25 (2)	65.00 (2)	68.60 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	52.35 (2)	52.65 (2)	54.00 (2)	63.20 (2)	50.55 (2)	62.60 (2)	57.30 (2)	66.05 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	55.30 (2)	58.00 (2)	56.90 (2)	61.95 (2)	55.10 (2)	67.00 (2)	60.15 (2)	65.65 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	3.12	6.67	5.09	7.12	5.56	11.35	12.06*	9.81
Day 30	-2.52	3.75	2.31	7.36	1.80	7.41	10.08**	5.99
$CD20^+$ B cells (count/μL)								
Pre-study	1302	559	817	614	681	471	675	665
Day 15	1507	615	1106	682	987	569	771	821
Day 30	1222	584	1059	611	912	796	1031	875
Recovery Day 13 (Day 42)	2276 (2)	825 (2)	1216 (2)	824 (2)	1178 (2)	798 (2)	1279 (2)	914 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	2564 (2)	706 (2)	1823 (2)	884 (2)	1489 (2)	600 (2)	1838 (2)	963 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	2088 (2)	594 (2)	1196 (2)	659 (2)	1173 (2)	555 (2)	1269 (2)	569 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	205.60	55.90	289.10	67.90	306.70	98.10	95.60	156.30
Day 30	-79.40	25.10	241.70	-3.10	230.90	324.90	355.80*	210.30

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
$CD20^+$ B cells (%)								
Pre-study	17.03	13.04	16.33	13.51	15.62	12.76	15.75	11.69
Day 15	18.68	14.46	18.00	104.72	18.00	13.06	14.04	10.92
Day 30	20.86	15.14	20.78	15.56	19.58	17.74	20.46	13.72
Recovery Day 13 (Day 42)	27.50 (2)	15.40 (2)	23.10 (2)	15.30 (2)	22.20 (2)	13.55 (2)	22.35 (2)	15.35 (2)
Recovery Day 28 (Day 57)	25.40 (2)	12.60 (2)	23.85 (2)	15.80 (2)	21.70 (2)	12.45 (2)	25.70 (2)	14.70 (2)
Recovery Day 70 (Day 99)	25.05 (2)	11.90 (2)	20.85 (2)	13.75 (2)	16.70 (2)	11.05 (2)	22.00 (2)	12.65 (2)
Change from pre-study to on-study measurements								
Day 15	1.65	1.42	1.67	1.21	2.38	0.30	-1.71	-0.77
Day 30	3.83	2.10	4.45	2.05	3.96	4.98	4.71	2.03
Gross pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopic pathology								
End of dosing phase								
Liver								
Mononuclear cell infiltration, Periportal								
Slight	0	0	0	0	1	1	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Spleen								
Hyperplasia, Lymphoid								
Slight	0	0	1	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Mesenteric lymph node Hyperplasia, Lymphoid Slight	0	0	0	0	0	0	3	3
End of treatment-free phase								
No. examined	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Liver Mononuclear cell infiltration, Periportal Slight Mild	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	1 1	0 0
Spleen Hyperplasia, Lymphoid Slight	0	0	0	0	1	0	0	0
Mesenteric lymph node Hyperplasia, Lymphoid Slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Immunohistochemistry								
Spleen	Changes observed in the spleen at the conclusion of the dosing period included slightly increased numbers of $CD3^+$ and $CD4^+$ T cells in periarteriolar lymphoid sheaths of 1 female at 50 mg/kg, increased numbers of $CD79a^+$ B cells in lymphoid follicles of 2 animals at 50 mg/kg animals, and increased numbers of $CD25^+$ cells in all treated groups. Increased numbers of $CD25^+$ lymphocytes and macrophages were observed within the germinal centers, mantle and/or marginal zones of follicles of 3 animals at 5 mg/kg, 4 animals at 15 mg/kg, and all 50 mg/kg animals, consistent with cell activation. No treatment-related changes were observed at the end of the post-dose observation period.							

