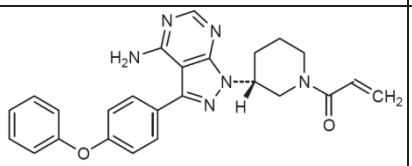
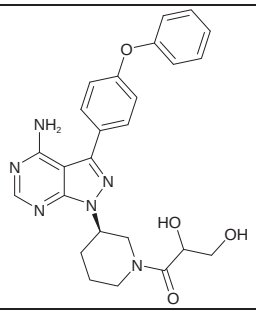
目次

2.6.6 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 11
2.6.6.4 遺伝毒性試験 22
2.6.6.5 がん原性試験 26
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 26
2.6.6.7 局所刺激性試験 28
2.6.6.8 その他の毒性試験 29
2.6.6.9 考察及び結論 36
2.6.6.10 図表 45
2.6.6.11 参考文献 45
2.6.7 毒性試験概要表 1

略号一覧表

略号又は略称	化学名又は一般名	構造式	由来
イブルチニブ（PCI-32765, JNJ-54179060）	1-{(3*R*)-3-[4-Amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl}prop-2-en-1-one		主薬
PCI-45227（JNJ-54243761）	ジヒドロジオール体（M37）		代謝物

略号又は略称	名称及び内容
A/G	アルブミン/グロブリン（albumin/globulin）
ALP	アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase）
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase）
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase）
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve）
AUC_{last}	0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last quantifiable time）
AUC_{∞}	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinite time）
AUC_{24}	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve from zero to 24 hours）
BCR	B 細胞受容体（B-cell receptor）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
Ca	カルシウム（calcium）
CHO	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株（Chinese hamster ovary cell line）
CLL	慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia）
C_{max}	最高血漿中濃度（maximum plasma concentration）
d	日（day）
DMSO	ジメチルスルホキシド（dimethylsulfoxide）
ECG	心電図（electrocardiogram）
FDA	米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GMP	医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（Good Manufacturing Practice）
h	時間（hour）
Hb	ヘモグロビン（hemoglobin）
HDW	hemoglobin distribution width
HED	ヒト等価用量（human equivalent dose）
hERG	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（human ether-a-go-go related gene）
HP-β-CD	hydroxypropyl-β-cyclodextrin

略号又は略称	名称及び内容
Ht	ヘマトクリット（hematocrit）
IC_{50}	50%阻害濃度（50% inhibitory concentration）
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization）
Ig	免疫グロブリン（immunoglobulin）
K	カリウム（potassium）
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析（liquid chromatography-tandem mass spectrometry）
MCH	平均赤血球血色素量（mean corpuscular hemoglobin）
MCHC	平均赤血球血色素濃度（mean corpuscular hemoglobin concentration）
MCV	平均赤血球容積（mean corpuscular volume）
M:E	顆粒球系:赤芽球系細胞（myeloid:erythroid）
MTD	最大耐量（maximum tolerated dose）
NOAEL	無毒性量（no-observed-adverse-effect level）
NZW	ニュージーランドホワイト（New Zealand White）
OECD	経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development）
PCEs	多染性赤血球（polychromatic erythrocytes）
PIF	photo irritation factor
RBC	赤血球（red blood cell）
RDW	赤血球分布幅（red blood cell distribution width）
SD	Sprague-Dawley
SLL	小リンパ球性リンパ腫（small lymphocytic lymphoma）
TDAR	T 細胞依存性抗体産生（T-cell dependent antibody response）
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間（time to reach the maximum plasma concentration）
UV	紫外線（ultraviolet）
WBC	白血球（white blood cell）

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

イブルチニブ（PCI-32765，JNJ-54179060）はブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）に対する強力な阻害作用を有する経口投与可能な薬剤である。毒性試験の一覧を表 2.6.6-1 に示し，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の有無及び試験施設の情報については毒性試験概要表（2.6.7.1）に記載する。

表 2.6.6-1 イブルチニブの主要な毒性試験の一覧表

Study Type and Duration of Dosing	Route of Administration	Species/ Test System	Dose Level[a] (mg/kg/d)	Recovery Period
Single-Dose Studies				
Acute toxicity[b]	Oral	Mouse	0, 500, 1000, 2000	-
Acute toxicity	Oral	Rat	0, 400, 1000, 2000	-
Acute toxicity[b]	Intravenous	Rat	0, 50, 100, 150	-
Escalating dose	Oral	Dog	10, 100, 200	-
Escalating dose	Subcutaneous	Dog	10, 20, 40	-
Repeat-Dose Studies				
Two-week toxicity	Oral	Rat	0, 12, 36, 120	0 weeks
Four-week toxicity	Oral	Rat	0, 2.5, 40, 300/150 (M/F)	4 weeks
Thirteen-week toxicity	Oral	Rat	0, 30, 100, 300/175[c] (M/F)	6 weeks
Two-week toxicity	Oral	Dog	0, 4, 12, 40	0 weeks
Four-week toxicity	Oral	Dog	0, 1.5, 24, 150	4 weeks
Thirteen-week toxicity	Oral	Dog	0, 30, 80/60[d], 220/120[d]	13 weeks
Genotoxicity				
Bacterial mutation	*In vitro*	*S. typhimurium*/ *E. coli*	up to 5000 µg/plate	-
Mammalian chromosome aberration	*In vitro*	Chinese hamster ovary cells	0, 5 to 40 µg/mL	-
Mammalian chromosome aberration	*In vitro*	Chinese hamster ovary cells	0, 5 to 37.5 µg/mL	-
Bone-marrow erythrocyte micronucleus	Oral	Mouse	0, 500, 1000, 2000	-
Reproductive and Developmental Toxicity				
Dose range-finding embryo/fetal development[b]	Oral	Rat	0, 20, 60, 200	-
Embryo/fetal development	Oral	Rat	0, 10, 40, 80	-
Dose range-finding embryo/fetal development[b]	Oral	Rabbit	0, 10, 30, 100	-
Local Tolerance				
Phototoxicity	*In vitro*	Balb/c 3T3 cells	0, 2.73 to 70.00 µg/mL	-
Other Toxicity Studies				
Immunotoxicity	Oral	Rat	0, 10, 30, 100	4 weeks

[a] Dose levels calculated on the basis of the active component of ibrutinib.
[b] Non-GLP study: 1) acute study not required by ICH guidelines S9 and M3(R2) or 2) exploratory study conducted to support dose selection for definitive embryo/fetal development toxicity evaluation.
[c] Dose was lowered in females from 300 to 175 mg/kg/d on Day 8.
[d] On study day 42, dose levels were reduced from 80 and 220 mg/kg/d to 60 and 120 mg/kg/d, respectively.
- = not applicable

イブルチニブは，治療方法の選択肢が限られた進行性 B 細胞腫瘍患者の治療を目的とすることから，毒性試験は「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」［日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S9 ガイドライン］に準じて実施した。さらに，2 週間反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験については，「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験

の実施についてのガイダンス」［ICH M3（R2）ガイドライン］に準じ，健康成人被験者を対象とした臨床薬理学試験を支持する目的で実施した。

毒性試験の動物種としては，ラット及びイヌの代謝経路がヒトと類似していること，さらにラットでは脾細胞【2.6.2.2.1.6 参照】，イヌではリンパ節及び末梢血単核球【2.4.1.1 参照】に BTK が発現していることから，げっ歯類ではラット，非げっ歯類ではビーグル犬を選択した。

特に断りのない限り，本毒性試験の概要文に記載した試験は，米国食品医薬品局（FDA）の GLP（21 CFR Part 58）に準拠し，主要な試験は経済協力開発機構（OECD）加盟国で実施した。さらに，特に記載がない限り，この概要文中に記載した毒性作用は，対照群と比較し，本薬投与に関連があると考えられた影響である。毒性評価に用いた動物の系統又は品種は，CD-1 及び ICR マウス，Sprague-Dawley（SD）ラット，ビーグル犬及びニュージーランドホワイト（NZW）ウサギであった。試験デザインの詳細，毒性作用の程度及び重症度などの定量的データは，毒性試験概要表（2.6.7）に示す。なお，試験実施日及び生データの所在は，提出する各試験報告書に記載した。

イブルチニブは単一のキラル中心を有した *R*-エナンチオマーであり，分子量は 440.5（無水，遊離塩基）である。PCI-45227（M37）は，実験動物及びヒトで認められたイブルチニブの主要な代謝物（ジヒドロジオール体）であり，BTK を可逆的に阻害し，その阻害活性はイブルチニブの約 1/15 であった。臨床製剤は，粉末を充填したゼラチンカプセルである。ラット及びイヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験，並びにマウスを用いた小核試験では，微粉化したイブルチニブを 0.1%ラウリル硫酸ナトリウム，0.4% Cremophor EL 及び 0.5～1.0%メチルセルロースを含有する溶媒に懸濁した水性懸濁液を用いた。2 週間及び 13 週間反復投与毒性試験，胚・胎児発生に関する試験，免疫毒性試験，並びにラットを用いた不純物の毒性試験では，Cremophor EL を含有しない同様の懸濁液を使用した。

第 Ib/II 相臨床試験において，慢性リンパ性白血病（CLL）/小リンパ球性リンパ腫（SLL）患者にイブルチニブ 420 mg を 1 日 1 回連日経口投与した。CLL/SLL 患者に対する標準用量は 420 mg/日である。これら患者集団の定常状態におけるイブルチニブの最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）の平均値を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2 臨床用量及び定常状態における曝露量

Indication	Fixed Dose[a] (mg/d)	Dose Level[b] (mg/kg/d)	Mean C_{max} (ng/mL)	Mean AUC_{24} (ng·h/mL)
CLL/SLL	420	7.0	132[c]	680[c]

[a] Once daily oral administration.
[b] Based on an 60 kg individual.
[c] Mean steady-state C_{max} and AUC values from clinical study PCYC-1102-CA in CLL patients, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, C_{max} n=47, AUC_{24} n=45).

2.6.6.1.1 単回投与毒性試験

イブルチニブの単回強制経口投与における最大非致死量は，マウスでは雌雄とも最高用量の 2000 mg/kg であった。ラットでは死亡例が認められ，最小致死量は雄性では 2000 mg/kg 及び雌性では 1000 mg/kg であり，最大非致死量は雄性で 1000 mg/kg 及び雌性で 400 mg/kg であった。イヌの単回経口投与におけるイブルチニブの最大耐量（MTD）は最高用量の 200 mg/kg であった。

2.6.6.1.2 反復投与毒性試験

2.6.6.1.2.1 ラット

2 週間投与試験では，ラットにイブルチニブを 0，12，36 及び 120 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，14 日間強制経口投与した。病理組織学的検査では主な所見として，全投薬群で膵臓に軽微から中等度の腺房萎縮が認められた。その重症度及び発現率は用量依存的に増加し，36 及び 120 mg/kg/日投与群における膵臓の変化は有害作用であると考えられた。本試験における無毒性量（NOAEL）は 12 mg/kg/日と判断された。

4 週間投与試験では，ラットにイブルチニブを 0，2.5，40 及び 150（雌性）又は 300（雄性）mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 29 日間強制経口投与した。投与期間中に，高用量群（300 mg/kg/日）では雄性 15 例中 1 例に死亡が認められた。一般状態観察では，300/150 mg/kg/日投与群で軟便及びこれに関連した体表の着色が認められた。剖検では，300/150 mg/kg/日投与群で下顎リンパ節の腫大が認められた。病理組織学的検査では，300/150 mg/kg/日投与群で，下顎リンパ節に過形成，脾臓にリンパ球枯渇，胸腺に単細胞壊死（アポトーシス），前胃に扁平上皮過形成，皮膚に炎症性変化及び肝臓に軽微な肝細胞壊死が認められた。4 週間の休薬後に高用量群の雄性 1 例で軽微な肝細胞壊死が認められたが，それ以外の病理組織学的変化は完全に回復した。40 mg/kg/日投与群の雌性 1 例に単一肝葉で肝細胞壊死がみられたことから，報告書最終化の時点では NOAEL は 2.5 mg/kg/日と判断された。その後，この単一肝葉壊死は偶発的な変化であり，肝葉の捻転によって生じたもの [1)] と考えられたことから，科学的に妥当な NOAEL は 40 mg/kg/日であると判断された。

13 週間投与試験では，ラットにイブルチニブを 0，30，100，175（雌性）又は 300（雄性）mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，91 又は 92 日間強制経口投与した。試験期間中に，雄性の高用量群（300 mg/kg/日）では 20 例中 7 例及び雌性の高用量群（175 mg/kg/日）では 20 例中 1 例に死亡又は切迫屠殺が認められた。一般状態観察では，100 及び 300/175 mg/kg/日投与群で，軟便，顔面発赤，口又は前肢周囲に赤色物質が認められた。病理組織学的検査では主な毒性所見として，100 又は 300/175 mg/kg/日投与群で，骨皮質及び骨梁の軽微から軽度の菲薄，膵臓に中等度の腺房萎縮，リンパ節，脾臓及び胸腺に中等度から重度のリンパ球枯渇，腸に潰瘍を伴う炎症，並びに前胃に潰瘍を伴う萎縮が認められた。これらの標的器官でみられた病理組織学的変化は，6 週間の休薬により部分的又は完全に回復した。本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.1.2.2 イヌ

2 週間投与試験では，イヌにイブルチニブを 0，4，12 及び 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，14 日間強制経口投与した。一般状態観察では 12 及び 40 mg/kg/日投与群で軟便が認められた。病理組織学的検査では 4 及び 12 mg/kg/日投与群の雄性，並びに 40 mg/kg/日投与群の雌雄に肝細胞のグリコーゲンの軽微な増加がみられたが，重篤な毒性所見は認められなかった。本試験では明らかな毒性が認められなかったことから，NOAEL は 40 mg/kg/日と判断された。

4 週間投与試験では，イヌにイブルチニブを 0，1.5，24 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 29 日間強制経口投与した。一般状態観察では，高用量群（150 mg/kg/日）で軟便，便退色及び下痢が認められたが，休薬期間の早期に回復した。眼科学的検査では，150 mg/kg/日投与群で 10 例中 3 例に，軽度の角膜ジストロフィー/混濁が認められた。これら 3 例を回復群に供し

たが，試験 51 日（休薬後 23 日）にも軽度から中等度の片側性の角膜ジストロフィー/混濁が認められた。これらの病変は角膜脂質代謝障害に起因してイヌで自然発生的にみられる変化であると考えられるが [2)]，イブルチニブとの関連性を否定することはできなかった。病理組織学的検査では，150 mg/kg/日投与群で数例の腸に軽微から軽度の炎症が認められ，4 週間の休薬後では雄性 2 例中 1 例の腸に軽微な炎症が認められた。試験報告書最終化の時点では，24 mg/kg/日投与群の 1 例に軽微な腎梗塞の病理組織学的所見がみられたことから，NOAEL は 1.5 mg/kg/日と判断された。しかしながら，この所見は 13 週間反復投与毒性試験では再現されず，また，これは若年のビーグル犬で一般的にみられる自然発生病変（間質性炎症）と考えられることから，本試験における科学的に妥当な NOAEL は 24 mg/kg/日と判断された。

13 週間投与試験では，イヌにイブルチニブを 0，30，80 及び 220 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，強制経口投与を開始したが，80 及び 220 mg/kg/日投与群で数例に一般状態の悪化がみられたため，投与後 6 週に中間用量を 80 mg/kg/日から 60 mg/kg/日，高用量を 220 mg/kg/日から 120 mg/kg/日に減量し，投与終了時（試験 91 又は 92 日）まで経口投与した。220 mg/kg/日投与群では本薬投与に関連し，腸炎を原因とする一般状態の悪化がみられたことから雄性 6 例中 1 例を投与 5 週に切迫屠殺した。一般状態観察では，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群で，糞便異常（軟便及び下痢等）及び嘔吐が認められた。眼科学的検査では，イヌ 4 週間反復投与毒性試験と同様に，220/120 mg/kg/日投与群の 1 例に軽度な角膜ジストロフィーが認められた。病理組織学的検査では，80/60 又は 220/120 mg/kg/日投与群で，急性腸炎，パイエル板のリンパ球枯渇及び胃の平滑筋変性が認められた。これらの病理組織学的所見は，13 週間の休薬により完全に回復した。本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.1.3 遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験，染色体異常試験及びマウス骨髄小核試験で評価した結果，イブルチニブに遺伝毒性は認められなかった。

2.6.6.1.4 生殖発生毒性試験

2.6.6.1.4.1 ラット

妊娠ラットにイブルチニブを 0，10，40 及び 80 mg/kg/日の用量で妊娠 6～17 日（器官形成期）に強制経口投与し，妊娠 20 日に帝王切開して，胚・胎児発生に対する影響を評価した。母動物に本薬投与に関連する明らかな影響は認められなかったことから，母動物に対する NOAEL は 80 mg/kg/日と判断された。胎児では，40 及び 80 mg/kg/日投与群で平均体重の減少，80 mg/kg/日投与群で着床後胚損失率の増加，生存胎児数の減少，内臓奇形及び骨格変異が認められたことから，胚・胎児に対する NOAEL は 10 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.1.4.2 ウサギ

妊娠ウサギにイブルチニブを 0，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で妊娠 7～19 日に強制経口投与し，用量設定試験を実施した。30 及び 100 mg/kg/日投与群では体重及び摂餌量の減少が認められた。100 mg/kg/日投与群では，流産，生存胎児数の減少及び胎児体重の減少が認められた。胎児の外表奇形又は発達変異は認められなかった。

2.6.6.1.5 光毒性試験

マウス Balb/c 3T3 線維芽細胞に，紫外線（UV）照射及び非照射の条件下でイブルチニブを曝露し，細胞の生存率の相対的な減少を指標として光毒性を評価した。2.73～70.00 µg/mL の濃度範囲で独立した試験を 2 回実施した結果，イブルチニブに光毒性は認められなかった。

2.6.6.1.6 免疫毒性試験

ラット 13 週間反復投与試験［0，30，175（雌性）/300（雄性）mg/kg/日］において，試験 11 週に末梢血を採血し，イムノフェノタイピングを実施して免疫毒性を評価した。300 mg/kg/日投与群の雄性，30 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性では B 細胞の絶対数が減少した。30 mg/kg/日投与群の B 細胞数の変化は有害作用ではないと考えられた。以上のように，イムノフェノタイピングでは主に B 細胞に影響が認められたが，これは BCR シグナル伝達経路に対するイブルチニブの阻害作用による変化であると考えられた。

雌性ラットにイブルチニブを 0，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 33 日間反復強制経口投与して免疫毒性を評価し，28 日間の休薬による所見の可逆性を評価した。10 mg/kg/日以上の投与群では，用量依存的に抗 keyhole limpet hemocyanin（KLH） IgM 及び IgG 反応の抑制，IgM 濃度の減少，並びに好中球数及び顆粒球系:赤芽球系細胞（M:E）比の増加が認められた。さらに，100 mg/kg/日投与群では IgG 濃度，リンパ球数及び白血球（WBC）数の減少がみられ，病理組織学的検査で脾臓のリンパ球枯渇及び骨髄リンパ球の減少が認められた。このように免疫系への影響が認められたが，いずれもイブルチニブの薬理作用に関連したものであった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

本薬の急性毒性は，マウスを用いた単回経口投与，ラットを用いた単回経口及び静脈内投与，イヌを用いた単回経口及び皮下投与（漸増）によって評価し，本薬の経口投与による最大非致死量及び最小致死量を求めた（表 2.6.6-3）。ヒト等価用量（HED）に基づくと，経口投与による本薬の急性作用に対する感受性は，ラットが最も高い動物種であり，次いでイヌ及びマウスの順であった。なお，本薬の臨床用量は 420 mg/日であり，体重換算（体重を 60 kg と仮定）あたりの用量は 7 mg/kg/日となる。