Design of Study 00-1985-04, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2	M: 3+2	F: 3+2
Mesenteric lymph node	Changes in the mesenteric lymph nodes were restricted to slightly increased numbers of $CD25^+$ cells in paracortical areas of 2 animals at 15 mg/kg and 5 animals at 50 mg/kg at the end of the dosing period. No treatment-related changes were observed at the end of the post-dose observation period.							
Thymus	Potential treatment-related changes in the thymus were limited to the formation of small medullary lymphoid follicles in 2 animals at 50 mg/kg. No treatment-related changes were observed at the end of the post-dose observation period.							
Liver	Mixed mononuclear cell infiltrate in the liver was determined to be primarily $CD3^+$ cells with lesser numbers of $CD79a^+$ cells. Remaining infiltrating cells were negative for expression of either CD3 or CD79a, consistent with multiple cell types present.							
NOAEL: 5 mg/kg administered once weekly					**HNSTD:** 50 mg/kg administered once weekly			

- = No noteworthy findings; * $p<0.05$; ** $p<0.01$ indicate levels of significant difference from control using either Dunnett's Test (if the variances were equal) or modified Cochran-Cox t-test of significance (if the variances were unequal).

ADA = anti-drug antibody; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximal concentration; ECG = electrocardiogram; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; HNSTD = highest non-severely toxic dose; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; RBC = red blood cell

[a] Animals (2 animals/sex/group) were evaluated during post-dose period to avoid assay interference with circulating tremelimumab; 4 animals (1 F in 5 mg/kg group, 1 F and 1 M in 15 mg/kg group, and 1 F in 50 mg/kg group) could not be evaluated for ADAs due to assay interference and tremelimumab levels not reaching the lower limit of quantitation.

2.6.7.7.2 カニクイザルを用いた 6 カ月間反復静脈内投与毒性試験

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Study Number: 2004-0150	**Test Article: Tremelimumab**	**Test Article Lot:** [redacted]	**Number of Doses: 27**
Control Article: 20 mM Na acetate, 140 mM NaCl, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.5			**Species:** Cynomolgus monkey
Route of Administration: Intravenous bolus	**Duration of Post-dose Treatment-free Period:** 99 days [a]		**GLP Compliance:** Yes
Study Type: 6-month repeat-dose toxicity			
Study Objective: To assess the potential local/systemic toxicity and toxicokinetics of tremelimumab			

Group	**Test Article**	**Number of Animals (M/F)**	**Dose Level (mg/kg)**	**Number of Animals Necropsied (M/F)**	
				Day 177/178	**Day 178 after 99-day Recovery**
1	Vehicle	6/6	0	4/4	2/2
2	Tremelimumab	4/4	5	3/3 [b]	0/0
3	Tremelimumab	4/4	15	4/4	0/0
4	Tremelimumab	6/6	50	0/0 [c]	2/2

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)		0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)		M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Toxicokinetics (group mean value, M and F combined)									
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	Day 1	NA		2770 ± 650		7670 ± 710		26700 ± 4400	
	Day 29	NA		4630 ± 1110		8190 ± 4860		39300 ± 7300	
	Day 176	NA		3870 ± 2310		7820 ± 7620		NA	
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·h/mL)		NA		13200 ± 2500		33900 ± 3000		121000 ± 18000	
$AUC_{Days\ 1\text{-}30}$ (µg·h/mL)		NA		94700 ± 8000		212000 ± 47000		776000 ± 91000	
C_{max} (µg/mL)	Day 1	NA		145 ± 32		418 ± 40		1400 ± 250	
	Day 29	NA		234 ± 39		505 ± 176		2030 ± 320	
	Day 176	NA		192 ± 107		444 ± 329		NA	
ADA incidence (number of M/F) and percentage positive [d]		NA		1/0 100%		3/1 100%		1/1 100%	
Endpoints Evaluated: mortality, clinical signs, body weight, safety pharmacology (ECG, respiration rate, blood pressure, neurobehavioral screening), ophthalmology, haematology, immunophenotyping, clinical chemistry, urinalysis, inspection of administration site, gross pathology, organ weights, microscopic pathology									
Noteworthy findings									
No. died or sacrificed moribund [e]		0	0	1	1	0	0	4	4
Clinical observations									
Appearance and Condition									
Swelling, nodular (axillary and/or inguinal areas)		1	0	2	4	4	3	5	6
Broken right arm		0	0	0	1	0	0	0	0
Behavior									
Appetite, decreased		0	1	1[i]	2	0	4	3	4
Scratching		0	0	0	0	1	0	1	0

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Body Surface/Skin								
Hairloss	1	0	0	2	0	1	1	2
Scabbed area	0	0	0	1	1	0	1	1
Skin, abrasion/open sore	0	0	0	0	0	0	2	2
Skin, crust	0	0	0	0	0	0	1	0
Skin, rash	0	0	0	0	0	0	2	0
skin wrinkled	0	0	0	0	1	0	1	0
skin reddish	0	0	0	0	0	0	3	0
skin scaley	0	0	0	0	0	0	3	0
skin cracked	0	0	0	0	0	0	1	0
skin yellowish	0	0	0	0	0	0	2	0
open sore	0	0	0	0	0	0	3	2
dry skin	0	0	0	0	0	0	1	0
bumps	0	0	0	1	1	0	0	0
Excretions/Emesis								
Feces, diarrhea	3	1	2	2	2	4	5	4
Eyes								
Eyelid(s), swollen	0	0	0	0	0	0	2	0
Body weight	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG								
HR (beats/minute)								
Average baseline	234		232		245**		244**	
Week 26	233 (8)		229 (6)		227		NA	
Postdose change from average baseline (Week 26)	-2		-1		-18		NA	

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
PR interval (ms)								
Average baseline	72		68*		68*		70	
Week 26	69 (8)		65 (6)		76		NA	
Postdose change from average baseline (Week 26)	-2		-2		8**		NA	
Ophthalmology	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
Hematology								
Lymphocytes (count/10^3/μL)								
Pre-study (Day -14)	7.535	4.942	6.555	7.493	6.518	6.905	4.997*	6.908
Pre-study (Day -7)	6.477	3.805	6.225	4.918	5.545	5.373	5.238	5.560
Day 15	6.763	5.233	7.423	6.908	8.848*	7.793	11.512*	9.455**
Day 30	5.347	3.563	5.650	4.495	4.988	4.615	8.383**	6.935**
Day 92	4.998 (4)	4.343 (4)	7.690 (3)	6.520 (4)	9.310* (4)	7.545* (4)	NA	NA
Day 170	6.605 (4)	3.990 (4)	8.420 (3)	4.637 (3)	8.230 (4)	5.588 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	8.025 (2)	3.010 (2)	NA	NA	NA	NA	4.985 (2)	6.360 (2)
Recovery Day 92	6.315 (2)	3.835 (2)	NA	NA	NA	NA	5.565 (2)	5.960 (2)
White Blood Cell (count/10^3/μL)								
Pre-study (Day -14)	10.673	9.557	9.893	11.628	10.530	11.425	12.235	11.052
Pre-study (Day -7)	10.323	7.693	9.853	9.390	10.035	9.948	8.022	10.673*
Day 15	11.000	8.517	10.805	11.563	13.000*	11.900*	17.400**	15.000**
Day 30	10.410	9.885	11.960	12.365	9.705	11.068	16.317**	18.333**
Day 92	8.915 (4)	7.193 (4)	11.490 (3)	11.853 (4)	15.458 (4)	12.573*(4)	NA	NA
Day 170	10.025 (4)	7.133 (4)	15.133 (3)	11.197 (3)	13.493 (4)	12.088*(4)	NA	NA
Recovery Day 14	12.880 (2)	6.935 (2)	NA	NA	NA	NA	12.055 (2)	14.200 (2)
Recovery Day 92	9.280 (2)	6.780 (2)	NA	NA	NA	NA	9.745 (2)	10.665 (2)