表 2.6.6-3 イブルチニブの経口，静脈内又は皮下投与による急性毒性

Species	Route	Gender	Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)		Minimum Lethal Dose (mg/kg)	
			Actual	HED [a]	Actual	HED [a]
Mouse	Oral [b]	M and F	2000	160	>2000	>160
Rat	Oral	F	400	64	1000	160
		M	1000	160	2000	320
	Intravenous [b]	F	50	8.0	100	16.0
Dog	Oral	M and F	200	108	>200	>108
	Subcutaneous	M and F	40	21.6	>40	>21.6

[a] Human equivalent dose; conversion factors: mouse = 0.08, rat = 0.16, dog = 0.54.
[b] Non-GLP study.
F = female; M = male

2.6.6.2.1 マウス単回経口投与毒性試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.1.1】

【試験方法】

CD-1 マウス（1 群雌雄各 3 例）にイブルチニブを 0（溶媒），500，1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。摂餌は自由摂取とした。一般状態及び行動変化を連続 3 日間観察し，その後，肉眼的検査は実施せずに安楽死させた。

【結果】

500 及び 1000 mg/kg 投与群では，軽度から中等度の粗毛が認められた。2000 mg/kg 投与群では，軽度から中等度の自発運動の低下，眼瞼下垂，体温低下又は努力性呼吸が雌雄各 1 例で認められた。試験期間を通して死亡例は認められなかった。したがって，本試験における最大非致死量は最高用量の 2000 mg/kg，概略の致死量は 2000 mg/kg 超であった【2.6.7.5 参照】。

2.6.6.2.2 ラット単回経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.1.2】

【試験方法】

SD ラット（1 群雌雄各 5 例）に，イブルチニブを 0（溶媒），400，1000 及び 2000 mg/kg の用量で，単回強制経口投与した（絶食条件下）。一般状態の変化を投与後 14 日間観察し，体重は試験 0（投与前），2，7 及び 14 日に測定した。死亡例については剖検を実施し，生存例については投与後 14 日に剖検を実施せずに安楽死させた【2.6.7.5 参照】。

【結果】

すべての死亡例は投与後 7 日以内に認められた。1000 mg/kg 投与群では雌性 1 例が試験 1 日に，2000 mg/kg 投与群では雄性 1 例が試験 6 日，雌雄各 1 例が試験 7 日に死亡した。一般状態の変化は主として 2000 mg/kg 投与群でみられ，糞便異常，分泌物又は排泄物による体表の変色，削痩，冷感，眼脂（赤色），呼吸異常（ラッセル音），皮膚弛緩，脱毛及び耳の腫脹が認められた。1000 及び 2000 mg/kg 投与群の雌雄では試験期間を通して平均体重の低値が認められた。

死亡例の剖検において，1000 mg/kg 投与群の雌性では肉眼的所見は認められなかった。2000 mg/kg 投与群では雄性 1 例に胃及び腸の拡張，もう 1 例に皮膚の赤色調変化及び胃に暗赤色内容物が認められたが，雌性では肉眼的所見は認められなかった。

以上の結果から，ラットにイブルチニブを単回経口投与したときの最大非致死量は，雄性では 1000 mg/kg，雌性では 400 mg/kg であり，概略の致死量は，雄性では 2000 mg/kg，雌性では 1000 mg/kg であった。

2.6.6.2.3 ラット単回静脈内投与毒性試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.1.3】

【試験方法】

SD 雌性ラットに，イブルチニブを 0（溶媒），50（6 例），100（1 例）及び 150（2 例）mg/kg の用量で単回急速静脈内投与，並びに 100 mg/kg の用量で 30 分間（3 例）及び 60 分間（3 例）単回持続静脈内投与した。最長で投与後 7 日まで一般状態を観察した【2.6.7.5 参照】。

【結果】

100 及び 150 mg/kg の単回急速静脈内投与では投与後 10 分以内に全例が死亡した。50 mg/kg の単回急速静脈内投与及び 100 mg/kg の単回持続静脈内投与（30 及び 60 分間）では全例が生存した。これらの生存例では，自発運動の低下，運動失調又は粗毛が認められた。MTD は急速静脈内投与で 50 mg/kg，30 又は 60 分間の持続静脈内投与で 100 mg/kg であった。概略の致死量は急速静脈内投与で 100 mg/kg，30 又は 60 分間の持続静脈内投与で 100 mg/kg 超であった。

2.6.6.2.4 イヌ単回経口及び単回皮下投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.1.4】

【試験方法】

ビーグル犬にイブルチニブを以下のような漸増法により単回強制経口又は単回皮下投与した。雌雄各 1 例に対して，10 mg/kg の経口投与後に 10，20，40 mg/kg の順で皮下投与し，再度，100，200 mg/kg の順で経口投与を行った。また，別の雌雄各 1 例に 100，200 mg/kg の順で経口投与した。経口及び皮下投与後のウォッシュアウト期間は 3～14 日を設定した。

100 mg/kg では 2 つのコホートに分け（イヌ 1 例/性別/コホート），溶液又は懸濁液のイブルチニブを投与した。また，200 mg/kg においても 2 つのコホートに分け，ラウリル硫酸ナトリウムを含有又は非含有の懸濁液を用いて経口投与した。皮下投与及び 10 mg/kg の経口投与では溶液を投与した。

一般状態は毎日観察し，血液学的検査及び血液生化学的検査は各投与の直前及び 24 時間後に実施した。トキシコキネティクス測定（非 GLP 試験）は，投与前から投与約 24 時間後までに採取した血液を用いて実施した【2.6.7.6 参照】。

【結果】

全例とも観察期間終了まで生存した。

一般状態観察において，経口投与の結果，10 mg/kg 投与群では毒性徴候は認められなかったが，100 及び 200 mg/kg 投与群では投与 2 時間後に軽度な運動失調又は自発運動の低下が認められた。さらに，200 mg/kg 投与群では投与 1～8 時間後に眼球の不動（glassy）の外観が認められた。経口投与における最大非致死量は最高用量の 200 mg/kg，概略の致死量は 200 mg/kg 超であった。皮下投与の結果，10 及び 20 mg/kg 投与群では尻込み（flinching）又はそう痒行動が認められた。40 mg/kg 投与群では，投与中に身悶え（squirming）及び苦悶（thrashing）がみられ，投与直後に皮下注射部位への咬みつき及びそう痒行動が認められた。さらに，40 mg/kg 投与群では運動失調及び自発運動の低下が投与 4 時間後まで認められた。皮下投与における概略の致死量は 40 mg/kg 超であった。

血液学的検査において，10，20 及び 40 mg/kg 投与群では投与前値と比較し，皮下投与 24 時間後に総 WBC 数の増加が認められた。

単回投与によるトキシコキネティクスの結果を表 2.6.6-4 に示す。100 mg/kg の用量において，溶液を経口投与したときの C_{max} 及び AUC 値は，懸濁液を投与したときと比較して有意に高値を示した。

表 2.6.6-4 イヌ用量漸増による単回投与毒性試験におけるトキシコキネティクスの結果

Dose (mg/kg)	Dosing Route	Formulation	C_{max} (ng/mL)		AUC_{∞} (ng·h/mL)	
			Male	Female	Male	Female
10	PO	Solution[a]	577	352	864	797
10	SC	Solution[a]	664	1660	3810	5000
20	SC	Solution[a]	4400	2100	10900	10500
40	SC	Solution[a]	7760	8290	27300	33000
100	PO	Solution[a]	7620	8290	27400	40700
100	PO	Suspension[b]	788	1100	3630	5050
200	PO	Suspension[c]	82	160	664	670
200	PO	Suspension[b]	834	880	5620	2810

[a] 20% Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
[b] 1% Methylcellulose, 0.4% Cremophor EL® and 0.1% sodium lauryl sulfate
[c] 1% Methylcellulose and 0.4% Cremophor EL®
PO = per os, oral; SC = subcutaneous

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット探索的 2 週間反復経口投与毒性試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.2.1】

【試験方法】

SD ラット（1 群雌雄各 4 例）に，溶媒に懸濁した イブルチニブを 0（溶媒），10 及び 200 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，試験 6 日を除き計 13 日間強制経口投与した。試験 14 日に最終投与後，トキシコキネティクス評価のために血液サンプルを採取した。試験 15 日に全例を剖検し，病理組織学的検査（食道，胃，腸，肝臓，肺及び脾臓）を実施した【2.6.7.6 参照】。

【結果】

一般状態，死亡率及び体重：全例とも計画剖検まで生存した。200 mg/kg/日投与群の雌性では，軽度から中等度の粗毛がみられ，投与終了時の平均体重は対照群と比較して 7.4%減少した。

血液学的検査及び血液生化学的検査：血液学的検査では，10 及び 200 mg/kg/日投与群の雄性で WBC 及びリンパ球数の減少，雌性で赤血球（RBC），ヘモグロビン（Hb），ヘマトクリット（Ht）又はリンパ球比率の減少が認められた。血液生化学的検査では，10 及び 200 mg/kg/日投与群の雌雄で血清アルブミンの減少がみられ，200 mg/kg/日投与群の雌雄で総たん白の減少及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加，雌性でアルカリホスファターゼ（ALP），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びグロブリンの減少が認められた。

剖検及び病理組織学的検査：剖検では 200 mg/kg/日投与群において，肝臓の蒼白化又は腫大が雌性で 4 例中 4 例，腸管拡張が雄性 4 例中 1 例及び雌性 4 例中 4 例に認められた。病理組織学的検査では本薬投与に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクスの結果を表 2.6.6-5 に示す。雌性の曝露量は雄性と比較して顕著に高く，この性差はラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験においても認められた【表 2.6.6-9 参照】。

表 2.6.6-5 ラット 2 週間反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスの結果

Dose (mg/kg/day)	Study Day[a]	C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
		Male	Female	Male	Female
10	14	82	266	165	534
200	14	990	7450	9900	44800

[a] First day of dosing was considered study day 1

2.6.6.3.2 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.2】

【試験方法】

SD ラット（1 群雌雄各 10 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），12，36 及び 120 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，14 日間反復強制経口投与した。試験 14 日に血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。全例を剖検し，病理組織学的検査は，対照群及び 120 mg/kg/日投与群について，試験計画書に定めた全器官について実施した。なお，特定した標的器官及び剖検時に観察された肉眼的病変は，全例について病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスは実施しなかった【2.6.7.6 参照】。

【結果】

一般状態，死亡率，体重及び摂餌量：計画剖検まで全例が生存し，一般状態観察，体重及び摂餌量に本薬投与に関連した影響は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査：血液学的検査では，120 mg/kg/日投与群の雄性又は雌性で Ht 及び平均赤血球容積（MCV）の減少，hemoglobin distribution width（HDW）及び好中球数の増加，並びに 36 mg/kg/日投与群の雄性で Ht の減少が認められた。これらの変化は，生物学的変動及び試験実施施設における背景データの範囲内の変化であり，また肉眼的所見又は病理組織学的所見に関連した変化はみられなかったことから，血液学的検査値の変動は有害作用ではないものと考えられた。血液生化学的検査では，全投薬群の雌雄でカリウム（K）の減少，36 mg/kg/

日投与群の雌性で総たん白の減少，120 mg/kg/日投与群の雌雄で ALT の増加，120 mg/kg/日投与群の雌性でアルブミン，カルシウム（Ca），総たん白及び ALP の減少が認められた。いずれの変動も軽度であり，一般状態又は病理組織学的所見に関連した変化はみられなかったことから，血液生化学的検査値の変動は有害作用ではないものと考えられた。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では，36 mg/kg/日投与群の雄性で精巣重量（脳重量比）の減少，120 mg/kg/日投与群の雄性で脾臓及び精巣重量（絶対値及び脳重量比）の減少， 並びに 120 mg/kg/日投与群の雌性で甲状腺（副甲状腺を含む）重量（絶対値，脳重量比及び最終体重比）の増加が認められた。120 mg/kg/日投与群の雄性でみられた脾臓重量の減少は，病理組織学的に軽微なリンパ球枯渇と一致する変化であった。本薬投与に関連した肉眼的変化は認められなかった。病理組織学的検査では，36 及び 120 mg/kg/日投与群の雄性でみられた精巣重量の減少に関連した変化は認められなかった。全投薬群の雄性で脾臓に軽微なリンパ球枯渇及び膵臓に軽微から軽度又は中等度の腺房（多巣性）萎縮，36 mg/kg/日投与群の雌性で膵臓に軽微から中等度の腺房萎縮，並びに 12 及び 120 mg/kg/日投与群の雌性各 1 例では盲腸に軽微な急性炎症が認められた。膵臓の病理組織学的所見は血清アミラーゼ及びリパーゼの変化を伴っていなかった。12 mg/kg/日投与群の雄性でみられた膵臓の腺房萎縮は，その変化の程度が軽微から軽度であり，一般状態，体重，血液学的検査及び血液生化学的検査に影響が認められなかったことから，有害作用ではないと考えられた。また，脾臓のリンパ球枯渇及び盲腸の急性炎症についても，その変化の程度は軽度であったことから，いずれも有害作用でないと考えられた。

NOAEL：36 及び 120 mg/kg/日投与群において，膵臓に中等度の腺房萎縮がみられたことから，イブルチニブの NOAEL は 12 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.3.3 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.3】

【試験方法】

SD ラット（1 群雌雄各 10 又は 15 例）に， 溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），2.5，40，150（雌性）及び 300（雄性）mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 29 日間強制経口投与した。対照群及び高用量群の 1 群雌雄各 5 例については，投与終了後 28 日間休薬し，回復性を検討した。別途サテライト群（1 群雌雄各 7 例）を設定し，試験 0 及び 25 日にトキシコキネティクスを評価した。眼科学的検査は試験開始前 1 週及び試験 3 週に実施した。血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査は投与終了時（試験 4 週）及び回復期間終了時（試験 8 週）に実施した。病理組織学的検査は，投与期間中に死亡した 300 mg/kg/日投与群の雄性 1 例，並びに投与終了時に剖検した対照群及び 300/150 mg/kg/日投与群の全例について実施した。なお，投与終了時に剖検した 2.5 及び 40 mg/kg/日投与群，並びに休薬期間終了後の全例については，特定した標的器官のみ病理組織学的検査を実施した【2.6.7.7A 参照】。

【結果】

一般状態及び死亡率：300 mg/kg/日投与群の雄性 15 例中 1 例では，試験 12 日以降に一般状態が悪化し，試験 16 日に死亡が認められた。この早期死亡は本薬投与に関連するものと考えられ

たが，正確な死因は特定されなかった。2.5，40 及び 150（雌性） mg/kg/日投与群では途中死亡例は認められなかった。

一般状態観察では，300/150 mg/kg/日投与群の生存例において，雌雄ともに，主として，鼻周囲に乾燥した赤色物質，口周囲に湿潤した透明物質，軟便，泌尿器又は肛門周囲に湿潤又は乾燥した黄色又は褐色物質が認められた。2.5 及び 40 mg/kg/日投与群，並びに休薬期間中では明らかな一般状態の変化は認められなかった。

体重及び摂餌量：高用量群の雄性では，投与期間を通して，摂餌量及び体重増加量の減少が認められ，その結果として，試験 4 週時の平均体重は対照群と比較して 16.5%低下した。休薬により，高用量群の雄性の体重増加量及び摂餌量は対照群と同等の値に回復した。

眼科学的検査：本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査：血液学的検査では，投与終了時に本薬投与に関連した変化として，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄で赤血球パラメータへの影響［Hb，Ht，MCV 及び平均赤血球血色素量（MCH）の減少，並びに網状赤血球数の増加］及び白血球パラメータへの影響（リンパ球数の減少，並びに好中球及び単球数の増加）が認められた。血液生化学的検査では，投与終了時に本薬投与に関連した変化として，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄でアルブミン，総たん白及びグロブリン（雄性のみ）の減少，300 mg/kg/日投与群の雄性及び 40 又は 150 mg/kg/日投与群の雌性で ALT の軽度な増加，並びに 300 mg/kg/日投与群の雄性で AST の軽度な増加が認められた。これらの変化は 4 週間の休薬後に部分的又は完全に回復した。

凝固系検査及び尿検査では，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では，300 mg/kg/日投与群の雄性で胸腺重量（絶対値，脳重量比及び最終体重比）の減少が認められ，雌雄で肝臓重量（最終体重比）の増加が認められた。4 週間の休薬後も雌性の肝臓重量（最終体重比）の増加はみられたが，雄性の胸腺重量の変化は完全に回復した。

剖検では，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄で下顎リンパ節の腫大がみられ，4 週間の休薬後も 300/150 mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例に認められた。

病理組織学的検査では，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄に下顎リンパ節に軽度から中等度のリンパ球過形成，脾臓にリンパ球枯渇及び胸腺に単細胞壊死（アポトーシス）の増加が認められた。下顎リンパ節のリンパ球過形成は，40 mg/kg/日投与群の雄性 1 例にも認められた。さらに，300/150 mg/kg/日投与群では，前胃（扁平上皮過形成，粘膜下浮腫及び炎症，並びに粘膜潰瘍），皮膚（表皮の壊死，表皮表層の滲出液，真皮膿瘍，並びに急性及び亜急性炎症）及び肝臓［軽微な肝細胞壊死（限局性から多巣性）］に変化が認められた。40 mg/kg/日投与群の雌性 1 例では，中間葉のみに中等度の肝細胞壊死（汎小葉性壊死）がみられた。この動物では中間葉の捻転がみられていることから，この限局性変化は，中間葉の捻転に起因した虚血によって生じた二次的な変化であると考えられた。4 週間の休薬後も 300 mg/kg/日投与群の雄性 1 例に軽微な肝細胞壊死がみられたが，リンパ節，脾臓，胸腺，皮膚及び胃では病理組織学的変化はみられず，完全に回復した。

トキシコキネティクス：定常状態におけるイブルチニブの最高血漿中濃度到達時間（t_{max}），C_{max} 及び 0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）を表 2.6.6-9

に示す。雌雄ともに，イブルチニブへの曝露量は概して試験 0 日と比べて試験 25 日のほうがわずかに高値であった。

NOAEL：試験報告書を最終化する時点では，40 mg/kg/日投与群の雌性 1 例に単一肝葉で中等度の肝細胞壊死がみられたことから，NOAEL を 2.5 mg/kg/日と判断した。しかしながら，その後の試験結果に基づき，単一肝葉壊死は偶発的な変化であると考えられたことから，ラット 4 週間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 40 mg/kg/日であると判断された【2.6.6.9.3.9 参照】。

2.6.6.3.4 ラット 13 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.4】

【試験方法】

SD ラット（1 群雌雄各 15 又は 20 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブ（ロット [redacted]，不純物A* を 2.09%含有）を 1 日 1 回，0（溶媒），30，100 及び 300 mg/kg/日の用量で強制経口投与を開始した。300 mg/kg/日投与群の雌性では体重減少がみられたことから，試験 8 日に投与量を 175 mg/kg/日に減量し，投与期間終了まで投与した。投与期間は 91 又は 92 日間とし，対照群，100，175（雌性）及び 300（雄性）mg/kg/日投与群の雌雄各 5 例については，投与終了後に 42 日間休薬し，回復性を検討した。別途サテライト群（1 群雌雄各 10 例）を設定し，トキシコキネティクス［試験 0 及び 78 日，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）］及びイムノフェノタイピング（試験 79 及び 81 日）を評価した。眼科学的検査は試験開始前 1 週及び試験 12 週に実施し，血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査は投与終了時（試験 13 週）及び回復期間終了時（試験 19 週）に実施した。病理組織学的検査は，死亡例又は切迫屠殺例，並びに投与終了時に剖検した対照群及び高用量群については，試験計画書に定めた全器官について実施した。投与終了時に剖検した 30 及び 100 mg/kg/日投与群，並びに休薬期間終了後の全例については，特定した標的器官のみ病理組織学的検査を実施した【2.6.7.7B 参照】。

【結果】

一般状態及び死亡率：300 mg/kg/日投与群の雄性では，毒性評価群の 20 例中 7 例及びトキシコキネティクス評価群の 10 例中 1 例で死亡が認められたか，又は切迫屠殺された（試験 41～79 日）。175 mg/kg/日投与群では毒性評価群の雌性 1 例で死亡が認められた（試験 90 日）。これらの早期死亡例では，重度のリンパ球枯渇が認められた。早期死亡例のうち，雄性 2 例では腸管の急性炎症及び潰瘍が認められ，これらが死因であると推察された。

一般状態観察では，300/175 mg/kg/日投与群の生存例において，雌雄ともに，削痩，一部閉眼，口，鼻又は前肢周囲に透明又は赤色物質，顔面発赤，体表に脱毛又は痂皮形成，軟便，泌尿器又は肛門周囲に黄色又は褐色物質が認められた。175 mg/kg/日投与群では一部の雌性で試験 91 日に粗毛及び皮膚弛緩が認められた。100 mg/kg/日投与群の雌性では，顔面発赤，軟便，泌尿器又は肛門周囲に黄色又は褐色物質，前肢に赤色物質が認められた。30 及び 100 mg/kg/日投与群の雌性では顔面に痂皮形成及び鼻周囲に赤色物質が認められた。休薬期間中においては本薬投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。

*新薬承認情報提供時に置き換え

体重及び摂餌量：試験期間を通じ，300 mg/kg/日投与群の雄性では体重，体重増加量及び摂餌量の減少が認められ，その結果として，投与終了時の平均体重は対照群と比較して 8.5%低下した。投与量を 175 mg/kg/日に減量する前に 300 mg/kg/日を投与した高用量群の雌性では試験 0～7 日に体重及び摂餌量の減少が認められ，投与終了時の平均体重は対照群と比較して 9.1%低下した。休薬により，300/175 mg/kg/日投与群の雌雄の体重増加量及び摂餌量は対照群と同等の値に回復した。

眼科学的検査：本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査：血液学的検査では，投与終了時に白血球パラメータの変化として，100 及び 300 mg/kg/日投与群の雄性で好中球数及び単球数の増加，100 mg/kg/日投与群の雌性でリンパ球数の減少，175 mg/kg/日投与群の雌性で WBC 数，好中球数，単球数及び大型非染色球数の増加，並びにリンパ球数の減少が認められた。赤血球パラメータの変化として，300 mg/kg/日投与群の雄性で網状赤血球数の増加，175 mg/kg/日投与群の雌性で網状赤血球数，赤血球分布幅（RDW）及び HDW の増加，並びに MCV，MCH 及び平均赤血球血色素濃度（MCHC）の減少が認められた。網状赤血球数及び RDW の増加は，100 mg/kg/日投与群の雌性でも認められた。

血液生化学的検査では，100 及び 300 mg/kg/日投与群の雄性でアルブミン及び総たん白の減少並びに ALT の増加，300 mg/kg/日投与群の雄性でグロブリン及びトリグリセリドの減少並びに尿素窒素の増加が認められた。100 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性でアルブミン，総たん白，グロブリン，総ビリルビン及びグルコースの減少，175 mg/kg/日投与群の雌性で尿素窒素及びリンの増加，並びに Ca の減少が認められた。これらの変化は 6 週間の休薬後に部分的又は完全に回復した。

凝固系検査及び尿検査では，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では，100 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性で子宮重量の減少が認められたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。休薬後では子宮重量の変化は認められなかった。

剖検では，175 mg/kg/日投与群の雌性 1 例に胸腺の小型化が認められたが，休薬後には認められなかった。

病理組織学的変化が，175 mg/kg/日投与群の雌性でリンパ節，脾臓及び胸腺（中等度又は重度のリンパ球枯渇），前胃（潰瘍，浮腫及び扁平上皮過形成の進行に伴う扁平上皮の萎縮）及び腸（急性炎症及び付随する潰瘍）で認められた。100 mg/kg/日投与群の雌性及び 300/175 mg/kg/日投与群の雌雄では軽微から軽度の骨皮質及び骨梁の減少，100 及び 300 mg/kg/日投与群の雄性では中等度の膵臓の腺房萎縮が認められた。腺房萎縮は 30 mg/kg/日投与群の雄性，全投薬群の雌性でもみられたが，重症度が軽微から軽度であることから，有害作用ではないと判断された。さらに，30，100 又は 300/175 mg/kg/日投与群の雌雄では，脳下垂体（軽微から軽度の細胞質空胞化），副腎皮質（軽微な壊死），食道，前胃，皮膚及び腟（軽微から軽度の扁平上皮萎縮），脾臓及びリンパ節（軽微から軽度のリンパ球枯渇），並びに腸（軽微な炎症又は陰窩拡張）においても病理組織学的変化が認められたが，これらの変化も重症度が軽微から軽度であることから，有害作用ではないと判断された。休薬後，100 及び 300/175 mg/kg/日投与群の雌雄で軽微から軽度の膵臓の腺房萎縮，100 及び 300 mg/kg/日投与群の雄性で脳下垂体の細胞質空胞化がみられた

が，投与終了時と比較して，これらの所見の重症度及び発現率が低下したことから，回復性が示唆された。その他の病理組織学的所見は完全に回復した。

イムノフェノタイピングの評価：所見の概要については 2.6.6.8.1 項に示す。

トキシコキネティクス：定常状態におけるイブルチニブ及び PCI-45227（M37）の t_{max}，C_{max} 及び AUC_{last} をそれぞれ，表 2.6.6-9 及び表 2.6.6-10 に示す。試験 78 日における C_{max} 及び AUC_{last} は，30～100 mg/kg/日までは投与量に比例した曝露量の増加はみられなかったが，雄性では 100～300 mg/kg/日及び雌性では 100～175 mg/kg/日の範囲で投与量にほぼ比例した曝露量の増加が認められた。性別及び投与量にかかわらず，試験 78 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は試験 0 日と比較し，雄性で 1.6～2.1 倍，雌性で 1.4～4.5 倍高値を示した。経口投与におけるイブルチニブの t_{max} は，投与後 0.5～8.0 時間であった。

NOAEL：300 mg/kg/日投与群では早期死亡及び体重減少がみられており，忍容性は認められなかった。病理組織学的検査では，300 mg/kg/日投与群の雄性で骨及び膵臓に，175 mg/kg/日投与群の雌性で骨，リンパ節（腋窩及び腸間膜），腸，前胃，脾臓及び胸腺に変化が認められた。さらに，100 mg/kg/日投与群の雄性で膵臓に，100 mg/kg/日投与群の雌性で骨に病理組織学的変化が認められた。100 mg/kg/日投与群の雌性及び 300/175 mg/kg/日投与群の雌雄でみられた骨への影響は，軽微から軽度であり機能的な影響は伴っていないが，試験報告書中では有害作用であると保守的に評価され，無毒性量の設定根拠の一因とされた。しかしながら，対照群と比較して体重の低値もみられていることから，骨への影響は全身毒性に起因した二次的な変化であると考えられる。

以上のことから，ラットに経口投与したときのイブルチニブの NOAEL は，雌雄ともに 30 mg/kg/日であると判断した。試験 78 日における NOAEL のイブルチニブの AUC_{last} は，雄性で 2480 ng·h/mL，雌性で 19712 ng·h/mL であり，C_{max} は雄性で 618 ng/mL，雌性で 1413 ng/mL であった。

2.6.6.3.5 ウサギ反復経口投与忍容性試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.2.5】

【試験方法】

非妊娠 NZW 雌性ウサギ（1 群各 3 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 50 及び 200 mg/kg/日の用量で 7 日間，100 mg/kg/日の用量で 14 日間，1 日 1 回強制経口投与し，一般状態観察，体重及び摂餌量の測定を毎日実施した【2.6.7.6 参照】。

【結果】

全例が計画剖検時まで生存した。一般状態観察では，全投与群で排便減少，軟便，下痢又は糞便少量，並びに摂餌量の減少が認められた。体重減少がみられたが，用量依存性は認められなかった。剖検ではいずれの投与群ともに肉眼的変化は認められなかった。

2.6.6.3.6 溶液投与によるイヌ 2 週間反復経口投与探索試験

【評価資料 4.2.3.2.6】

【試験方法】

本試験は，ビーグル犬を用いて投与量漸増法による単回強制経口投与又は皮下投与を実施し【2.6.6.2.4 参照】，26 日間のウォッシュアウト後に，14 日間の反復投与毒性試験を実施した。イブルチニブは，28%（w/v）の hydroxypropyl-β-cyclodextrin（HP-β-CD）を含有する水溶液に溶解した。イヌ（雌雄各 2 例）にイブルチニブを 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，8 日間強制経口投与し，続いて 60 mg/kg/日の用量で 6 日間経口投与した。投与終了後，17 日間の回復期間を設定した。血液学的検査及び血液生化学的検査は投与開始前，投与終了時及び回復期間終了時，トキシコキネティクス評価は投与期間終了時に実施した【2.6.7.6 参照】。

【結果】

運動失調，自発運動抑制，糞便異常，摂餌量減少及び眼球の不動（glassy）の外観が認められたため，投与後 8 日に投与量を 100 mg/kg/日から 60 mg/kg/日に減量した。100 mg/kg/日の用量の溶液投与では忍容性が認められなかったため，本試験以降のイヌを用いた反復投与毒性試験では，臨床のカプセル製剤により近い処方として懸濁液を用いて実施した。

投与終了時に，雌雄ともに好中球数（絶対数），WBC 数及び ALT の増加が認められた。60 mg/kg/日の定常状態におけるイブルチニブの C_{max} は雄性で 4020 ng/mL 及び雌性で 4230 ng/mL，0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{24}）は雄性で 17200 ng·h/mL 及び雌性で 19400 ng·h/mL であった。溶液投与による 60 mg/kg/日の C_{max} は，懸濁液を用いて実施したイヌ 4 週間投与毒性試験における 150 mg/kg/日の C_{max} よりも著しく高値であった【表 2.6.6-9 参照】。

2.6.6.3.7 懸濁液投与によるイヌ 2 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.7】

【試験方法】

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），4，12 及び 40 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回，14 日間強制経口投与した。血液学的検査及び血液生化学的検査を試験前及び試験 14 日に，眼科学的検査を試験前及び試験 12 又は 13 日に実施した。全例について剖検，器官重量の測定及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクスの評価は実施しなかった【2.6.7.6 参照】。

【結果】

一般状態，死亡率，体重及び摂餌量：全例が計画剖検時まで生存した。体重又は摂餌量に影響は認められなかった。一般状態観察では，12 mg/kg/日投与群の雄性及び 40 mg/kg/日投与群の雌雄で軟便が認められたのみであった。

眼科学的検査：本薬投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査：本薬投与に関連した変化は認められなかった。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では，4，12（雄性のみ）及び 40 mg/kg/日投与群で肝臓重量の増加が認められた。剖検では本薬投与に関連した変化は認められなかった。肝

臓重量の増加に関連する変化として，病理組織学的検査では，4 及び 12 mg/kg/日投与群の雄性並びに 40 mg/kg/日投与群の雌雄で軽微な肝細胞のグリコーゲンの増加が認められたが，有害作用は認められなかった。

NOAEL：有害な病理組織学的変化はみられず，明らかな毒性が認められなかったことから，本試験における NOAEL は 40 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.3.8 イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.8】

【試験方法】

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 例又は 5 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），1.5，24 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 29 日間，強制経口投与した。投与終了時に 1 群雌雄各 3 例を剖検し，対照群及び 150 mg/kg/日投与群の 1 群雌雄各 2 例は，投与終了後に 29 日間休薬し，回復性を検討した。

トキシコキネティクス評価は試験 0 及び 24 日に実施した。眼科学的検査は試験前並びに試験 23，27 及び 51 日（休薬期間）に実施した。心電図（ECG）は試験前並びに試験 2 及び 22 日に実施した。血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査又は尿検査は，試験前並びに試験 14，25 及び 57 日（休薬期間）に実施した。全例を剖検に供し，器官重量の測定及び病理組織学的検査を実施した。対照群及び 150 mg/kg/日投与群については，休薬期間終了後，特定した標的器官の病理組織学的検査を実施した【2.6.7.7C 参照】。

【結果】

一般状態及び死亡率：全例が計画剖検時まで生存した。一般状態観察では，150 mg/kg/日投与群では投与期間中に糞便異常（軟便，下痢及び便退色）が認められたが，これらの所見は休薬初期に消失した。

体重及び摂餌量：投与 1 週に，150 mg/kg/日投与群の雄性 1 例及び雌性 2 例で体重減少が認められ，同時期に，150 mg/kg/日投与群の雌性で軽度な摂餌量の減少が認められた。休薬後，150 mg/kg/日投与群の雌雄の体重増加量は対照群と同等又はそれ以上の値にまで回復した。

眼科学的検査及び ECG：眼科学的検査では，試験 23 又は 27 日に，150 mg/kg/日投与群の雄性 2 例（片側性）及び雌性 1 例（両側性）で軽度な角膜ジストロフィー/混濁が認められた。これら 3 例については回復群に供したが，試験 51 日（休薬後 23 日）においても軽度から中等度の角膜ジストロフィー/混濁（片側性）が認められた。病変は前部角膜実質の上皮下に認められた。この変化はビーグル犬に偶発的に生じる変化であると考えられたが，この時点ではイブルチニブとの因果関係を否定することはできなかった。ECG では，本薬投与に関連した影響は認められなかった。

血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査：血液学的検査では，150 mg/kg/日投与群の雌性で試験 14 及び 25 日に WBC 数，好中球数及び単球数の軽度な増加が認められた。150 mg/kg/日投与群の雌雄で試験 25 日にリンパ球数の軽度な減少が認められた。24 又は 150 mg/kg/日投与群の雌性で試験 14 及び 25 日に好酸球数の減少が認められた。150 mg/kg/日投与群

の雌雄で試験 14 又は 25 日に好塩基球数の減少が認められた。また，腸管に炎症を有する動物では，WBC，好中球，単球又は好酸球数の顕著な増加が認められた。

血液生化学的検査では，150 mg/kg/日投与群で試験 14 及び 25 日に本薬投与に関連する血清アルブミン，総たん白及びアルブミン/グロブリン（A/G）比の減少が認められた。その他の血液生化学的パラメータにおいても変動がみられたが，変化の程度が軽度であったことから，毒性学的に意義のある変化ではないと判断した。凝固系検査及び尿検査に本薬投与に関連した影響は認められなかった。4 週間の休薬後，A/G 比の減少を除き，血液学的及び血液生化学的パラメータは部分的又は完全に回復した。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では本薬投与に関連した影響は認められなかった。剖検では肉眼的所見はみられなかった。病理組織学的検査では 150 mg/kg/日投与群の雄性 2 例及び雌性 1 例で腸に炎症性変化が認められた。この雌性では腸炎に加え，回腸に軽微な絨毛萎縮が認められた。150 mg/kg/日投与群の雌性 2 例及び 24 mg/kg/日投与群の雌性 1 例で，腎臓に軽微な梗塞が認められた。この病変は，尿細管拡張，好塩基球増加及び間質性炎症からなるが，これらの所見は若年のビーグル犬において一般的に認められる変化である。休薬後，150 mg/kg/日投与群の雄性 2 例中 1 例では回腸に軽微な急性炎症が認められた。眼科学的検査でみられた角膜ジストロフィーに関連した病理組織学的変化は認められなかった。

トキシコキネティクス：定常状態におけるイブルチニブの t_{max}，C_{max} 及び AUC_{last} を表 2.6.6-9 に示す。試験 24 日のイブルチニブの曝露量は，1.5 及び 150 mg/kg/日投与群では試験 0 日と比較して高値であったが，24 mg/kg/日投与群では，試験 0 日と同程度であった。

NOAEL：試験報告書完成時では，24 mg/kg/日投与群の雌性 1 例で認められた腎臓の病理組織学的所見を考慮して，本試験におけるイブルチニブの NOAEL は 1.5 mg/kg/日と判断された。しかしながら，24 mg/kg/日以上の用量で，その後に実施した 13 週間反復投与毒性試験では本病変は再現されなかったことから，腎臓でみられた病理組織学的所見は偶発的な変化であったと考えられた。したがって，4 週間反復経口投与毒性試験における NOAEL は 24 mg/kg/日であると判断された【2.6.6.9.3.9 参照】。

2.6.6.3.9 イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.9】

【試験方法】

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 例又は 6 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），30，80 及び 220 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回，強制経口投与を開始した。80 及び 220 mg/kg/日投与群の雄性各 1 例に有意な体重減少及び健康状態の悪化がみられ，切迫屠殺したことから，試験 42 日に雌雄とも 80 及び 220 mg/kg/日の用量をそれぞれ 60 及び 120 mg/kg/日に減量し，投与終了時（試験 91 又は 92 日）まで経口投与した。さらに，80/60 mg/kg/日投与群の雄性 1 例及び 220/120 mg/kg/日投与群の雄性 3 例及び雌性 1 例については試験期間中に 1～12 日間休薬させた。投与終了時に 1 群雌雄各 3 例を剖検し，対照群，80/60 mg/kg/日投与群及び 220/120 mg/kg/日投与群の残りの動物（1 群雌雄各 3 例以下）は，91 日間の休薬終了後に剖検した。

トキシコキネティクス評価は，試験 0，37（用量減量の前）及び 78 日に実施した。眼科学的検査は試験開始 1 週前，試験 2，5（用量減量の前），12，17 及び 25 週に実施した。ECG は，試験

開始 2 週前，試験 0，12 及び 25 週に実施した。血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査を，試験開始 1 週前，試験 5，12，17 及び 26 週に実施した。全例を剖検に供し，器官重量の測定及び病理組織学的検査を実施した。対照群，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群については，休薬期間終了後，特定した標的器官の病理組織学的検査を実施した【2.6.7.7D 参照】。

【結果】

一般状態及び死亡率：一般状態観察で自発運動の低下，削痩，皮膚弛緩，虚脱，体温低下，赤色鼻汁，鼻又は口周囲に赤色物質及び下痢等がみられたことから，試験 31 日に，80 及び 220 mg/kg/日投与群の雄性各 1 例を切迫屠殺した。220 mg/kg/日投与群の雄性における一般状態悪化の原因は，本薬投与に関連した重篤な腸炎（小腸結腸炎）であると判断された。80 mg/kg/日投与群の雄性では，剖検及び病理組織学的検査で誤嚥性肺炎又は自然発生的な肺炎と一致する肺病変（非虚脱性及び赤色肺，急性炎症及び細菌を伴う）が認められたことから，一般状態の悪化は本薬投与に関連した変化ではないと判断された。生存例では投与期間を通して，主として 80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雌雄で，糞便異常（軟便及び下痢等），嘔吐，歯茎の赤色又は退色，並びに歯茎に隆起した赤色又は白色部分等が認められたが，ほとんどの変化は，回復期間の初期に消失した。投与期間中に持続性の振戦，間代性痙攣及び硬直性の筋緊張などの行動及び中枢神経系の変化が低頻度ではあるものの，主として 220/120 mg/kg/日投与群の雄性で認められたが，これらの所見のほとんどは 2 例にみられたものであり，概して回復期間中には認められなかった。

体重及び摂餌量：220/120 mg/kg/日投与群では半数以上の動物で体重減少（用量減量の前）がみられ，残りのほとんどの動物で体重増加量の減少が認められた。80/60 mg/kg/日投与群においても体重増加量の減少が認められた。投与期間を通して，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群では対照群と比較して摂餌量の減少が認められた。投与終了時の平均体重は，対照群と比較して，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雄性ではそれぞれ 4.5%及び 9.8%，雌性では 1.1%及び 6.5%減少した。30 mg/kg/日投与群においても投与期間を通して摂餌量のわずかな減少（有害でない）が認められたが，体重には影響は認められなかった。休薬期間中，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の体重増加量及び摂餌量は，対照群と同等又はそれ以上の値に回復した。