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical chemistry								
Albumin (g/dL)								
Pre-study	4.22	-	4.13	-	4.38	-	4.27	-
Day 15	4.10	-	4.05	-	4.15	-	4.12	-
Day 30	4.17	-	4.10	-	4.03	-	3.98	-
Day 92	4.15 (4)	-	4.07 (3)	-	4.08 (4)	-	NA	NA
Day 170	4.23 (4)	-	3.90 (3)	-	3.88* (4)	-	NA	NA
Recovery Day 14	4.05 (2)	-	NA	NA	NA	NA	4.50 (2)	-
Recovery Day 92	4.15 (2)	-	NA	NA	NA	NA	4.15 (2)	-
Globulin (g/dL)								
Pre-study	3.32	3.40	3.30	3.48	3.48	3.73	3.48	3.52
Day 15	3.48	3.53	3.35	3.55	3.53	4.03	3.67	3.77
Day 30	3.40	3.48	3.33	3.40	3.58	3.70	3.85*	3.88
Day 92	3.45 (4)	3.48 (4)	3.37 (3)	3.75 (4)	3.65 (4)	4.03* (4)	NA	NA
Day 170	3.53 (4)	3.63 (4)	3.43 (3)	3.80 (3)	3.73 (4)	4.13 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	3.50 (2)	3.50 (2)	NA	NA	NA	NA	4.25 (2)	4.20 (2)
Recovery Day 92	3.45 (2)	3.50 (2)	NA	NA	NA	NA	3.60 (2)	4.10 (2)
A/G Ratio								
Pre-study	1.28	1.20	1.25	1.15	1.28	1.10	1.25	1.18
Day 15	1.20	1.17	1.20	1.13	1.20	1.00*	1.13	1.10
Day 30	1.23	1.18	1.23	1.13	1.15	1.05	1.03*	1.02*
Day 92	1.23 (4)	1.20 (4)	1.23 (3)	1.05 (4)	1.15 (4)	0.98 (4)	NA	NA
Day 170	1.23 (4)	1.13 (4)	1.17 (3)	0.93 (3)	1.05 (4)	0.93 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	1.15 (2)	1.20 (2)	NA	NA	NA	NA	1.05 (2)	0.95 (2)
Recovery Day 92	1.20 (2)	1.10 (2)	NA	NA	NA	NA	1.15 (2)	1.00 (2)

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
T4 (μg/dL)								
Day 30	5.92	5.92	4.88	4.68	6.45	5.73	9.72	6.97
Day 92	6.68(4)	6.63 (4)	4.53 (3)	5.90 (4)	6.75 (4)	6.45 (4)	NA	NA
Day 170	6.23 (4)	8.88 (4)	5.97 (3)	6.40 (3)	9.45** (4)	<6.20 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	6.65 (2)	6.35 (2)	NA	NA	NA	NA	5.90 (2)	6.75 (2)
Recovery Day 92	8.45 (2)	9.25 (2)	NA	NA	NA	NA	8.10 (2)	6.65 (2)
Total T3 (ng/dL)								
Day 30	211.2	202.0	200.0	179.8	189.5	184.8	258.2	175.0
Day 92	189.5 (4)	214.8(4)	180.0 (3)	190.0 (4)	186.0 (4)	209.5 (4)	NA	NA
Day 170	199.0 (4)	194.8 (4)	207.0 (3)	236.0 (3)	203.0 (4)	125.5 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	218.5 (2)	243.5 (2)	NA	NA	NA	NA	124.5 (2)	216.5 (2)
Recovery Day 92	252.0 (2)	256.0 (2)	NA	NA	NA	NA	227.5 (2)	241.5 (2)
TSH (UIU/mL)								
Day 30	0.5278	0.8297	0.5150	0.8268	0.8365	1.3518	0.5023	0.7688
Day 92	0.4143 (4)	0.5653 (4)	0.2917 (3)	0.4388 (4)	0.7553 (4)	3.3020 (4)	NA	NA
Day 170	0.5398 (4)	0.9055 (4)	0.3543 (3)	0.6443 (3)	0.8783 (4)	39.0393 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	0.4645 (2)	0.3635 (2)	NA	NA	NA	NA	0.5660 (2)	0.4035 (2)
Recovery Day 92	0.3790 (2)	0.9765 (2)	NA	NA	NA	NA	0.5175 (2)	0.7035 (2)
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral blood leukocyte counts								
$CD3^+$ Lymphocytes ($10^3/\mu L$)								
Pre-study (Day -14)	5.128	3.247	4.453	5.053	3.965	4.948	2.985**	4.252
Pre-study (Day -7)	4.265	2.410	4.085	3.123	3.483	3.745	3.365	3.383
Day 15	4.392	3.585	4.940	4.543	6.263*	5.790*	9.072**	6.887**
Day 30	3.403	2.230	3.500	2.848	3.015	3.243	6.322*	4.737**
Day 92	3.370 (4)	2.818(4)	4.933 (3)	4.413(4)	6.120*(4)	5.253 (4)	NA	NA