眼科学的検査及び ECG：眼科学的検査では，毒性を示唆する変化は認められなかった。220/120 mg/kg/日投与群の雄性 1 例では，投与最終週，休薬 5 及び 13 週に，角膜ジストロフィー/変性がみられたが，これはビーグル犬で自然発生的にみられる角膜の変化であると考えられた。ECG では，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雄性で RR 間隔及び QT 間隔の延長が認められたが，いずれの用量においても PR，QRS 又は QTc 間隔に本薬投与に関連した影響は認められなかった。80/60 mg/kg/日投与群の雄性で試験 0 及び試験 12 週，220/120 mg/kg/日投与群の雄性で試験 12 週に心拍数の減少が認められたが，休薬期間中に対照群と比較して変化は認められなかった。投与期間中にみられたこれらの変化の程度は軽度であり，正常範囲内の変化であったことから，毒性学的意義のない変化と考えられた。

血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査：血液学的検査では，試験 5 及び 12 週に，220/120 mg/kg/日投与群で赤血球パラメータの軽度な変化（RBC 数，Hb，Ht 又は MCHC の減少，並びに RDW 及び HDW の増加）が認められた。

血液生化学的検査では，試験 5 又は 12 週に，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雄性又は雌性でアルブミン及び A/G 比の減少並びにグロブリンの軽度な増加が認められた。220/120 mg/kg/日投与群ではグルコースの減少が認められた。血液学的検査，凝固系検査及び血液生化学的検査では，上記以外のパラメータにも変化が認められたが，いずれもその変化の程度は軽度であることから，毒性学的意義のない変化と考えられた。血液学的検査，凝固系検査及び血液生化学的検査における変化は，おおむね，休薬開始後 4 週間以内に回復した。

尿検査パラメータについて，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では，本薬投与に関連した変化は認められなかった。剖検では，220/120 mg/kg/日投与群の雌性 1 例で盲腸及び回腸に赤色化域が認められたが，これは病理組織学的検査でみられた急性炎症の領域と一致していた。病理組織学的検査では，220/120 mg/kg/日投与群の雌性 1 例で腸（軽微な急性炎症），80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雌雄でパイエル板（軽微から軽度のリンパ球枯渇），並びに 220/120 mg/kg/日投与群の雌性で胃［軽微から軽度の平滑筋変性（限局性から多巣性）］に変化が認められた。さらに，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群の雌性で十二指腸の腺の拡張が認められた。本薬投与に関連したすべての変化は，13 週間の休薬により消失した。

トキシコキネティクス：定常状態におけるイブルチニブの t_{max}，C_{max} 及び AUC_{last} を表 2.6.6-9 に，PCI-45227（M37）を表 2.6.6-10 に示す。試験 0 日に対する試験 37 日のイブルチニブ曝露量は雄性では 1.1～16 倍，雌性では 2.2～9.5 倍であった。t_{max} は，イブルチニブでは投与後 0.8～4.0 時間，PCI-45227（M37）では投与後 1.0～8.7 時間の範囲であり，投与量，性別又は測定ポイントによる明らかな違いは認められなかった。

NOAEL：80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群ではパイエル板でリンパ球枯渇，220/120 mg/kg/日投与群では急性腸炎及び胃の平滑筋変性が認められたことから，本試験の NOAEL は雌雄ともに 30 mg/kg/日と判断された。NOAEL の試験 78 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は，雄性で 377 ng·h/mL 及び雌性で 1683 ng·h/mL であり，イブルチニブの C_{max} は雄性で 151 ng/mL 及び雌性で 451 ng/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.3.1.1】

【試験方法】

イブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）］をジメチルスルホキシド（DMSO）で溶解し，ネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvr*A を用いて復帰突然変異誘発性を評価した。試験は，代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下でプレート法により実施した【2.6.7.8A 参照】。

【結果】

試験 1 では，1.5～5000 µg/plate で処理した結果，突然変異誘発性は認められなかった。析出物は 1500 µg/plate 以上の濃度で認められた。復帰突然変異コロニー数の減少が S9 mix の非存在下における 5000 µg/plate の濃度で TA1537 に認められた。

試験 2 では，50～5000 μg/plate で処理した結果，突然変異誘発性は認められなかった。析出物は 500 又は 1500 μg/plate 以上の濃度で認められ，500 μg/plate 以上の濃度で復帰突然変異コロニー数の減少が認められた。S9 mix の存在下の TA1537 では，毒性がみられない濃度は 2 濃度のみであったため，5.0～5000 μg/plate の濃度で再試験した。再試験においても突然変異誘発性は認められなかった。

結論：S9 mix の存在下及び非存在下にかかわらず，復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかったことから，イブルチニブに復帰突然変異誘発性は認められないと判断した。

2.6.6.4.2 チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株（CHO）を用いる染色体異常試験

CHO を用いて，イブルチニブの染色体異常誘発性を評価した。染色体異常試験は 2 回実施し，1 回目の試験は非臨床グレード［医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）非準拠］のイブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）］を用いて S9 mix の存在下及び非存在下で，また，臨床グレード（GMP 準拠）のイブルチニブ（ロット番号:[redacted]）を用いて S9 mix の存在下で実施した。2 回目の試験は臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]）を用いて S9 mix の非存在下のみで実施した。

非臨床グレードのイブルチニブの純度は 97.3%，臨床グレードのイブルチニブの純度は 99.7%であった。イブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）及び[redacted]］の不純物プロファイルを被験物質の一覧表に示す【2.6.7.4 参照】。

2.6.6.4.2.1 CHO を用いる染色体異常試験（1 回目）

【評価資料 4.2.3.3.1.2】

【試験方法】

CHO を用いて，非臨床グレードのイブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）］及び臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]）の染色体異常誘発性を評価した。非臨床グレードのイブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）］については，処理時間を S9 mix 非存在下で 4 及び 20 時間，並びに S9 mix 存在下で 4 時間とした。臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]）については，処理時間を S9 mix 存在下で 4 時間とした。用量設定試験における最大濃度は 4405 μg/mL（10 mmol/L）とし，溶媒対照（DMSO）に対する細胞増殖抑制に基づいて処理濃度を選択した。染色体異常の観察は 5.0～40 μg/mL の範囲で行った。なお，陽性対照としてマイトマイシン C 又はシクロホスファミドを用いて処理し，20 時間後に細胞を採取した【2.6.7.8B 参照】。

【結果】

(1) ロット番号:[redacted]（微粉化），非 GMP

1) S9 mix 非存在下，4 及び 20 時間処理

溶媒対照に対する細胞増殖抑制は，4 時間処理群の 37.5 μg/mL で 52%及び 20 時間処理群の 12.5 μg/mL で 51%であった。したがって，染色体異常観察の最高濃度として，4 時間処理群では 37.5 μg/mL，20 時間処理群では 12.5 μg/mL を選択した。

S9 mix 非存在下での 4 時間処理群では，32.5 及び 37.5 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して構造異常を有する細胞の出現頻度が有意に増加した（p≤0.01）。25 μg/mL では構造異常を有する細胞の出現頻度に増加は認められなかった。なお，いずれの濃度においても数的異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

S9 mix 非存在下での 20 時間処理群では，10 及び 12.5 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して構造異常を有する細胞の出現頻度が有意に増加したが（p≤0.01），10 μg/mL における出現頻度は，溶媒対照の背景データの範囲内の変化であった。5 μg/mL では構造異常を有する細胞の出現頻度に増加は認められなかった。なお，いずれの濃度においても数的異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

2) S9 mix 存在下，4 時間処理

溶媒対照に対する細胞増殖抑制は 37.5 μg/mL で 55%であり，この濃度を染色体異常観察の最高濃度とした。10 及び 37.5 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して構造異常を有する細胞の出現頻度が有意に増加したが（p≤0.05 及び p≤0.01），10 μg/mL の出現頻度は，溶媒対照の背景データの範囲内の変化であった。なお，いずれの濃度においても数的異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

(2) ロット番号:[redacted]，GMP 準拠

1) S9 mix 存在下，4 時間処理

溶媒対照に対する細胞増殖抑制は 40 μg/mL で 58%であり，この濃度を染色体異常観察の最高濃度とした。いずれの濃度（10，20 及び 40 μg/mL）においても，構造異常又は数的異常を有する細胞の出現頻度に溶媒対照と比較して有意な増加は認められなかった。

結論：CHO を用いる染色体異常試験において，GMP 非準拠のイブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化），純度 = 97.3%］に，S9 mix の非存在下及び存在下で構造異常の誘発性が認められたが，数的異常の誘発性は認められなかった。臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]，純度 = 99.7%）の染色体異常試験は，GMP 非準拠のイブルチニブと同等の細胞毒性を示す濃度で評価したが，代謝活性化系の存在下においては，構造異常及び数的異常の誘発性は認められなかった。

以上の結果から，ロット番号[redacted]中に含有される不純物が，染色体異常誘発性に起因した可能性が考えられた。

2.6.6.4.2.2 CHO を用いる染色体異常試験（2 回目）

【評価資料 4.2.3.3.1.3】

【試験方法】

CHO を用いて，臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]，純度 = 99.7%，GMP 準拠）の染色体異常誘発性を評価した。処理時間は S9 mix の非存在下で 4 及び 20 時間とした。染色体異常の観察は，5.0～37.5 μg/mL の範囲で行った。なお，陽性対照としてマイトマイシン C を用いて処理し，20 時間後に細胞を採取した【2.6.7.8C 参照】。

【結果】

溶媒対照に対する細胞増殖抑制は，4 時間処理群の 37.5 μg/mL で 50%及び 20 時間処理群の 20 μg/mL で 58%であった。したがって，染色体異常観察の最高濃度として，4 時間処理群では 37.5 μg/mL，20 時間処理群では 20 μg/mL を選択した。

S9 mix の非存在下での 4 時間処理群では，20 及び 37.5 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して構造異常を有する細胞の出現頻度が統計学的に有意に増加した（p≤0.01）。また，10，20 及び 37.5 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して数的異常を有する細胞の出現頻度が統計学的に有意に増加した（p≤0.05）。しかしながら，構造異常及び数的異常を有する細胞の出現頻度は，溶媒対照の背景データの範囲内の変化であったため，生物学的に意義がある変化でないものと判断された。

S9 mix の非存在下での 20 時間処理群では，5，10 及び 20 μg/mL の濃度で，溶媒対照と比較して構造異常を有する細胞の出現頻度が統計学的に有意に増加した（p≤0.05 又は p≤0.01）。しかしながら，4 時間処理群と同様に，構造異常を有する細胞の出現頻度は，溶媒対照の背景データの範囲内の変化であった。なお，いずれの濃度においても数的異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

結論：CHO を用いる染色体異常試験において，代謝活性化系の非存在下においては，臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]，純度 = 99.7%）は構造異常及び数的異常を誘発しないものと判断された。

2.6.6.4.3 マウス小核試験

【評価資料 4.2.3.3.2.1】

【試験方法】

ICR 雄性マウスを用いて，小核を有する骨髄細胞の多染性赤血球（PCEs）を指標とし，イブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化）］の小核誘発能を評価した。

用量設定試験では，毒性に明らかな性差が認められなかったことから，雄性のみを用いて小核試験を実施した。ICR 雄性マウス（1 群各 5 例）に，溶媒，シクロホスファミドを 50 mg/kg（陽性対照），イブルチニブ を 500，1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，投与 24 時間後に骨髄細胞を採取した。別に，ICR 雄性マウス（1 群各 5 例）に，溶媒又はイブルチニブを 2000 mg/kg の用量で経口投与し，投与 48 時間後に骨髄細胞を採取した。骨髄細胞の PCEs について小核の有無を観察した。全身曝露を評価するため，サテライト群（1 群各 3 例）を 7 群設定し，溶媒又はイブルチニブを 500，1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与した。投与 1 及び 4 時間後に血液を採取し（溶媒対照群は投与 1 時間後のみ），液体クロマトグラフィーータンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いて薬物濃度を測定した【2.6.7.9 参照】。

【結果】

本試験期間中に死亡例及び一般状態の変化は認められなかった。投与 24 及び 48 時間後における骨髄細胞の全赤血球に対する PCEs の出現頻度に基づき，イブルチニブは骨髄毒性を有さないことが示唆された。2000 mg/kg の用量まで小核を有する PCEs の出現頻度に有意な増加は認められなかった。イブルチニブの C_{max} は，500，1000 及び 2000 mg/kg において，それぞれ，2300，

4900 及び 7980 ng/mL であり，全身曝露が確認された。t_{max} は，いずれの投与群ともに投与 4 時間後であった。

結論：マウスを用いた骨髄細胞の小核試験の結果は陰性であり，イブルチニブは染色体損傷を誘発しないものと判断された。

2.6.6.5 がん原性試験

イブルチニブは，治療方法の選択肢が限られた進行性 B 細胞腫瘍患者の治療を目的として開発していることから，ICH S9 ガイドラインにおける「進行がんの患者の治療を目的とした医薬品の製造販売承認申請には，がん原性試験は必要とされない」との記載に基づき，がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ラット胚・胎児発生に関する試験の用量設定試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.5.2.1】

【試験方法】

妊娠 SD 雌性ラット（1 群各 8 例）に，溶媒に懸濁したイブルチニブを 0（溶媒），20，60 及び 200 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回，妊娠 6～17 日に強制経口投与し，妊娠 20 日に帝王切開した。なお，200 mg/kg/日投与群の 3 例に体重減少がみられ，それぞれ妊娠 15，16 又は 17 日に切迫屠殺した。

【結果】

200 mg/kg/日投与群では，母動物に体重減少（妊娠 6～9 日）及び体重増加量の減少（妊娠 9～18 日）が認められた。60 mg/kg/日投与群においても軽度な体重減少及び体重増加量の減少が認められた。

200 mg/kg/日投与群の生存例では全胚吸収（早期吸収胚）がみられ，これら同腹児については更なる検査は実施しなかった。60 mg/kg/日投与群では対照群と比較し，平均胎児体重の減少（-12.8%）が認められた【2.6.7.11 参照】。

2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

【評価資料 4.2.3.5.2.2】

【試験方法】

妊娠 SD 雌性ラット（1 群各 25 例）に，懸濁したイブルチニブを，0（溶媒），10，40 及び 80 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，妊娠 6～17 日に強制経口投与し，妊娠 20 日に帝王切開した。子宮，胎盤及び卵巣を検査し，胎児数，早期及び後期吸収胚数，総着床数並びに黄体数を測定した。妊娠子宮重量を測定し，補正体重及び体重増加量を算出した。胎児については，体重測定，性別判定，外表，内臓及び骨格異常並びに発達変異を観察した【2.6.7.13 参照】。また，対照群では 4 例，投薬群では 1 群各 12 例をサテライト群として設定し，妊娠 6 及び 17 日にトキシコキネティクスを評価した。

【結果】

一般状態及び死亡率：全例とも妊娠 20 日の帝王切開時まで生存した。試験期間中，一般状態に本薬投与に関連した影響は認められなかった。

母動物の体重及び摂餌量：80 mg/kg/日投与群では，妊娠 12～20 日に体重増加量の減少がみられ，妊娠子宮重量の減少も認められた。これらの変化は，80 mg/kg/日投与群でみられた平均胎児体重の減少及び生存胎児数の減少に起因する変化であると考えられた。いずれの投与群においても，摂餌量に本薬投与に関連した影響は認められなかった。

同腹児パラメータ及び胎児観察：80 mg/kg/日投与群では，24 例中 8 例に全胚吸収（100%が早期吸収胚）がみられ，その結果，対照群と比較して，同腹児あたりの着床後胚損失率は増加し，生存胎児数は減少した。また，80 mg/kg/日投与群では対照群と比較して平均胎児体重の減少（-18.4%）が認められた。40 mg/kg/日投与群では，吸収胚数，着床後胚損失率及び生存胎児数など，子宮内生存性に本薬投与の影響は認められなかったが，平均胎児体重は，対照群と比較して減少（-10.5%）した。80 mg/kg/日投与群では，内臓観察で右胸心，食道背方大動脈弓，動脈幹遺残及び右側大動脈弓がみられ，内臓奇形の総発生率が増加した。これらの奇形は，すべてが心臓及び主要血管に関連しており，発生学的な起源が同様であると考えられた。形成異常の発生学的な起源が同様であること，並びに 80 mg/kg/日投与群では生存胎児数の減少及び平均胎児体重の減少がみられていることから，内臓奇形は本薬投与に関連する変化であると判断された。さらに，80 mg/kg/日投与群では骨格変異も認められた。10 mg/kg/日投与群では子宮内発育，並びに 10 及び 40 mg/kg/日投与群では子宮内生存性及び胎児形態に本薬投与による影響は認められなかった。

トキシコキネティクス：イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の C_{max} 及び AUC を表 2.6.6-6 に示す。

表 2.6.6-6 妊娠ラットにおけるイブルチニブ及び PCI-45227（M37）の曝露量

Dose[a] (mg/kg/day)	Gestation Day	C_{max} (ng/mL)		AUC (ng·h/mL)	
		Ibrutinib	PCI-45227 (M37)	Ibrutinib	PCI-45227 (M37)
10	6	462	299	1398	1271
	17	466	261	1278	1203
40	6	1590	1026	4983	4703
	17	1310	726	5348	5110
80	6	2290	1147	11603	8227
	17	2627	1665	13729	12027

[a] No-observed-adverse-effect dose level for embryo/fetal development is underlined.
Gestation Day 6; AUC_{∞}
Gestation Day 17; AUC_{24}

NOAEL：以上のことから，イブルチニブを経口投与したときの母動物に対する NOAEL は 80 mg/kg/日と判断され，NOAEL の妊娠 17 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は 13729 ng·h/mL 及び C_{max} は 2627 ng/mL であった。胚・胎児発生に対する NOAEL は 10 mg/kg/日と判断され，NOAEL の妊娠 17 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は 1278 ng·h/mL，C_{max} は 466 ng/mL であった。

結論：イブルチニブは 80 mg/kg/日の用量で胎児の心臓及び主要血管に奇形が認められたことから，催奇形性物質であると考えられる。その他の発生毒性として，40 及び 80 mg/kg/日投与群で平均胎児体重の減少，80 mg/kg/日投与群で着床後胚損失率の増加が認められた。

2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験の用量設定試験（非 GLP 試験）

【参考資料 4.2.3.5.2.3】

【試験方法】

1 群各 6 例の妊娠 NZW 雌性ウサギに，懸濁したイブルチニブを，0（溶媒），10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，妊娠 7～19 日に強制経口投与し，妊娠 29 日に帝王切開した【2.6.7.11 参照】。

【結果】

100 mg/kg/日投与群では流産した雌性 3 例及び状態悪化の雌性 1 例を妊娠 22 又は 23 日に切迫屠殺した。100 mg/kg/日投与群では，おおむね投与期間を通じて（妊娠 10～13 日及び 13～20 日），体重減少及び摂餌量の減少が認められた。30 mg/kg/日投与群では，妊娠 16～20 日に体重減少及び摂餌量の減少が認められた。

100 mg/kg/日投与群では生存例の雌性 2 例中 1 例に着床後胚損失率（早期及び後期吸収）の増加がみられ，その結果として生存胎児数の減少及び胎児体重の減少が認められた。10 及び 30 mg/kg/日投与群では子宮内発育及び生存性に本薬投与による影響は認められなかった。本試験において，外表奇形又は発達変異はいずれの胎児にも認められなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 光毒性試験

【参考資料 4.2.3.6.1】

【試験方法】

イブルチニブ（ロット番号:[redacted]）の光毒性は，UV 照射及び非照射の条件下において被験物質処理を行い，マウス Balb/c 3T3 線維芽細胞の生存率の相対的な減少を指標として評価した。UV 照射下の 50%阻害濃度（IC_{50}）値に対する UV 非照射下の IC_{50} 値の比として算出される photo irritation factor（PIF）を判定基準とし，光毒性の有無を評価した。溶媒として DMSO を使用した。独立した 2 回の試験を実施し，いずれも溶媒対照及び陽性対照を設定した。いずれの試験ともに，対照群と比較して細胞生存率の濃度依存的な減少がみられ，十分高いイブルチニブの濃度で試験が実施されたことが示唆された【2.6.7.16 参照】。

【結果】

1 回目の試験では，濃度を 2.73～70.00 μg/mL とし，UV 照射及び非照射の条件下で実施した。被験物質処置終了時に，46.67 μg/mL 以上の濃度で析出物がみられた。IC_{50} 値は UV 非照射下で 28.22 μg/mL，UV 照射下で 21.66 μg/mL であり，PIF は 1.30 と算出された。

2 回目の試験では，濃度を 9.30～40.00 μg/mL とし，UV 照射及び非照射の条件下で実施した。被験物質処置終了時に，33.33 μg/mL 以上の濃度で析出物がみられた。IC_{50} 値は UV 非照射下で 25.02 μg/mL，UV 照射下で 22.66 μg/mL であり，PIF は 1.10 と算出された。

結論：*In vitro* の本条件下において，イブルチニブに光毒性は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫毒性試験

2.6.6.8.1.1 13 週間反復投与毒性試験における免疫毒性評価

イブルチニブの薬理学的な標的である BTK は，B リンパ球における B 細胞受容体（BCR）からのシグナル伝達経路において重要な役割を果たしており，イブルチニブは BTK 活性部位のシステイン残基に共有結合し，BTK 酵素活性を阻害する。イブルチニブのラット 4 週間反復投与毒性試験では，雌雄ともに 300 及び 150 mg/kg/日の用量において脾臓のリンパ球枯渇が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験【2.6.6.3.4 参照】では，別途サテライト群を設定し，免疫毒性を評価した【評価資料 4.2.3.2.4】。

【試験方法】

ラット 13 週間反復投与毒性試験において，別途サテライト群（1 群雌雄各 10 例）を設定し，イブルチニブを 0（溶媒），30，100，175（雌性）及び 300（雄性）mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，強制経口投与した。血液検体を試験 79 及び 81 日に採取し，イムノフェノタイピングを評価した。

【結果】

イムノフェノタイピングの結果を表 2.6.6-7 に示す。300 mg/kg/日投与群の雄性，並びに 30 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性では，B 細胞の絶対数が減少した。300/175 mg/kg/日投与群では，B 細胞比率が減少し，その結果として T 細胞比率及び NK 細胞比率の増加が認められた。これらの変動は，100 又は 300/175 mg/kg/日投与群において病理組織学的にみられたリンパ節及び脾臓のリンパ球枯渇と概して一致した変化であった。

表 2.6.6-7 イブルチニブを経口投与したラット 13 週間反復投与毒性試験における免疫表現型解析結果

	Males				Females			
Dose Level (mg/kg/day):	**0**	**30**	**100**	**300**	**0**	**30**	**100**	**175**
Steady-State AUC_{last} (ng·h/mL):	-	2480	5506	21732	-	19712	20661	51549
Number of Rats Evaluated	**10**	**9**	**0**	**8**	**10**	**9**	**0**	**10**
Total T Cells ($x10^3/\mu L$)								
Mean	4.45	4.77	-	4.91	4.09	3.89	-	3.05
% Difference from controls		7.2		10.3		-4.9		-25.4
Helper T Cells ($x10^3/\mu L$)								
Mean	2.66	3.01	-	3.20	2.73	2.53	-	2.02
% Difference from controls		13.2	-	20.3		-7.3	-	-26.0
Cytotoxic T Cells ($x10^3/\mu L$)								
Mean	1.75	1.73	-	1.68	1.31	1.33	-	1.02
% Difference from controls		-1.1	-	-4.0		1.5	-	-22.1
Total B Cells ($x10^3/\mu L$)								
Mean	2.88	2.85	-	**1.30****	3.14	**1.83***	-	**0.49****
% Difference from controls		-1.2	-	-54.9		-41.7	-	-84.4
Natural Killer Cells ($x10^3/\mu L$)								
Mean	0.35	0.51	-	0.52	0.39	0.28	-	0.36
% Difference from controls		45.7	-	48.6		-28.2	-	-7.7
Absolute Lymphocyte ($x10^3/\mu L$)								
Mean	8.87	9.41	-	7.87	8.26	6.71	-	4.72**
% Difference from controls		6.1	-	-11.3		-18.8	-	-42.9

* Significantly different from the control group at 0.05 using Dunnett's test

** Significantly different from the control group at 0.01 using Dunnett's test

2.6.6.8.1.2 免疫毒性試験（追加試験）

【評価資料 4.2.3.7.2.1】

【試験方法】

SD 雌性ラット（1 群各 12 又は 20 例）にイブルチニブを 0（溶媒），10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，28 又は 33 日間反復強制経口投与し，免疫毒性を検討した。対照群及び 100 mg/kg/日投与群については 28 日間の休薬期間を設定し，所見の可逆性を評価した。陽性対照（5 例）としてシクロホスファミドを用い，25 mg/kg/日の用量を試験 10～13 日に腹腔内投与した。抗原として KLH を用い，対照群及びイブルチニブ投与群では試験 14，28 及び 56 日（回復期間），陽性対照群では試験 14 日に静脈内投与した。主試験群については試験 33 日に血液を採取し（3 例/時間/群），トキシコキネティクスを測定した。投与終了時及び回復期間終了時に，血液学的検査，骨髄検査及び免疫検査［T 細胞依存性抗体産生（TDAR），イムノフェノタイピング及び免疫グロブリン（Ig）］，剖検，器官重量及び免疫系に関連する器官・組織の病理組織学的検査を行い，免疫毒性を評価した【2.6.7.17A 参照】。

シクロホスファミド投与群では，リンパ球及び WBC 数が減少し，病理組織学的検査ではリンパ系組織でリンパ球枯渇がみられ，KLH 投与後に抗 KLH IgM 及び IgG 反応並びに IgM 濃度が減少し，免疫抑制が認められた。これらの所見はシクロホスファミドの免疫抑制作用として知られているものであり，動物モデルの妥当性が示された。

【結果】

一般状態及び死亡率：本薬投与に関連した死亡例はみられず，一般状態にも影響は認められなかった。

体重及び摂餌量：体重，体重増加量及び摂餌量に本薬投与に関連した変化は認められなかった。

TDAR 及び免疫化学検査：10 mg/kg/日以上の投与群で，KLH 投与後に，抗 KLH IgM 及び IgG 反応の用量依存的な抑制及び IgM 濃度の用量依存的な減少が認められた。100 mg/kg/日投与群では，KLH 投与後に IgG 濃度の減少がみられた。28 日間の休薬により，100 mg/kg/日投与群における抗体産生能の低下は完全に回復した。

血液学的検査，骨髄検査及びイムノフェノタイピング：10 mg/kg/日以上の投与群では，好中球数に軽度から中等度の用量依存的な増加がみられた。骨髄検査では，M:E 比の軽度な増加及び異型リンパ系細胞が認められた。さらに，100 mg/kg/日投与群では，総リンパ球，ヘルパーT 細胞，細胞傷害性 T 細胞及び B 細胞の減少がみられ，その結果として，WBC 数の減少及び骨髄検査におけるリンパ球の減少が認められた。100 mg/kg/日投与群では，網状赤血球数の軽微な増加も認められたが，赤血球系に関連した変化がみられなかったことから，この変化は毒性学的に意義ある変化ではないと考えられた。28 日間の休薬後，好中球数及び M:E 比の増加は回復傾向を示し，イムノフェノタイピングを含むその他の血液学的変化は完全に回復した。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：リンパ器官及び組織に，10 mg/kg/日以上の投与群でみられた血液学的変化に関連した病理組織学的所見は認められなかった。100 mg/kg/日投与群では WBC 数の変化と関連し，脾臓に白脾髄のリンパ球枯渇が認められた。28 日間の休薬後に，下顎リンパ節の重量増加，並びにこれに関連した形質細胞増加及びリンパ濾胞過形成が認められたが，これらの所見は，イブルチニブの薬理作用による免疫系に対する影響が回復の過程にあることを示したものと考えられた。

トキシコキネティクス：イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の投与後 33 日における t_{max} は，0.5～2 時間であった。概して，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の曝露量は，10～30 mg/kg/日の間で用量比例性を上回る増加を示し，30～100 mg/kg/日では用量比例性を下回る増加を示した。イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の曝露量はほぼ同程度であり，100 mg/kg/日投与群の投与後 33 日における C_{max} 及び AUC は，それぞれイブルチニブでは 2673 ng/mL 及び 13765 ng·h/mL，PCI-45227（M37）では 1433 ng/mL 及び 10162 ng·h/mL であった。

結論：10 mg/kg/日以上の投与群で，用量依存的な TDAR 抑制及び IgM 濃度の減少，好中球数及び M:E 比の増加が認められた。さらに，100 mg/kg/日投与群では KLH 投与後に可逆的な IgG 濃度の減少，並びにリンパ球及び WBC 数の減少がみられ，関連した病理組織学的所見として，脾臓にリンパ球枯渇及び骨髄リンパ球の減少が認められた。これらの影響は，イブルチニブの薬理作用と関連した変化であり，休薬によって回復性を示すことから，免疫系又は免疫機能に対して有害作用を及ぼさないものと考えられた。

2.6.6.8.2 不純物の毒性試験

上述したとおり，イブルチニブの毒性は，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，胚・胎児発生に関する試験及び免疫毒性試験によって評価した。これらの試験に使用した被験物質中において，不純物 不純物B* [注1]， 不純物E* [注2]， 不純物D* [注3]， 不純物C* [注4]又は 不純物H* [注5]が，低濃度で存在した。これらの不純物を更に評価するため，規格値を上回るレベルまで 5 種類の不純物［ 不純物B*（3.30% wt/wt）， 不純物E*（1.29% wt/wt）， 不純物H*（0.37% wt/wt）， 不純物D*（0.95% wt/wt）及び 不純物C*（0.90% wt/wt）］を添加したイブルチニブを用いて，ラット一般毒性試験及びマウス小核試験を実施した。さらに，復帰突然変異誘発性については，*in silico* 又は *in vitro* 試験によって評価した。

2.6.6.8.2.1 5 種類の不純物を添加したイブルチニブの 28 日間反復経口投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.7.6.1】

【試験方法】

SD ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施し，5 種類の不純物［ 不純物H*（0.37% wt/wt）， 不純物B*（3.30% wt/wt）， 不純物E*（1.29% wt/wt）， 不純物D*（0.95% wt/wt），不純物C*（0.90% wt/wt）］を添加及び非添加のイブルチニブ（ロット番号:[redacted]）の毒性を比較し

注1 不純物B*

注2 不純物E*

注3 不純物D*

注4 不純物C*

注5 不純物H*

て不純物の安全性を評価した。投与量は，イブルチニブのラット 4 週間反復経口投与毒性試験【2.6.6.3.3 参照】の NOAEL である 40 mg/kg/日を選択し，ラット（1 群雌雄各 10 例）にイブルチニブを 0（溶媒），40（不純物非添加）及び 40（不純物添加）mg/kg/日の用量で 4 週間反復強制経口投与した。血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査は投与終了時に実施した。全例について試験計画書に規定した器官・組織の病理組織学的検査を実施した【2.6.7.17B 参照】。

【結果】

一般状態及び死亡率：本薬投与に関連した死亡例はみられず，一般状態に変化は認められなかった。

体重及び摂餌量：体重，体重増加量及び摂餌量に異常は認められなかった。

血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査：血液学的検査，凝固系検査及び尿検査に変化は認められなかった。血液生化学的検査では不純物添加及び非添加投与群の雌雄に K 及び AST の軽微な減少が認められた。加えて，両投与群の雌性でコレステロールの軽微な減少が認められた。以上のとおり，血液学的検査，凝固系検査，血液生化学的検査及び尿検査において，不純物添加及び非添加投与群間で差は認められなかった。

器官重量，剖検及び病理組織学的検査：器官重量では不純物添加及び非添加投与群の雄性で脾臓重量（絶対及び相対重量）の減少が認められたが，関連する病理組織学的所見はみられず，有害作用ではないと考えられた。剖検では両投与群の雄性各 1 例の膵臓に赤色巣がみられた。病理組織学的検査では，両投与群の雄性又は雌性で膵臓に軽微から中等度の膵外分泌腺の腺房萎縮及び軽微から軽度の出血が認められた。以上のとおり，器官重量，剖検及び病理組織学的検査において，不純物添加及び非添加投与群間で差は認められなかった。

結論：5 種類の不純物（ 不純物H*， 不純物B*， 不純物E* ， 不純物D*， 不純物C* ）を規格値以上に添加及び非添加した投与群間で毒性プロファイルに明らかな差は認められなかった。また，この試験結果は，これまでに実施した反復投与毒性試験の結果と同様であった。

2.6.6.8.2.2 細菌を用いる復帰突然変異試験

イブルチニブの 1 つ以上の製品バッチにおいて，出荷時又は安定性試験期間中に，ICH Q3A（R2）又は Q3B（R2）ガイドラインで定められた安全性確認が必要な閾値を超えた不純物については，質量分析又は NMR 分析によって構造を決定した。さらに，理論的にイブルチニブに混在する可能性が高いと考えられる不純物の構造も決定した。実際に混在する又は混在すると考えられる，計 22 種の不純物を特定し，不純物の潜在的変異原性について Derek Nexus（v.[redacted]）を用いてコンピュータによる毒性評価を行った。その結果，変異原性と関連する警告構造を有すると判断された 1 種の不純物 不純物E* ，並びに旧版では警告構造を有するが，最新版の Derek Nexus では警告構造を有さないと判断された 2 種の不純物 不純物F* [注6]及び 不純物G* [注7]については，コンピュータによる毒性評価を確認するために，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

注6 不純物F*

注7 不純物G*

加えて，不純物 不純物B*，不純物C*，不純物D* 及び 不純物A* については，ICH Q3A（R2）及び Q3B（R2）ガイドラインに基づいて安全性確認のために，細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。これら不純物の細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験の結果を以下に示す。

(1) 不純物F* の細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.7.6.2】

不純物F*（図 2.6.6-1）の 2 ロット（ロット番号:[redacted] 及び [redacted]）について，ネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvr*A を用いて復帰突然変異誘発性を評価した。試験は，最高濃度を 5000 µg/plate として，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下でプレート法により実施した【2.6.7.17C 参照】。

その結果，純度 94.6%の 不純物F*（ロット番号:[redacted]）を用いた評価では，代謝活性化系の存在下で TA1535 に復帰変異コロニー数の増加がみられ，5000 µg/plate では溶媒対照群と比較して 3.5 倍増加した。確認試験では，最高濃度を 5000 µg/plate として代謝活性化系の存在下で TA1535 を処理した結果，5000 µg/plate の復帰変異コロニー数の増加は溶媒対照群と比較して 2.4 倍であった。これらの結果から，代謝活性化系の存在下における TA1535 の反応は偽陽性であると判断された。さらに，純度が高い 不純物F* のロット（ロット番号:[redacted]，純度:99.9%）を用いて，最高濃度を 5000 µg/plate として代謝活性化系の存在下で TA1535 を処理した結果，復帰変異コロニー数の増加は認められず，不純物F* に復帰突然変異誘発性は認められないものと判断された。

[redacted]

図 2.6.6-1 不純物 不純物F* の化学構造

(2) 不純物G* の細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.7.6.3】

不純物G*（図 2.6.6-2）について，ネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvr*A を用いて復帰突然変異誘発性を評価した。試験は，最高濃度を 5000 µg/plate として，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下でプレート法により実施した【2.6.7.17C 参照】。

その結果，代謝活性化系の有無にかかわらず，復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから，不純物G* に復帰突然変異誘発性は認められないものと判断された。

*新薬承認情報提供時に置き換え



図 2.6.6-2 不純物 不純物C* の化学構造

(3) 不純物E* の細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.7.6.4】

不純物E* （図 2.6.6-3）について，ネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvr*A を用いて復帰突然変異誘発性を評価した。試験は，最高濃度を 5000 μg/plate として，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下でプレート法により実施した【2.6.7.17C 参照】。

その結果，代謝活性化系の有無にかかわらず，復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから， 不純物E* に復帰突然変異誘発性は認められないものと判断された。



図 2.6.6-3 不純物 不純物E* の化学構造

(4) 不純物B* の細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.7.6.5】

不純物B* （図 2.6.6-4）について，ネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvr*A を用いて復帰突然変異誘発性を評価した。試験は，最高濃度を 250 μg/plate として，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下でプレート法により実施した【2.6.7.17C 参照】。

その結果，代謝活性化系の有無にかかわらず，復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから， 不純物B* に復帰突然変異誘発性は認められないものと判断された。

*新薬承認情報提供時に置き換え



図 2.6.6-4 不純物 不純物B* の化学構造

(5) 不純物（ 不純物C* ， 不純物D* 及び 不純物A* ）を添加したイブルチニブの細菌を用いる復帰突然変異試験

【評価資料 4.2.3.7.6.7 及び 4.2.3.7.6.8】

5 種類の不純物［ 不純物H*（0.39% wt/wt），不純物B*（3.47% wt/wt），不純物E*（1.36% wt/wt），不純物D*（1.03% wt/wt）及び 不純物C*（0.96% wt/wt）］及び 不純物A*（2.19% wt/wt）を含有したイブルチニブを用いて復帰突然変異試験を実施した。試験株はネズミチフス菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌株 WP2 *uvrA* を用い，最高濃度を 5000 μg/plate として，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix）の存在下又は非存在下で実施した【2.6.7.17C 参照】。

その結果，代謝活性化系の有無にかかわらず，復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって，不純物及び[redacted]を規格値以上含有しても復帰突然変異誘発性は認められないと判断した。

2.6.6.8.2.3　5 種類の不純物を添加したイブルチニブの小核試験

【評価資料 4.2.3.7.6.6】

【試験方法】

ICR 雄性マウスを用いて，小核を有する骨髄細胞の PCEs を指標とし，5 種類の不純物［不純物H*（0.37% wt/wt），不純物B*（3.30% wt/wt），不純物E*（1.29% wt/wt），不純物D*（0.95% wt/wt），不純物C*（0.90% wt/wt）］を添加したイブルチニブの小核誘発能を評価した。ICR 雄性マウス（1 群各 5 例）に，溶媒，シクロホスファミドを 50 mg/kg（陽性対照），イブルチニブを 500，1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回強制経口投与し，投与 24 時間後に骨髄細胞を採取した。別に，ICR 雄性マウス（1 群各 5 例）に，溶媒又はイブルチニブを 2000 mg/kg の用量で経口投与し，投与 48 時間後に骨髄細胞を採取した。骨髄細胞の PCEs について小核の有無を観察し，また，対照群及び投薬群における全骨髄赤血球に対する PCEs の出現頻度を比較し，被験物質の細胞毒性を評価した。イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の全身曝露を評価するため，サテライト群を 4 群（対照群 3 例，投薬群各 6 例）設定し，溶媒又は不純物を添加したイブルチニブを 500，1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与した。投与 1 及び 4 時間後に血液を採取し（溶媒対照群は投与 1 時間後のみ），LC-MS/MS を用いて分析した【2.6.7.17D 参照】。

*新薬承認情報提供時に置き換え

【結果】

いずれの投与群とも死亡例は認められなかった。一般状態観察では 2000 mg/kg 投与群で立毛がみられたほかは，試験期間を通していずれの投与群にも一般状態の変化は認められなかった。投与 24 及び 48 時間後において，骨髄細胞の全赤血球に対する PCEs の出現頻度に明らかな減少は認められず，不純物を添加したイブルチニブに骨髄毒性はないことが示唆された。イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の十分な曝露はみられたが，不純物を添加したイブルチニブの 2000 mg/kg の用量まで小核を有する PCEs の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

不純物を添加したイブルチニブを雄性マウスに単回経口投与したときの投与 1 及び 4 時間後のイブルチニブ及び PCI-45227（M37）の血漿中濃度は，おおむね投与量に依存して増加した。不純物を添加したイブルチニブの 500，1000 及び 2000 mg/kg において，イブルチニブの C_{max} は，それぞれ 1.68，3.42 及び 7.49 µg/mL，PCI-45227（M37）の C_{max} は，それぞれ 3.22，4.72 及び 5.70 µg/mL であった（投与 4 時間後）。

結論：マウスを用いた骨髄細胞の小核試験の結果は陰性であり，イブルチニブの不純物は規格値以上含有したとしても，染色体損傷を誘発しないものと判断された。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 安全性薬理