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Day 170	4.473 (4)	2.853 (4)	5.987 (3)	3.407 (3)	5.228 (4)	4.203 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	4.695 (2)	1.740 (2)	NA	NA	NA	NA	2.925 (2)	3.445 (2)
Recovery Day 92	3.720 (2)	2.540 (2)	NA	NA	NA	NA	3.460 (2)	3.510 (2)
$CD3^+CD4^+$ Lymphocytes ($10^3/\mu L$)								
Pre-study (Day -14)	2.747	1.797	2.368	2.515	1.980	2.295	1.580*	2.282
Pre-study (Day -7)	2.352	1.407	2.270	1.655	1.818	1.828	1.843	1.858
Day 15	2.428	1.990	3.085	2.548	3.768*	3.280	6.445**	5.057**
Day 30	1.960	1.298	2.218	1.793	1.810	2.148	4.442*	3.463**
Day 92	1.910 (4)	1.525 (4)	3.013 (3)	2.438 (4)	3.445 (4)	3.123 (4)	NA	NA
Day 170	2.470 (4)	1.488 (4)	3.417 (3)	1.720 (3)	2.870 (4)	2.400 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	2.595 (2)	1.050 (2)	NA	NA	NA	NA	1.445 (2)	2.075 (2)
Recovery Day 92	2.235 (2)	1.560 (2)	NA	NA	NA	NA	1.635 (2)	1.850 (2)
$CD3^+CD8^+$ Lymphocytes ($10^3/\mu L$)								
Pre-study (Day -14)	1.740	1.113	1.523	2.153*	1.478	2.198*	1.030*	1.692
Pre-study (Day -7)	1.332	0.792	1.413	1.238	1.153	1.465	1.085	1.167
Day 15	1.453	1.242	1.553	1.690	1.890	2.123*	1.660	1.490
Day 30	1.142	0.762	1.098	0.955	0.920	0.930	1.545*	0.982
Day 92	1.128 (4)	0.995 (4)	1.707 (3)	1.693 (4)	2.155* (4)	1.815 (4)	NA	NA
Day 170	1.590 (4)	1.073 (4)	2.183 (3)	1.530 (3)	2.038 (4)	1.640 (4)	NA	NA
Recovery Day 14	1.350 (2)	0.540 (2)	NA	NA	NA	NA	1.200 (2)	1.185* (2)
Recovery Day 92	1.230 (2)	0.820 (2)	NA	NA	NA	NA	1.500 (2)	1.415* (2)

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Gross pathology								
End of dosing phase								
Axillary lymph node								
Enlarged	0	0	0	1	0	1	1	0
Bronchial lymph node								
Enlarged	0	0	1	0	0	1	0	0
Mandibular lymph node								
Enlarged	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node, uns								
Enlarged	0	0	0	1	2	1	2	0
Mesenteric lymph node								
Enlarged	1	0	2	0	2	1	1	1
Skin and adnexa								
Abnormal Surface	0	0	0	0	0	0	3	0
Wound/Scar/Scab	0	0	0	0	0	0	1	0
Alopecia	0	0	0	2	0	0	2	0
Lymphadenopathy Generalized	0	0	0	0	0	0	2	2
Fracture	0	0	0	1	0	0	0	0
End of treatment-free phase								
Noteworthy findings	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Organ weights								
End of dosing phase								
Liver								
Absolute	74.58 g	59.80 g	18.2	23.9**	8.9	11.8	NA	NA
Relative organ weight (% body weight)	1.85	1.80	6.5	28.9**	10.8*	24.4*	NA	NA
Relative organ weight (% brain weight)	99	88	17.2	28.4**	16.2*	27.3**	NA	NA
Brain								
Absolute	-	67.73 g	-	-2.7	-	-11.4*	NA	NA
End of treatment-free phase								
Noteworthy findings	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
Microscopic pathology								
End of dosing phase								
No. examined (unless otherwise specified)	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Adrenal(s)								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Marked	0	0	0	0	0	1	1	0