ICH ガイドラインに準拠したイブルチニブの安全性薬理試験の結果の詳細については，2.6.2.4 項で考察する。

ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）チャネル電流に対するイブルチニブの IC_{50} 値は，970 nmol/L（427 ng/mL）であった。この濃度は，420 mg/日を反復経口投与された患者における非結合型イブルチニブの定常状態での C_{max} 平均値（3.56 ng/mL）より 120 倍高い。hERG チャネル電流に対する代謝物 PCI-45227（M37）の IC_{50} 値は 9600 nmol/L（4555 ng/mL）であった。この濃度は，420 mg/日を反復経口投与された患者における非結合型 PCI-45227（M37）の定常状態での C_{max} 平均値（11.0 ng/mL）より 415 倍高い。

心血管系に対する作用は，イブルチニブを 0（溶媒），1.5，24 及び 150 mg/kg の用量で無麻酔イヌに単回経口投与して評価した。いずれの投与群においても，QRS 波に対する本薬投与に関連した影響又は QTc 間隔の延長は認められなかった。24 及び 150 mg/kg 投与群において，RR 間隔の延長，心拍数減少及び血圧上昇が認められた。150 mg/kg 投与群では，QTcV 間隔の短縮が投与 1～6 時間後まで認められ，投与 3 時間後に最大の作用（14 ミリ秒の短縮）を示した。イヌ 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験においては，QTc 間隔に本薬投与に関連した変化は認められなかった。

経口投与によるイブルチニブの中枢神経系及び呼吸系に対する影響を評価するために，*in vivo* 安全性薬理試験をラットで実施した。最高用量である 150 mg/kg まで，いずれの系においても本薬投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.6.9.2 急性毒性

イブルチニブの経口投与における最大非致死量は，マウスでは 2000 mg/kg（体表面積で換算した HED = 160 mg/kg），ラットでは雌性で 400 mg/kg 及び雄性で 1000 mg/kg（それぞれ，HED = 64 及び 160 mg/kg）であった。溶液又は懸濁液を強制経口投与したイヌにおける MTD は 200 mg/kg（HED = 108 mg/kg）であった。患者に対する 420 mg の 1 日 1 回投与は，体重を 60 kg と仮定すると 7.0 mg/kg となる。単回投与における最大非致死量は，HED に換算すると，420 mg/日の用量を投与した患者の体重あたりの平均投与量よりも 9～23 倍高値であった。イヌに溶液を 100 mg/kg 経口投与したときのイブルチニブの AUC（27400～40700 ng·h/mL）は，420 mg/日を投与した患者の定常状態におけるイブルチニブの AUC の 40～60 倍であった。

2.6.6.9.3 反復投与試験における標的器官及び組織

ラット及びイヌを用いて，イブルチニブを 1 日 1 回経口投与し，13 週間までの反復投与毒性試験を実施した。13 週間反復経口投与毒性試験における主な毒性所見を表 2.6.6-8 に要約する。

ラット 13 週間反復経口投与毒性試験における主な標的器官及び組織は，リンパ節，脾臓，胸腺，前胃，腸，膵臓，骨皮質及び骨梁であった。ラット 4 週間反復経口投与毒性試験では，腸，膵臓又は骨に変化がみられなかったこと，及び肝臓に変化がみられたことを除き，上記の 13 週間反復経口投与毒性試験と同様な病理組織学的所見が認められた。さらに，ラット 13 週間反復経口投与毒性試験では，食道，胃，皮膚及び腟に扁平上皮萎縮も認められた。

イヌ 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験における主な標的器官は腸管であった。さらに，イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験では，パイエル板及び胃も標的器官及び組織であった。

ラット及びイヌともに，一般状態観察において，本薬投与に関連した影響として軟便又は下痢が認められた。ラットでは，鼻周囲の赤色物質がしばしば認められたが，これは鼻出血に関連した変化であると考えられた。

イヌでは眼科学的検査において，4 週間反復経口投与毒性試験で高用量群（150 mg/kg/日）の 10 例中 3 例，13 週間反復経口投与毒性試験で高用量群（220/120 mg/kg/日）の 1 例に軽度な角膜ジストロフィー/混濁が認められた。

2.6.6.9.3.1 ラット及びイヌのリンパ器官（下顎リンパ節，脾臓及びパイエル板）

ラットにイブルチニブを 40～300 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与したところ，下顎リンパ節では形質細胞，リンパ球及び組織球の傍皮質及びリンパ洞への凝集及び浸潤に特徴づけられるリンパ濾胞過形成が認められた。この病理組織学的所見は，肉眼的には下顎リンパ節の腫大と関連していた。同様な変化は，ラット 2 及び 13 週間反復投与毒性試験では認められなかった。

ラット 4 週間反復投与毒性試験では雌雄の高用量群（雄性 300 mg/kg/日，雌性 150 mg/kg/日），ラット 4 週間免疫毒性試験では雌性の高用量群（100 mg/kg/日）に脾臓のリンパ球枯渇が認められた。この所見と関連した変化として，免疫毒性試験では骨髄リンパ球の減少，IgM 及び IgG 濃度の減少，並びにリンパ球及び WBC 数の減少が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験では，脾臓に外套帯の軽微から重度のリンパ球枯渇，腋窩，下顎又は腸間膜のリンパ節皮質に軽微から中等度のリンパ球枯渇が認められた。脾臓の外套帯のリンパ球枯渇は，イムノフェノタイピングを評価した動物でみられた B 細胞数の減少と関連した変化であった。

イヌ 13 週間反復経口投与試験では，60～220 mg/kg/日の用量で，小腸又は大腸のパイエル板にリンパ球枯渇が認められた。変化の程度は軽微から軽度であり，パイエル板の胚中心及び外套帯のサイズ減少によって特徴づけられる。リンパ球枯渇はイブルチニブの薬理作用【2.4.2.1.1 参照】から予想された所見であり，休薬によって完全に回復した。

2.6.6.9.3.2 ラット及びイヌの消化管

ラット 4 週間反復投与毒性試験では，300 mg/kg/日投与群の雄性で前胃に軽度の扁平上皮過形成が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験では，175 mg/kg/日投与群の雌性で前胃に軽微から中等度の浮腫及び扁平上皮萎縮が認められた。これらの所見はいずれも，両性にみられた変化ではない，若しくは複数の試験で認められなかったことから，毒性学的な意義は明らかではなかった。

ラット 13 週間反復投与毒性試験では，300/175 mg/kg/日投与群で消化管に対する影響として，盲腸，結腸又は直腸に軽微から軽度の急性炎症が認められた。一般状態観察では投与期間を通じて，これらの動物では軟便がみられ，肛門周囲に褐色物質の付着が認められた。

イヌ 4 週間反復投与毒性試験では，150 mg/kg/日投与群の雄性 3 例中 2 例及び雌性 3 例中 1 例で，病理組織学的に腸粘膜に軽微から軽度の炎症が認められた。これらは，一般状態観察でみられた軟便及び下痢，並びに好中球数，単球数又は好酸球数の増加と関連した変化であった。

イヌ 13 週間反復投与毒性試験では，試験 31 日に切迫屠殺した 220 mg/kg/日投与群の雄性 1 例に十二指腸潰瘍及び胃上皮のびらんに加えて，腸に急性炎症が認められた。220/120 mg/kg/日投与群の雌性では胃に軽微から軽度の平滑筋変性が認められた。一般状態観察では，80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群で，投与期間を通じて軟便，粘液便，下痢又は赤色物質を含む下痢が認められた。

ラット及びイヌの消化管でみられた一般状態の変化及び病理組織学的変化は，休薬により完全に回復した。

2.6.6.9.3.3 ラットの膵臓

ラット 2 又は 13 週間反復投与毒性試験では，雌雄ともに膵臓に軽微から中等度の腺房萎縮が認められた。腺房萎縮は，線維化，褐色色素（ヘモジデリン，慢性的な出血を示唆），チモーゲン顆粒減少を有する腺房の小型化及び混合性炎症細胞浸潤（主として好中球，リンパ球及び形質細胞であり，慢性炎症性細胞浸潤に一致）などを伴っていた。これらの病変は 12～300 mg/kg/日の用量で認められ，雌性よりも雄性の方が顕著な変化であったが，13 週間反復投与毒性試験では 6 週間の休薬によって部分的に回復した。ラット 2 週間反復投与毒性試験では，血清アミラーゼ及びリパーゼ濃度を測定したが，変化は認められなかった。

2.6.6.9.3.4 ラットの骨

ラット 13 週間反復投与毒性試験では，胸骨及び大腿骨の軽微から軽度の骨梁の減少を伴った骨皮質の菲薄化が認められた。これらの病変は，主として，100 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性で認められた。骨の病理組織学的変化は，6 週間の休薬により回復した。

2.6.6.9.3.5 ラットの肝臓

ラット 4 週間反復投与毒性試験では，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄数例に軽微な肝細胞壊死（限局性から多巣性）が認められた。投与終了時の ALT は，300/150 mg/kg/日投与群の雌雄でそれぞれ 132%及び 94%増加した。ラット 13 週間反復投与毒性試験においても，100 及び 300 mg/kg/日投与群の雄性で ALT の軽度な増加が認められたが，肝臓に病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.9.3.6 イヌにおける角膜変化

イヌ 4 週間反復投与毒性試験では，投与期間中及び休薬期間中の眼科学的検査で高用量群（150 mg/kg/日）の 10 例中 3 例に角膜ジストロフィー/混濁が認められた。角膜ジストロフィーの程度は軽度から中等度を示し，限局性から多巣性の変化であった。病変は前部角膜実質の上皮下に認められ，2 例は片側性，1 例は両側性であった。病理組織学的検査では，眼科学的検査でみられた角膜ジストロフィーと関連した変化は認められなかった。イヌ 13 週間反復投与毒性試験では，220/120 mg/kg/日投与群の雄性 1 例で投与最終週及び休薬期間中に軽度な両側性の角膜ジストロフィー/変性が認められた。両試験で認められた角膜病変は，ビーグル犬で自然発生的にみられる典型的な偶発的所見であると考えられたが，高用量群のみに認められたことから，イブルチニブとの関連性（直接的な原因又は背景変化の増悪）を否定することはできなかった。ビーグル犬は，角膜脂質代謝障害に起因した角膜ジストロフィー（混濁）に，特になりやすいと考えられている [2)]。角膜での酸化ストレスが，脂質膜の過酸化及びプロテオグリカンの減少を引き起こし，角膜混濁に至ることが知られている [3)]。

2.6.6.9.3.7 ラット及びイヌの血清たん白

ラット及びイヌにおいて，イブルチニブの 1 日 1 回経口投与により，高用量群で血清たん白濃度が軽度に減少した。ラット 4 週間反復投与毒性試験において，高用量群（雄性 300 mg/kg/日，雌性 150 mg/kg/日）では雌雄でアルブミン，総たん白又はグロブリン濃度の減少が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験において，中用量（100 mg/kg/日）及び高用量（300/175 mg/kg/日）の雌雄で，血清アルブミン，総たん白及びグロブリン濃度の軽度な減少が認められた。イヌ 4 週間反復投与毒性試験において，高用量群（150 mg/kg/日）の雌雄で，血清アルブミン，総たん白及び A/G 比の顕著な減少が認められた。イヌ 13 週間反復投与毒性試験において，中用量（80/60 mg/kg/日）及び高用量群（220/120 mg/kg/日）の雌雄で，血清アルブミン濃度の減少が認められた。たん白質の喪失は，一般に，消化管炎症に続発してみられる変化である（たん白喪失性腸症）[4)]。ラット及びイヌでは，一般状態観察で軟便及び下痢などの糞便異常がみられ，病理組織学的検査で腸管に炎症性変化が認められた。したがって，これらの所見から，ラット及びイヌでみられた血清たん白濃度の減少は，消化管の炎症に起因する変化であると考えられた。なお，13 週間反復投与毒性試験では，休薬により血清たん白濃度の影響は完全に回復した。

表 2.6.6-8 ラット及びイヌを用いたイブルチニブの 13 週間反復経口投与毒性試験における主な毒性所見

Affected Site or System	Species	
	Rats	Dogs
Lymphoid Nodes or Peyer's Patches	Lymphoid depletion in lymph nodes: - Females at 175 mg/kg/day	Lymphoid depletion in Peyer's patches: - Males and females at 80/60 and 220/120 mg/kg/day
Clinical correlates in lab animals	↓ *Mean B-cell counts (F=84%) in peripheral blood*	↓ *Mean lymphocyte counts in peripheral blood at the 220/120 mg/kg dose level*
Spleen	Lymphoid depletion in spleen: - Females at 175 mg/kg/day	No treatment-related changes
Clinical correlates in lab animals	↓ *Mean B-cell counts (F=84%) in peripheral blood*	–
Gastrointestinal Tract	Edema, ulceration, and squamous epithelium atrophy of nonglandular stomach: - Females at 175 mg/kg/day Acute inflammation in intestine with ulceration - Females at 175 mg/kg/day	Smooth muscle degeneration in stomach: - Females at 220/120 mg/kg/day Acute inflammation in the intestines: - One female at 220/120 mg/kg/day
Clinical correlates in lab animals	*Soft feces with yellow or brown material on urogenital or anogenital areas*	*Abnormal excreta (soft feces, mucoid feces, and/or diarrhea)*
Pancreas	Moderate acinar atrophy: - Males at 100 and 300 mg/kg/day	No treatment-related changes
Clinical correlates in lab animals	*None*	–
Bone	Thinning of cortical bone and fewer primary trabeculae: - Males at 300 mg/kg/day - Females at 100 and 175 mg/kg/day	No treatment-related changes
Clinical correlates in lab animals	*None*	–
NOAEL:	30 mg/kg/day (HED = 4.8)	30 mg/kg/day (HED = 16)

2.6.6.9.3.8 トキシコキネティクス

イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の定常状態におけるトキシコキネティクスパラメータを表 2.6.6-9，表 2.6.6-10 及び 2.6.7.3 に示す。

ラット 13 週間反復投与毒性試験では，定常状態における曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は，投与量とともに増加した。イブルチニブの平均曝露量は雄性よりも雌性の方が高く，試験 78 日では雌性の低用量，中用量及び高用量群における AUC_{last} は雄性と比較してそれぞれ 7.9，3.8 及び 2.4 倍，C_{max} はそれぞれ 2.3，2.9 及び 2.1 倍高値を示した。雌性の高用量は 175 mg/kg/日であり，雄性の高用量である 300 mg/kg/日よりも低かったが，曝露量は雄性よりも高値であった。また，雌雄ともに投与量にかかわらず，イブルチニブの AUC_{last} は試験 0 日より試験 78 日の方が高く，その累積比は雄性で 1.6～2.1，雌性で 1.4～4.5 であった。

イヌ 13 週間反復投与毒性試験では，定常状態における曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は，投与量とともに増加した。各測定時点におけるイブルチニブ及び PCI-45227（M37）の平均曝露量は，雌雄でおおむね同程度であった。投与量，性別又は測定日にかかわらず，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）の血漿中濃度に個体間変動が認められ，結果として，各投与量におけるイブルチニブ及び PCI-45227（M37）の曝露量の個体間のバラツキは大きかった。イブルチニブの累積率

（試験 0～37 日）は雄性で 1.1～16，雌性で 2.2～9.5 であり，PCI-45227（M37）の累積率もイブルチニブと同程度であった。

2.6.6.9.3.9 ラット及びイヌ 4 週間反復投与毒性試験における NOAEL

(1) ラット 4 週間反復投与毒性試験

ラット 4 週間反復投与毒性試験では，40 mg/kg/日投与群の 1 例に中等度の肝細胞壊死（汎小葉性壊死）が認められた。これは捻転がみられた単一の肝葉に限局しており，肝葉の捻転に起因した虚血によって生じた二次的変化であると考えられたが，ラット 4 週間反復投与毒性試験を実施した時点では，イブルチニブ投与と単一肝葉の肝細胞壊死との関連性を除外せず，この 1 例でみられた肝細胞壊死に基づき，当初，NOAEL は 40 mg/kg/日（中用量群）ではなく，2.5 mg/kg/日（低用量群）と判断した。

この単一肝葉の肝細胞壊死は，4 週間反復投与毒性試験における 150 及び 300 mg/kg/日投与群，また，ラット 2 及び 13 週間反復投与毒性試験においても認められなかった。また，単一肝葉の肝細胞壊死は，ラットで自然発生的に生じる肝葉の捻転に起因した汎小葉性壊死と一致した変化であり [1)]，既知の肝毒性の作用機序によるものではないと判断された。したがって，weight of the evidence に基づき，この単一肝葉の肝細胞壊死は，本薬投与に関連した所見ではなく，肝葉の捻転に起因した偶発的な変化であると判断された。

以上のことから，ラット 4 週間反復投与毒性試験における科学的に妥当な NOAEL は 40 mg/kg/日（HED = 6.4 mg/kg/日）と判断された。

(2) イヌ 4 週間反復投与毒性試験

イヌ 4 週間反復投与毒性試験では，150 mg/kg/日投与群の雌性 3 例中 2 例及び 24 mg/kg/日投与群の雌性 3 例中 1 例で，腎臓に軽微な梗塞が認められた。24 mg/kg/日投与群の雌性 1 例にみられた腎梗塞の所見に基づき，当初，NOAEL は 24 mg/kg/日（中用量群）ではなく，1.5 mg/kg/日（低用量群）と判断した。

腎梗塞は，尿細管拡張，好塩基球増加及び間質性炎症からなるが，これらの所見は若年のビーグル犬において一般的に認められる変化である。ビーグル犬の自然発生病変に関する公表論文では，同様な所見（腎臓の軽度な限局性炎症）の発現率は 12%と報告されている [5)]。また，実験動物の背景データに関する公表論文では，若年のビーグル犬における間質性線維化と炎症の発現率及び重症度は低いことが報告されている [6)，7)]。4 週間反復投与毒性試験でみられた腎梗塞の所見は，ビーグル犬で一般的にみられる自然発生病変と同様であったが，試験報告書完成の時点ではイブルチニブ投与との関連性を除外しなかった。しかしながら，類似した腎臓の病変は，イヌ 2 及び 13 週間反復投与毒性試験では認められなかった。したがって，weight of the evidence に基づき，イヌ 4 週間反復投与毒性試験でみられた腎臓の病変は，自然発生的な変化であり，本薬投与に関連した所見ではないと考えられた。

以上のことから，イヌ 4 週間反復投与毒性試験における科学的に妥当な NOAEL は 24 mg/kg/日（HED = 13 mg/kg/日）と判断された。

2.6.6.9.4 遺伝毒性試験

イブルチニブ［ロット番号:[redacted]（微粉化），純度 97.3%］を用いて復帰突然変異試験，染色体異常試験及びマウス骨髄小核試験を実施した。その結果，復帰突然変異誘発性は認められなかった。染色体異常試験では陽性を示したが，小核試験は陰性であった。また，臨床グレードのイブルチニブ（ロット番号:[redacted]，純度 99.7%）を用いた染色体異常試験では染色体異常誘発性は認められなかった。

2.6.6.9.5 生殖発生毒性試験

ラット胚・胎児発生に関する試験を実施した結果，80 mg/kg/日投与群では，着床後胚損失率の増加及び生存胎児数の減少がみられ，胎児に内臓奇形及び骨格変異が認められた。胎児に奇形がみられたことから，イブルチニブは催奇形性物質と考えられた。40 及び 80 mg/kg/日投与群では，平均胎児体重の減少が認められた。したがって，胚・胎児発生に対する NOAEL は 10 mg/kg/日であると判断された。NOAEL の妊娠 17 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は 1278 ng·h/mL，C_{max} は 466 ng/mL であった。

2.6.6.9.6 免疫毒性試験

雌性ラットを用いた 4 週間免疫毒性試験では，10 mg/kg/日以上の投与群で用量依存的に TDAR の抑制，IgM 濃度の減少，並びに好中球数及び M:E 比の増加が認められた。これらの所見は，イブルチニブによる BCR シグナル伝達経路の阻害によるものと考えられた。