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Axillylary lymph node								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	0	1	1	2	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Brain								
Infiltration, Mononuclear cells, Choroid plexus								
Minimal	0	0	0	1	3	2	2	2
Mild	0	0	1	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	1	0	1	0	0	0
Cecum								
Inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	1	2	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Erosion/Ulcer								
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Colon								
Inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	1	3	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Erosion/Ulcer								
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Duodenum								
Inflammation								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Esophagus								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	1	0	1	0	1	0	1	3
Mild	0	0	0	0	1	1	2	0
Eye(s)								
Infiltration, Mononuclear cells, Conjunctiva and extra ocular muscles								
Minimal	0	2	0	1	1	3	3	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
GALT								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	1	0	1	0	0	1
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0
Heart								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	2	2	1	3	2	2
Mild	0	0	1	1	1	0	0	0
Inflammation, Mononuclear cells								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidney(s)								
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	1	0	2	1	2	1	2	1
Mild	0	0	0	0	0	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Bronchial lymph node								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	1	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	1	1	0	0
Liver								
Infiltration, Mononuclear cells, Periportal								
Minimal	3	2	3	3	4	3	0	2
Mild	0	0	1	1	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Mandibular lymph node								
Hyperplasia, Lymphoid								
Mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Lymph node, uns								
Hyperplasia, Lymphoid								
Moderate	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA
Mammary gland								
Inflammation, Mononuclear cells								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenteric lymph node								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	1	2	0	1	0	0
Mild	0	0	1	0	2	0	0	0

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Pancreas								
Infiltration, Mononuclear cells, Acinar								
Minimal	1	0	0	2	1	2	3	1
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0
Atrophy, Acinar								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, Mononuclear cells, Acinar								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Pituitary								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	1	0	1	1	0	0
Mild	0	0	0	1	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Prostate		NA		NA		NA		NA
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	1		3		2		1	
Mild	0		0		1		1	
Parathyroid(s)								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	2	1	2	1	1	0
Mild	1	1	1	0	0	1	2	0

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Biceps Femoris Muscle								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	1	0	1	0	0	2
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Salivary gland								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	1	2	1	1	0	2	1
Mild	0	0	0	1	0	1	0	0
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	0	0	2	0	1	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	2	2	1
Moderate	0	0	0	1	1	0	0	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2
Skin and adnexa								
Atrophy, Follicular								
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	2	3	3	3	0	4	0	3
Mild	0	0	0	1	2	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Marked	0	0	0	0	0	0	2	0
Spleen								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	0	0	1	1	2	3
Mild	0	0	0	0	0	1	1	1

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Stomach								
Inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild	0	1	0	0	0	0	1	1
Seminal vesicle		NA		NA		NA		NA
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	0		0		0		1	
Tongue								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	1	2	2	3	1	2	2	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Thyroid								
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	1	1	2	2	2	2	2	2
Mild	0	0	0	0	1	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0
Atrophy								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Marked	0	0	0	0	0	1	0	0
Inflammation, Mononuclear cells								
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Uterus	NA		NA		NA		NA	
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal		0		3		1		3

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Bone Marrow Sternum								
Hyperplasia, Lymphoid								
Minimal	0	0	1	1	2	1	2	2
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0
End of treatment-free phase								
No. examined	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2
Adrenal(s)			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0					1	2
Brain			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells, Choroid plexus								
Minimal	0	0					0	2
Esophagus			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	1	0					2	0
Eye(s)			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells, Choroid/ciliary body								
Minimal	0	1					1	2
Heart			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0					2	2
Pituitary			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells								
Mild	0	0					0	1

Design of Study 2004-0150, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Dose Level (mg/kg)	0		5		15		50	
No. Animals (Main + Recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4+2	F: 4+2
Salivary gland			NA	NA	NA	NA		
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	0	0					1	0
Skin and adnexa			NA	NA	NA	NA		
Inflammation, Mononuclear cells								
Minimal	1	0					1	2
Thyroid			NA	NA	NA	NA		
Infiltration, Mononuclear cells								
Minimal	0	0					1	1
Mild	0	0					1	0
NOAEL: NA				**HNSTD:** 15 mg/kg/week				

- = No noteworthy findings; * $p<0.05$; ** $p<0.01$ indicate levels of significant difference from control using either Fisher's Least Significant Difference test (if the variances were equal) or Cochran-Cox modified t-test of significance (if the variances were unequal).

ADA = anti-drug antibody; A/G = albumin/globulin; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximal concentration; ECG = electrocardiogram; F = female; GALT = gut associated lymphoid tissue; GLP = Good Laboratory Practice: HNSTD = highest non-severely toxic dose; HR = heart rate; LLOQ = lower level of quantitation; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect; TSH = thyroid-stimulating hormone; T3 = triiodothyronine; T4 = thyroxine; WBC = white blood cell.

[a] Dosing for the 50 mg/kg group was suspended after the 6th or 7th dose and on Day 79, the surviving 2 animals/sex were combined with the 2 animals/sex from the control group in a newly designated 99-day recovery period.