表 2.6.6-9 トキシコキネティクスの比較：定常状態におけるイブルチニブのトキシコキネティクスパラメータ（平均値）

Study Description	Route	Dose Level [a] (mg/kg/d)	Study Day [b]	t_{max} (h) M | F	C_{max} (ng/mL) M | F	AUC_{last} (ng·h/mL) M | F	AUC/dose (ng·h/mL) M | F	HED (mg/kg/d) [c]
Four-week toxicity study in rats [4.2.3.2.3]	PO [d]	2.5 40 300M, 150F	25	1.0 | 1.0 2.0 | 1.0 2.0 | 1.0	50 | 70 650 | 1700 2000 | 3130	140 | 180 2800 | 4000 24000 | 19000	56 | 72 70 | 100 80 | 127	0.40 6.4 48M, 24F
Thirteen-week toxicity study in rats [4.2.3.2.4]	PO [d]	30 100 300M, 175F	78	0.5 | 0.5 1.0 | 1.0 1.0 | 8.0	618 | 1413 666 | 1923 1847 | 3970	2480 | 19712 5506 | 20661 21732 | 51549	82.7 | 657 55.1 | 207 72.4 | 295	4.8 16 48M, 28F
Four-week toxicity study in dogs [4.2.3.2.8]	PO [d]	1.5 24 150	24	1.0 | 1.0 1.0 | 1.3 10 | 3.4	10 | 12 682 | 911 1481 | 2183	17 | 21 1536 | 1853 14079| 15191	11.6 | 14.2 64.0 | 77.2 93.9 | 101	0.81 13 81
Thirteen-week toxicity study in dogs [4.2.3.2.9]	PO [d]	30 80 220	37	0.8 | 3.2 1.0 | 1.3 4.0 | 2.8	87 | 271 245 | 1189 2144| 998	310 | 524 1056 | 5808 17658 | 5038	10.3 | 17.5 13.2 | 72.6 80.3 | 22.9	16 43 119
Thirteen-week toxicity study in dogs [4.2.3.2.9]	PO [d]	30 60 [e] 120 [e]	78	1.0 | 2.0 2.6 | 1.2 2.8 | 2.4	151 | 451 1115 | 842 1859 | 1044	377 | 1683 3414 | 2211 12195 | 6621	12.6 | 56.1 56.9 | 36.9 101 | 55.2	16 32 65
clinical dose in patients	PO [f]	7.0 [g] (420 mg/d)	8	1.84 [h]	132 [h]	680 [h]	ND	7.0

[a] Reported no-observed-adverse-effect dose level is underlined; no-observed-adverse-effect level based on the weight of evidence is double underlined.
[b] First day of dosing designated study day 0 for nonclinical studies and study day 1 for clinical studies.
[c] Conversion factors: rat = 0.16; dog = 0.54.
[d] Suspension formulation.
[e] Dose reduction occurred on study day 42.
[f] Capsule formulation of micronized ibrutinib.
[g] Values are calculated for an 60 kg patient.
[h] Values are means of data from clinical study PCYC-1102-CA in CLL patients at 420 mg/day, groups 1 and 4 pooled (C_{max} n=47, AUC n=45); AUC_{24}.
F = female; M = male; PO = per os, oral

表 2.6.6-10 トキシコキネティクスの比較：定常状態における代謝物 PCI-45227（M37）のトキシコキネティクスパラメータ（平均値）

Study Description	Route	Dose Level [a] (mg/kg/d)	Study Day[b]	t_{max} (h) M | F	C_{max} (ng/mL) M | F	AUC_{last} (ng·h/mL) M | F	AUC_{24} M/P Ratio M | F	HED (mg/kg/d)[c]
Thirteen-week toxicity study in rats [4.2.3.2.4]	PO[d]	30	78	2.0 | 24	283 | 744	1536 | 12758	0.57 | 0.60	4.8
		100		2.0 | 1.0	405 | 736	3698 | 6872	0.62 | 0.31	16
		300M, 175F		8.0 | 1.0	1322 | 956	17547 | 13055	0.75 | 0.24	48M, 28F
Thirteen-week toxicity study in dogs [4.2.3.2.9]	PO[d]	30	37	8.7 | 3.7	51.3 | 92.6	290 | 294	1.0 | 0.51	16
		80		1.2 | 1.7	112 | 374	757 | 3121	0.64 | 0.53	43
		220		3.0 | 3.6	409 | 253	4545 | 1856	0.41 | 0.41	119
Thirteen-week toxicity study in dogs [4.2.3.2.9]	PO[d]	30	78	1.3 | 2.7	33.7 | 67.9	122 | 347	0.35 | 0.21	16
		60[e]		3.4 | 1.5	122 | 102	768 | 352	0.20 | 0.19	32
		120[e]		3.8 | 3.5	164 | 127	1488 | 1131	0.14 | 0.22	65
clinical dose in patients	PO[f]	7.0[g] (420 mg/d)	8	2.66[h]	122[h]	1248[h]	ND	7.0

[a] No-observed-adverse-effect dose level is underlined.
[b] First day of dosing designated study day 0 for nonclinical studies and study day 1 for clinical studies.
[c] Conversion factors: rat = 0.16; dog = 0.54.
[d] Suspension formulation.
[e] Dose reduction occurred on study day 42.
[f] Capsule formulation of micronized ibrutinib.
[g] Values are calculated for an 60 kg patient.
[h] Values are means of data from clinical study PCYC-1102-CA in CLL patients at 420 mg/day, groups 1 and 4 pooled (C_{max} n=47, AUC n=45); AUC_{24}.
F = female; M = male; M/P = metabolite/parent; PO = per os, oral

2.6.6.10 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

1） Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol. 2010;38 (7 Suppl):5S-81S.

2） Roth AM, Ekins MB, Waring GO 3rd, Gupta LM, Rosenblatt LS. Oval corneal opacities in beagles. III. Histochemical demonstration of stromal lipids without hyperlipidemia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981;21:95-106.

3） Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. Semin Cell Dev Biol. 2008;19(2):100-12.

4） Willard MD. Disorders of the intestinal tract. In: Nelson RW, Couto CG, editors. *Small Animal Internal Medicine* 2nd edition. St Louis:Mosby;1998:p.453.

5） Hottendorf GH, Hirth RS. Lesions of spontaneous subclinical disease in Beagle dogs. Vet Pathol. 1974;11(3):240-58.

6） Sato J, Doi T, Wako Y, Hamamura M, Kanno T, Tsuchitani M, et al. Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies. J Toxicol Pathol. 2012;25(1):103-34.

7） McInnes EF, editors. Background Lesions in Laboratory Animals - A Color Atlas. St Louis: Saunders;2012.p.41-42.

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Test Article: Ibrutinib

Species and Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Batch No.	TK	GLP	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Single-Dose Toxicity									
Mouse/CD-1	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	SD	0, 500, 1000, 2000	[redacted] (micronized)	N	N	Pharmacyclics, US	[redacted]-014-M-PO-ATI	4.2.3.1.1
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	SD	0, 400, 1000, 2000	[redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-022-R-PO-AT	4.2.3.1.2
Rat/Sprague-Dawley	IV (bolus) (20% HP-β-CD)	SD	0, 50, 100, 150 100[b], 100[c]	[redacted]	N	N	Pharmacyclics, US	[redacted]-109-R-IV-ATI	4.2.3.1.3
Dog/Beagle	PO or SC (PO: 20% HP-β-CD or 1% MC, 0.4% CrEL ± 0.1% SLS; SC: 20% HP-β-CD)	SD	10 (PO), 10 (SC), 20 (SC), 40 (SC), 100 (PO), 200 (PO)	[redacted]	Y	Y[g]	[redacted], US	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE	4.2.3.1.4
Repeat-Dose Toxicity									
Rat/Sprague-Dawley	PO (1% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	13 days	0, 10, 200	[redacted]	Y	N	Pharmacyclics, US	[redacted]-146-R-PO-TXI	4.2.3.2.1
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	14 days	0, 12, 36, 120	[redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-042-R-PO-TX	4.2.3.2.2

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species and Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Batch No.	TK	GLP	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity (Continued)									
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	28 or 29 days + 28 days recovery	0, 2.5, 40, 300(M)/150(F)	[redacted] (micronized)	Y	Y[h]	[redacted], US	[redacted]-017-R-PO-TX	4.2.3.2.3
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	13 weeks + 6 weeks recovery	0, 30, 100, 300/175[d]	[redacted]	Y	Y	[redacted], US	[redacted]-068-R-PO-TX	4.2.3.2.4
Rabbit/New Zealand White	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	7 or 14 days	50, 200 / 7 days 100 / 14 days	[redacted]	N	N	[redacted], US	[redacted]-136-B-PO-TXE	4.2.3.2.5
Dog/Beagle	PO (28% HP-β-CD)	14 days	100/60[e]	[redacted]	Y	Y[g]	[redacted], US	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE	4.2.3.2.6
Dog/Beagle	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	14 days	0, 4, 12, 40	[redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-043-D-PO-TX	4.2.3.2.7
Dog/Beagle	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	28 or 29 days + 29 days recovery	0, 1.5, 24, 150	[redacted] (micronized)	Y	Y[h]	[redacted], US	[redacted]-018-D-PO-TX	4.2.3.2.8

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species and Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Batch No.	TK	GLP	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity (Continued)									
Dog/Beagle	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	13 weeks + 13 weeks recovery	0, 30, 80/60[f], 220/120[f]	[redacted]	Y	Y	[redacted], US	[redacted]-069-D-PO-TX	4.2.3.2.9
Genotoxicity									
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 50 to 5000 µg/plate	[redacted] (micronized)	N	Y	[redacted], US	[redacted]-027-Sal-X-MU	4.2.3.3.1.1
CHO cells	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 5 to 40 µg/mL microscopically examined	[redacted] (micronized); [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-038-CHO-X-MU	4.2.3.3.1.2
CHO cells	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 5 to 37.5 µg/mL microscopically examined	[redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-071-CHO-X-MU	4.2.3.3.1.3
Mouse/ICR	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	SD	0, 500, 1000, 2000	[redacted] (micronized)	Y	Y[g]	[redacted], US	[redacted]-037-M-PO-MU	4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity: not applicable									
Reproductive and Developmental Toxicity									
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	GD 6-17	0, 20, 60, 200	[redacted]	Y	N	[redacted], US	[redacted]-063-R-PO-TTE	4.2.3.5.2.1

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species and Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Batch No.	TK	GLP	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity (Continued)									
Rabbit/New Zealand White	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	GD 7-19	0, 10, 30, 100	[redacted]	Y	N	[redacted], US	[redacted]-064-B-PO-TTE	4.2.3.5.2.3
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	GD 6-17	0, 10, 40, 80	[redacted]	Y	Y	[redacted], US	[redacted]-132-R-PO-TT	4.2.3.5.2.2
Local Tolerance Phototoxicity									
Balb/c 3T3 mouse fibroblasts	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 2.73 to 70.00 µg/ml ± UV irradiation	[redacted]	N	N	JRD, Belgium	[redacted]-120-3T3-X-PT (TOX10667)	4.2.3.6.1
Other Toxicity Studies: Immunotoxicity									
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	28 and 33 days + 28 days recovery	0, 10, 30, 100	[redacted]	Y	Y	[redacted], Canada	[redacted]-017-R-PO-IMTX (TOX10535)	4.2.3.7.2.1
Impurities – Repeat-Dose Toxicity									
Rat/Sprague-Dawley	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	28 days	0, 40	**Fortified Ibrutinib**[i] [redacted] **Ibrutinib** [redacted]	N	Y	JRD, Belgium	[redacted]-179-R-PO-TX-IMP (TOX10674)	4.2.3.7.6.1
Impurities - Genotoxicity In Vitro									
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 50 to 5000 µg/plate	不純物F* [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-098-Sal-X-Mu	4.2.3.7.6.2

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species and Strain	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Batch No.	TK	GLP	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued): Impurities - Genotoxicity In Vitro									
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 50 to 5000 µg/plate	不純物G* [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-099-Sal-X-Mu	4.2.3.7.6.3
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 50 to 5000 µg/plate	不純物E* [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-113-Sal-X-Mu	4.2.3.7.6.4
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 6.7 to 250 µg/plate	不純物B* [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-170-Sal-X-MU-IMP	4.2.3.7.6.5
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 15 to 5000 µg/plate	**Fortified Ibrutinib**[j] [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-259-Sal-X-MU-IMP	4.2.3.7.6.7
S. typhimurium *E. coli*	*In vitro* (DMSO)	NA	0, 15 to 5000 µg/plate	**Fortified Ibrutinib**[k] [redacted]	N	Y	[redacted], US	[redacted]-260-Sal-X-MU-IMP	4.2.3.7.6.8
Impurities – Genotoxicity In Vivo									
Mouse/ICR	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	SD	0, 500, 1000, 2000	**Fortified Ibrutinib**[i] [redacted]	Y	Y	[redacted], US	[redacted]-034-M-PO-MU (TOX10650)	4.2.3.7.6.6

[a] For Repeat-Dose Toxicity Studies, the NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) at the time of study completion is underlined, if applicable.
[b] 60 minute infusion
[c] 30 minute infusion
[d] Dose was lowered in females from 300 to 175 mg/kg/day on Day 8.
[e] Dose lowered from 100 to 60 mg/kg/day on Day 9.
[f] Doses were lowered from 80 to 60 mg/kg/day and from 220 to 120 mg/kg/day on Day 42.
[g] GLP compliant except for parent and metabolite plasma sample analyses and toxicokinetics or for test article characterization
[h] GLP compliant except for metabolite plasma sample analyses
[i] Ibrutinib fortified with 不純物B* (3.30% wt/wt), 不純物E* (1.29% wt/wt), 不純物H* (0.37% wt/wt), 不純物D* (0.95% wt/wt) and 不純物C* (0.90% wt/wt)
[j] Ibrutinib fortified with 不純物B* (3.47% wt/wt), 不純物E* (1.36% wt/wt), 不純物H* (0.39% wt/wt), 不純物D* (1.03% wt/wt) and 不純物C* (0.96% wt/wt)
[k] Ibrutinib fortified with 不純物A* (2.19% wt/wt)

CHO = Chinese hamster ovary; CrEL = Cremophor EL; DMSO = dimethylsulfoxide; *E.* = *Escherichia*; F = female; GD = gestation day; HP-β-CD = hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; IV = intravenous; JRD = Janssen Research & Development; M = male; MC = Methylcellulose; N = no; NA = not applicable; PO = oral; *S.* = *Salmonella*; SC = subcutaneous; SD = single dose; SDE = single dose escalation; SLS = sodium lauryl sulfate; TK = toxicokinetics; Y = yes

*新薬承認情報提供時に置き換え

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

Test Article: Ibrutinib

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	Doses (mg/kg)	Analyte	GLP Compliance	Study No.	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity Study (28-day and 28-day recovery)	Sprague-Dawley Rat	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 2.5, 40, 300(M)/150(F)	ibrutinib PCI-48303[c]	Y[e]	[redacted]-017-R-PO-TX	4.2.3.2.3
Repeat-Dose Toxicity Study (13-week and 6-week recovery)	Sprague-Dawley Rat	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	0, 30, 100, 300/175[a]	ibrutinib PCI-45227[d]	Y	[redacted]-068-R-PO-TX	4.2.3.2.4
Repeat-Dose Toxicity Study (28-day and 28-day recovery)	Beagle Dog	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 1.5, 24, 150	ibrutinib PCI-48303[c]	Y[e]	[redacted]-018-D-PO-TX	4.2.3.2.8
Repeat-Dose Toxicity Study (13-week and 13-week recovery)	Beagle Dog	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	0, 30, 80/60[b], 220/120[b]	ibrutinib PCI-45227[d]	Y	[redacted]-069-D-PO-TX	4.2.3.2.9
Reproductive and Developmental Toxicity-Embryo/Fetal Development	Sprague-Dawley Rat	PO (0.5% MC, 0.1% SLS)	0, 10, 40, 80	ibrutinib PCI-45227[d]	Y	[redacted]-132-R-PO-TT	4.2.3.5.2.2

[a] Dose was lowered in females from 300 to 175 mg/kg/day on Day 8
[b] Doses were lowered from 80 to 60 mg/kg/day and from 220 to 120 mg/kg/day on Day 42
[c] PCI-48303, the glutathione conjugate of ibrutinib, was generally below the limit of quantitation (10.0 ng/mL) in plasma from rats and dogs
[d] PCI-45227 is a dihydrodiol metabolite of ibrutinib
[e] GLP compliant except for metabolite plasma sample analyses (PCI-48303)

CrEL = Cremophor EL; F = female; M = male; MC = methylcellulose; PO = oral; SLS = sodium lauryl sulfate; Y = yes

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表

Test Article: Ibrutinib

Daily Dose (mg/kg)	Ibrutinib Steady-State $AUC_{0\text{-}24h}$ or $AUC_{0\text{-}last}$ (ng·h/mL)				
	Rat		Dog		Human
	M	F	M	F	(M+F)
7.0[a]					680[e]
10[b]		1278			
30[c,d]	2480	19712	377	1683	
40[b]		5348			
60[d]			3414	2211	
80[b]		13729			
100[c]	5506	20661			
120[d]			12179	6628	
175[c]		51549			
300[c]	21732				

[a] Daily dose calculated based on 60 kg patient at 420 mg dose
[b] $AUC_{0\text{-}24h}$ from Study [redacted]-132-R-PO-TT, Embryo/fetal development study (pregnant rats)
[c] $AUC_{0\text{-}last}$ from Study [redacted]-068-R-PO-TX, 13-week toxicity study in rats
[d] $AUC_{0\text{-}last}$ from Study [redacted]-069-D-PO-TX, 13-week toxicity study in dogs
[e] $AUC_{0\text{-}24h}$ from Study PCYC-1102 in CLL patients, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=45)

F = female; M = male

(Continued)

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表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Daily Dose (mg/kg)	Ibrutinib Steady-State C_{max} (ng/mL)				
	Rat		Dog		Human
	M	F	M	F	(M+F)
7.0[a]					132[e]
10[b]		466			
30[c,d]	618	1413	151	451	
40[b]		1310			
60[d]			1115	842	
80[b]		2627			
100[c]	666	1923			
120[d]			1859	1044	
175[c]		3970			
300[c]	1847				

[a] Daily dose calculated based on 60 kg patient at 420 mg dose
[b] Study [redacted]-132-R-PO-TT, Embryo/fetal development study (pregnant rats)
[c] Study [redacted]-068-R-PO-TX, 13-week toxicity study in rats
[d] Study [redacted]-069-D-PO-TX, 13-week toxicity study in dogs
[e] Study PCYC-1102 in CLL patients, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=47)

F = female; M = male

(Continued)

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表（続き）

Test Article: Ibrutinib
Analyte: Metabolite PCI-45227

Daily Ibrutinib Dose (mg/kg)	PCI-45227 Steady-State $AUC_{0\text{-}24h}$ or $AUC_{0\text{-}last}$ (ng·h/mL)				
	Rat		Dog		Human
	M	F	M	F	(M+F)
7.0[a]					1248[e]
10[b]		1203			
30[c,d]	1536	12758	122	347	
40[b]		5110			
60[d]			768	352	
80[b]		12027			
100[c]	3698	6872			
120[d]			1488	1131	
175[c]		13055			
300[c]	17547				

[a] Daily dose calculated based on 60 kg patient at 420 mg dose
[b] $AUC_{0\text{-}24h}$ from Study [redacted]-132-R-PO-TT, Embryo/fetal development study (pregnant rats)
[c] $AUC_{0\text{-}last}$ from Study [redacted]-068-R-PO-TX, 13-week toxicity study in rats
[d] $AUC_{0\text{-}last}$ from Study [redacted]-069-D-PO-TX, 13-week toxicity study in dogs
[e] $AUC_{0\text{-}24h}$ from Study PCYC-1102 in CLL patients, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=45)

F = female; M = male

(Continued)