[b] One M and 1 F died/were euthanized during the course of study without relation to treatment (per-acute diarrhea caused by infection and arm fracture, respectively)

[c] Seven animals were euthanized due to severe adverse reaction during the course of the study, and 1 F was euthanized in relatively good condition for comparison with the prematurely terminated animals.

[d] Seven animals with pre-dose concentrations of tremelimumab below LLOQ (2 animals/sex/group) were evaluated; 5 animals could not be evaluated for ADAs (1 F in 5 mg/kg group, 3 M and 1 F in 15 mg/kg group, and 1 M and 1 F in 50 mg/kg group) due to assay interference and tremelimumab levels not reaching the lower limit of quantitation..

[e] One M and 1 F in 5 mg/kg group died/were euthanized due to effects that were not considered related to treatment (per-acute diarrhea caused by infection and arm fracture, respectively); 4 M and 3 F at 50 mg/kg were euthanized due to severe toxicities observed; 1 F in 50 mg/kg group was euthanized on Day 79 to allow a comparison with other prematurely terminated animals.

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

該当なし

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

該当なし

2.6.7.10　がん原性試験

該当なし

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験

Design of Study 2501-001, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Study Number: 2501-001	**Test Article: Tremelimumab**	**Test Article Lot:** [redacted]	**Number of Doses: 5**
Control Article: L-histidine (0.0564%), L-histidine HCl (0.0343%), trehalose dihydrate (8.4%), polysorbate 80 (0.02%)			**Species:** Cynomolgus monkey
Route of Administration: Intravenous bolus	**Duration of Post-dose Treatment-free Period:** 52 days		**GLP Compliance:** Yes
Study Type: Reproductive toxicity/embryo-foetal development			
Study Objective: To investigate the embryonic and teratogenic effects when administered to pregnant cynomolgus monkey during the period of organogenesis			

Group	**Test Article**	**Number of Pregnant Females**	**Dose Level (mg/kg)**	**Number of Animals with Cesarean section on GD 100**
1	Vehicle	16	0	13
2	Tremelimumab	16	5	12
3	Tremelimumab	16	15	14
4	Tremelimumab	16	30	12

Toxicokinetics (group mean value)					
Dose Level (mg/kg)		0	5	15	30
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	GD 20	NA	2830 ± 530	9050 ± 1190	18600 ± 6540
	GD 48	NA	3680 ± 977	12900 ± 3750	23800 ± 4720
$AUC_{Days\ 20-49}$ (µg·h/mL)		NA	76800 ± 17200	208000 ± 59900	454000 ± 75000
C_{max} (µg/mL)	GD 20	NA	154 ± 32.2	498 ± 78.4	954 ± 345
	GD 48	NA	187 ± 42.8	707 ± 144	1230 ± 210
ADA incidence (number of M/F) and percentage positive		NA	NA	NA	NA

Design of Study 2501-001, Endpoints Evaluated, and Noteworthy Findings

Endpoints Evaluated (Dams): mortality, clinical signs, body weight, food consumption, pregnancy outcome (pre-implantation loss/abortions, foetal/embryonic death, placental weights). **Endpoints Evaluated (Fetuses)**: mortality, body weight, foetal body measurements, organ weights, and external, visceral, and skeletal examinations.
Noteworthy Findings
Slight increase in the incidence of diarrhoea in treated animals. There were no noteworthy tremelimumab-related findings in any of the other study endpoints evaluated.

ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximal concentration; GD = Gestation Day; NA = not applicable.

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：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

該当なし

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当なし

2.6.7.16 局所刺激性試験

該当なし

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 組織交差反応性試験

Tissue Cross-reactivity Studies with Tremelimumab in Normal Human and Cynomolgus Monkey Tissues

Study Type/Number	Tissue	Study Findings
TCR with normal human tissues IM676	Human	Positive staining was specific for lymphocytes in lymphoid tissues including tonsil, lymph node, spleen, and noninvoluted thymus. Positive staining was noted on rare to occasional lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissue in the small intestine and colon, and rare lymphocytes in lymphoid nodules of one thyroid gland.
TCR with normal cynomolgus monkey tissues IM645	Cynomolgus monkey	Positive staining was specific for lymphocytes in lymphoid tissues including tonsil, lymph node, spleen, and thymus. Positive staining was noted on rare to occasional lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissue in stomach and colon.

TCR = tissue cross-reactivity