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表（続き）

Test Article: Ibrutinib
Analyte: Metabolite PCI-45227

Daily Ibrutinib Dose (mg/kg)	PCI-45227 Steady-State C_{max} (ng/mL)				
	Rat		Dog		Human
	M	F	M	F	(M+F)
7.0[a]					122[e]
10[b]		261			
30[c,d]	283	744	33.7	67.9	
40[b]		726			
60[d]			122	102	
80[b]		1665			
100[c]	405	736			
120[d]			164	127	
175[c]		956			
300[c]	1322				

[a] Daily dose calculated based on 60 kg patient at 420 mg dose
[b] Study [redacted]-132-R-PO-TT, Embryo/fetal development study (pregnant rats)
[c] Study [redacted]-068-R-PO-TX, 13-week toxicity study in rats
[d] Study [redacted]-069-D-PO-TX, 13-week toxicity study in dogs
[e] Study PCYC-1102 in CLL patients, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=47)

F = female; M = male

2.6.7.4 毒性試験：被験物質の一覧表

Test Article: Ibrutinib

Lot No.	Purity (area %)	Specified Impurities[a] (wt %)						Study Number	Type of Study	Location in CTD
		不純物H* NMT [redacted]%	不純物B* NMT [redacted]%	不純物E* NMT [redacted]%	不純物D* NMT [redacted]%	不純物C* NMT [redacted]%	不純物A* [b] NMT [redacted]%			
Current commercial specification:	[redacted]									
[redacted][c]	92.6	< 0.05	0.71	1.0	0.09	0.06	NA	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE	Escalating Single-dose oral and SC toxicity in dogs	4.2.3.1.4
[redacted][c]	98.3	< 0.05	0.49	1.0	< 0.05	< 0.05	NA	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE	Oral 14-day toxicity in dogs	4.2.3.2.6
[redacted] (micronized)[c] Also referred to as [redacted]	97.3	< 0.05	2.2	1.3	< 0.05	< 0.05	0.1	[redacted]-024-R-PO-SP	Effect on CNS in rats	4.2.1.3.1
								[redacted]-077-R-PO-SP	Effects on respiratory system in rats	4.2.1.3.4
								[redacted]-026-D-PO-SP	Effects on cardiovascular system in dogs	4.2.1.3.3
								[redacted]-017-R-PO-TX	4-week toxicity in rats	4.2.3.2.3
								[redacted]-018-D-PO-TX	4-week toxicity in dogs	4.2.3.2.8
								[redacted]-027-Sal-X-MU	Mutagenicity in bacteria	4.2.3.3.1.1
								[redacted]-038-CHO-X-MU	Chromosome aberrations in CHO cells	4.2.3.3.1.2
								[redacted]-037-M-PO-MU	Erythrocyte bone marrow micronuclei (mouse)	4.2.3.3.2.1
[redacted][c]	95.7	< 0.05	4.6	0.08	0.09	< 0.05	NA	[redacted]-022-R-PO-AT	Acute oral toxicity in rats	4.2.3.1.2
								[redacted]-079-HEK-X-CT	hERG channel effects in HEK293 cells	4.2.1.3.2

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 毒性試験：被験物質の一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Lot No.	Purity (area %)	Specified Impurities[a] (wt %)						Study Number	Type of Study	Location in CTD
		不純物H*	不純物B*	不純物E*	不純物D*	不純物C*	不純物A*[b]			
Current commercial specification:	[redacted]	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%			
[redacted][c]	99.7	< 0.05	< 0.05	0.08	0.15	< 0.05	0.3	[redacted]-038-CHO-X-MU	Chromosome aberrations in CHO cells	4.2.3.3.1.2
								[redacted]-071-CHO-X-MU	Chromosome aberrations in CHO cells	4.2.3.3.1.3
[redacted][e]	97.5[d]	0.08	0.10	0.13	< 0.05	< 0.05	2.09	[redacted]-068-R-PO-TX	13-week toxicity in rats	4.2.3.2.4
[redacted][e,i]	97.4[j]	NA[h]	NA[h]	NA[h]	NA[h]	NA[h]	2.19	[redacted]-260-Sal-X-MU-IMP	Bacterial Reverse Mutation Assay	4.2.3.7.6.8
[redacted][f]	99.6	0.08	0.09	0.13	< 0.05	< 0.05	0.3	[redacted]-042-R-PO-TX	2-week toxicity in rats	4.2.3.2.2
								[redacted]-043-D-PO-TX	2-week toxicity in dogs	4.2.3.2.7
								[redacted]-069-D-PO-TX	13-week toxicity in dogs	4.2.3.2.9
								[redacted]-132-R-PO-TT	Embryo/fetal development in rats	4.2.3.5.2.2
[redacted]	98.3	< 0.05	0.60	0.24	0.09	< 0.05	0.3	[redacted]-017-R-PO-IMTX (TOX10535)	4-week immunotoxicity in rats	4.2.3.7.2.1
[redacted]	100.1	< 0.05	0.16	0.16	0.06	< 0.05	0.32	[redacted]-179-R-PO-TX-IMP (TOX10674)	4-week toxicity in rats	4.2.3.7.6.1
[redacted][g]	93.2	0.37	3.30	1.29	0.95	0.90	NA	[redacted]-179-R-PO-TX-IMP (TOX10674)	4-week toxicity in rats	4.2.3.7.6.1
								[redacted]-034-M-PO-MU (TOX10650)	In vivo mouse micronucleus assay	4.2.3.7.6.6
[redacted][g,i]	92.8[j]	0.39	3.47	1.36	1.03	0.96	NA	[redacted]-259-Sal-X-MU-IMP	Bacterial Reverse Mutation Assay	4.2.3.7.6.7

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 毒性試験：被験物質の一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

[a] Specified impurities data are in weight %, incorporating response factors with respect to ibrutinib
[b] [redacted] of ibrutinib
[c] See Mod3/3.2.S.3.2/Tab4 for further details.
[d] 97.5% = chromatographic purity of 99.6% - chiral impurity of 2.09%
[e] Derived from Lot [redacted]; fortified with PCI-32769
[f] See Mod3/3.2.S.3.2/Tab5 for further details.
[g] Ibrutinib fortified with 不純物H* , 不純物B* , 不純物E* , 不純物D* and 不純物C* .
[h] Total impurities excluding 不純物A* : 0.44% (wt/wt)
[i] Re-test requirement
[j] % (wt/wt)

CHO = Chinese hamster ovary; CNS = central nervous system; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; NA = not analyzed; NMT = not more than; SC = subcutaneous; wt = weight

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No. Location in CTD
Mouse/CD-1 M+F/3	PO, gavage (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 500, 1000 and 2000	500 mg/kg: Mild to moderate rough coat 1000 mg/kg: Mild to moderate rough coat 2000 mg/kg = **maximum non-lethal dose**: Mild to moderate inactivity, ptosis and/or decreased body temperature and labored respiration	[redacted]-014-M-PO-ATI (non-GLP) 4.2.3.1.1
Rat/Sprague-Dawley M+F/5 (fasted)	PO, gavage (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 400, 1000 and 2000	400 mg/kg = **maximum non-lethal dose for females**: ↓ BWG (M, Day 0-2: x0.62) 1000 mg/kg = **maximum non-lethal dose for males/minimum lethal dose for females**: 1F died on Day 1, without macroscopic findings ↓ BW (M/F, Day 2: x0.88/x0.84; F, Day 14: x0.91), ↓ BWG (M/F, Day 0-2: x0.20/-4g*), ↑ BWG (F, Day 2-7: x2.5) 2000 mg/kg = **minimum lethal dose for males**: 1M died on Day 6, showing distended stomach and intestines, 1M/1F died on Day 7 showing red matting on the skin and dark red contents of the stomach (M), and without macroscopic findings (F) ↓ BW (M/F, Day 2: x0.87/x0.90 and Day 7: x0.81/x0.73; F, Day 14: x0.86), ↓ BWG (M/F, Day 0-2: x0.02/x0.23; F, Day 2-7: -24g*), ↑ BWG (M/F, Day 7-14: x1.5/x2.1) Abnormal excreta (soft feces, smaller than normal feces, diarrhea, ↓ defecation), various discolored areas due to discharges/excreta (wet and/or dried red, yellow, clear and/or brown material around nose, mouth, ventral neck, forelimbs, anogenital and/or urogenital areas), thin body, cool to the touch, red discharge from left eye (1M); abnormal respiration (rales), dermal atonia, hair loss on anogenital area or ventral trunk and swollen ears (1F)	[redacted]-022-R-PO-AT (GLP) 4.2.3.1.2

(Continued)

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No. Location in CTD
Rat/Sprague-Dawley F Vehicle: 3 50 mg/kg bolus: 6 100 mg/kg bolus: 1 150 mg/kg bolus: 2 100 mg/kg, 60 min infusion: 3 100 mg/kg, 30 min infusion: 3	IV (bolus) (20% HP-β-CD)	0, 50, 100 [a], 150	50 mg/kg = **maximum tolerated dose**: Mild inactivity at 30 min postdosing. 100 mg/kg (IV bolus): All rats died within 10 min after dose administration, after showing ataxia, gasping, inactivity and tonic convulsions. 150 mg/kg: All rats died within 10 min after dose administration, after showing ataxia, gasping, inactivity and tonic convulsions. 100 mg/kg (60 min infusion) = **maximum tolerated dose**: Mild ataxia and inactivity at end of infusion period, mild rough coat and inactivity at 1 h after infusion. 100 mg/kg (30 min infusion) = **maximum tolerated dose**: Moderate ataxia and inactivity.	[redacted]-109-R-IV-ATI (non-GLP) 4.2.3.1.3
			The data for the single-dose escalation portion of a dog toxicity study that included a 14-day repeated dose portion, can be found under Mod2.6.7.6.	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE (GLP)

*Absolute value
[a] Administered as an IV bolus as well as 60 minute and 30 minute infusions

BW = body weight; BWG = body weight gain; CrEL = Cremophor EL; F = female; HP-β-CD = hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; IV = intravenous; M = male; MC = Methylcellulose; PO = oral; SLS = sodium lauryl sulfate;
↓ = decrease; ↑ = increase

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Rat/Sprague-Dawley M+F/4	PO, gavage (1% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	2 weeks	0, 10, 200	ND	10 mg/kg/day: ↓ leukocytes (M: x0.74), ↓ lymphocytes (M: x0.70), ↓ RBC (F: x0.83), ↓ hemoglobin (F: x0.86), ↓ hematocrit (F: x0.85), ↓ albumin (M/F: x0.90/x0.93) C_{max} = 0.082 & 0.27 µg/mL; $AUC_{0\text{-}24h}$ = 0.17 & 0.53 µg.h/mL (M&F) 200 mg/kg/day: Slight to moderate rough coat (F), ↓ BW (F: x0.93) ↓ leukocytes (M: x0.64), ↓ lymphocytes (M: x0.52), ↓ lymphocytes (%) (F: x0.74), ↓ RBC (F: x0.74), ↓ hemoglobin (F: x0.75), ↓ hematocrit (F: x0.76), ↑ ALT (M/F: x1.55/x1.67), ↓ albumin (M/F: x0.90/x0.83), ↓ total protein (M/F: x0.87/x0.82), ↓ ALP (F: x0.51), ↓ AST (F: x0.69), ↓ globulin (F: x0.79) Pale livers (3F), enlarged livers (2F), distended intestines (1M/4F) C_{max} = 0.99 & 7.45 µg/mL; $AUC_{0\text{-}24h}$ = 9.90 & 44.8 µg.h/mL (M&F)	[redacted]-146-R-PO-TXI (non-GLP) 4.2.3.2.1

(Continued)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Rat/Sprague-Dawley M+F/10	PO, gavage (0.5% MC, 0.1% SLS)	14 days	0, 12, 36, 120	12	12 mg/kg/day: ↓ potassium (M/F: x0.80/x0.79) Minimal to mild acinar atrophy of pancreas (6M); minimal lymphoid depletion of spleen (1M); minimal acute inflammation in cecum (1F) 36 mg/kg/day: ↓ hematocrit (M: x0.95) ↓ total protein (F: x0.94), ↓ potassium (M/F: x0.84/x0.84) ↓ testes weight (M: x0.94, relative to brain) Minimal to moderate acinar atrophy of pancreas (7M/2F); minimal lymphoid depletion of spleen (1M) 120 mg/kg/day: ↓ hematocrit (M/F: x0.95/x0.95), ↑ HDW (M/F: x1.07/x1.07), ↓ MCV (M: x0.96), ↑ neutrophil (F: x2.03) ↑ ALT (M/F: x1.34/x1.47), ↓ potassium (M/F: x0.80/x0.78), ↓ albumin (F: x0.92), ↓ calcium (F: x0.93), ↓ total protein (F: x0.91), ↓ ALP (F: x0.68) ↓ spleen weight (M: x0.81), ↓ testes weight (M: x0.91), ↑ thyroids/parathyroids weight (F: x1.18) Minimal to moderate acinar atrophy of pancreas (3M); minimal lymphoid depletion of spleen (4M); minimal acute inflammation in cecum (1F) **Conclusion**: moderate acinar atrophy of the pancreas at 36 and 120 mg/kg/day was considered adverse; all other findings considered non-adverse.	[redacted]-042-R-PO-TX (GLP) 4.2.3.2.2

(Continued)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Rabbit/New Zealand White F/3	PO, gavage (0.5% MC, 0.1% SLS)	7 or 14 days RD	50, 200 / 7 days 100 / 14 days	ND	50 mg/kg: Diarrhea and soft stool (1), ↓ defecation (2) ↓ Mean BW 3.0%, ↓ FC 100 mg/kg: Soft stool, feces small and ↓ defecation (2), ↓ FC 200 mg/kg: Soft stool (2), ↓ defecation (3) ↓ Mean BW 4.4%, ↓ FC	[redacted]-136-B- PO-TXE (non-GLP) 4.2.3.2.5

(Continued)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Single Dose Escalation Dog/Beagle M+F/1[b] or M+F/2[c,d]	PO, gavage or SC (bolus) PO, gavage: 20% HP-β-CD or 1% MC, 0.4% CrEL ± 0.1% SLS SC: 20% HP-β-CD	SDE	10 (PO-Solution)[b] 10 (SC-Solution)[b] 20 (SC-Solution)[b] 40 (SC-Solution)[b] 100 (PO-Solution)[b] 100 (PO-Suspension)[c] 200 (PO-Suspension)[d]	ND	10 mg/kg, PO: No test article-related observations. C_{max} = 0.58 & 0.35 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 0.86 & 0.80 µg.h/mL (M&F) 10 mg/kg, SC: Flinching, scratching. ↑ total leukocyte counts (M: x1.53; F: x1.44) C_{max} = 0.66 & 1.66 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 3.8 & 5.0 µg.h/mL (M&F) 20 mg/kg, SC: Scratching at dose sites. ↑ total leukocyte counts (M: x1.58; F: x2.03) C_{max} = 4.40 & 2.10 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 10.9 & 10.5 µg.h/mL (M&F) 40 mg/kg, SC: Squirming and thrashing. Biting and scratching at dose sites immediately after dosing. Ataxia and hypoactivity up to 4 h after dosing. ↑ total leukocyte counts (M: x1.21; F: x1.84) C_{max} = 7.76 & 8.29 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 27.3 & 33.0 µg.h/mL (M&F) 100 mg/kg, PO, solution: Mild ataxia at 2 h postdosing. C_{max} = 7.62 & 8.29 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 27.4 & 40.7 µg.h/mL (M&F) Complete occupancy of Btk for at least 24 h postdosing 100 mg/kg, PO, suspension: Mild ataxia at 2 h postdosing. C_{max} = 0.79 & 1.10 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 3.63 & 5.05 µg.h/mL (M&F) Complete occupancy of Btk for at least 24 h postdosing 200 mg/kg, PO, suspension without SLS: Mild ataxia and hypoactivity at 2 h postdosing; glassy appearance to the eyes at 1 to 8 h postdosing. C_{max} = 0.082 & 0.16 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 0.66 & 0.67 µg.h/mL (M&F)	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE (GLP) 4.2.3.1.4

(Continued)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Single Dose Escalation (Continued)				ND	200 mg/kg, PO, suspension with SLS: Mild ataxia and hypoactivity at 2 h postdosing; glassy appearance to the eyes at 1 to 8 h postdosing. C_{max} = 0.83 & 0.88 µg/mL; $AUC_{0-\infty}$ = 5.62 & 2.81 µg.h/mL (M&F)	[redacted]-015-D-SC/PO-TXE (GLP) 4.2.3.1.4 (Continued)
Repeat Dose Dog/Beagle M+F/2	PO, gavage: 28% HP-β-CD	14 days	100/60[e]	ND	100 mg/kg/day: Hypoactivity, glassy appearance to the eyes, abnormal excreta, ataxia, ↓ FC. 60 mg/kg/day: Abnormal excreta (often), slight ataxia and slight hypoactivity (occasionally), blood in urine (occasionally), intermittent shivering (end of dosing period). SDE through RD: ↓ BW (M/F: up to x0.91/x0.94) ↑ neutrophils (M/F), ↑ total leukocyte counts (M/F), ↑ platelet counts (M/F), ↑ ALT (M/F), ↑ ALP (1M); In 1F: ↓ RBC, ↓ hemoglobin, ↓ hematocrit (up to x0.84) C_{max} = 4.02 & 4.23 µg/mL; AUC_{0-24h} = 17.2 & 19.4 µg.h/mL (M&F) End of 17-day recovery period: Complete recovery for leukocyte and neutrophil counts, ALT and ALP. **Conclusion:** The maximum tolerated single oral dose = 200 mg/kg and for repeat oral dose for 6 days = 60 mg/kg/day. The solution formulation was better absorbed than the suspension formulation. Ibrutinib was apparently irritating when administered by the subcutaneous route.	4.2.3.2.6

(Continued)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Dog/Beagle M+F/3	PO, gavage (0.5% MC, 0.1% SLS)	14 days	0, 4, 12, 40	40	4 mg/kg/day: ↑ liver weight (M: x1.14), ↑ liver weight/BW (F: x1.15), minimally ↑ hepatocellular glycogen (M) 12 mg/kg/day: Soft feces (1M) ↑ liver weight (M: x1.20), ↑ liver/brain weight (M: x1.23), minimally ↑ hepatocellular glycogen (M) 40 mg/kg/day: Soft feces (2M/1F) ↑ liver weight (M/F: x1.24/x1.18), ↑ liver weight/BW (F: x1.15), minimally ↑ hepatocellular glycogen (M/F)	[redacted]-043-D-PO-TX (GLP) 4.2.3.2.7

[a] No Observed Adverse Effect Level
[b] Formulated as solution in 20% HP-β-CD
[c] One group (1/sex) received solution containing 20% HP-β-CD; the other group (1/sex) received suspension containing 0.1% SLS, 1% MC and 0.4% CrEL.
[d] One group (1/sex) received suspension containing 0.1% SLS, 1% MC and 0.4% CrEL; the other group (1/sex) received a suspension containing 1% MC and 0.4% CrEL.
[e] Dose lowered from 100 to 60 mg/kg/day due to several clinical signs of toxicity (hypoactivity, "glassy" appearance to the eyes, abnormal excreta, reduced food consumption and ataxia) after 8 days of dosing at 100 mg/kg/day.

ALP = alkaline phosphatase; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; Btk = Bruton's tyrosine kinase; BW = body weight; CrEL = Cremophor® EL; F = female; FC = food consumption; HDW = hemoglobin distribution width; HP-β-CD = hydroxypropyl-beta-cyclodextrin; M = male; MC = Methylcellulose; MCV = mean corpuscular volume; ND = not determined; PO = oral; RBC = red blood cells; RD = repeated dose; SC = subcutaneous; SDE = single dose escalation; SLS = sodium lauryl sulfate
↓ = decrease; ↑ = increase

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験

Report Title: A 28-day oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley **Duration of Dosing:** 28 or 29 days **Study No.:** [redacted]-017-R-PO-TX
Age at First Dose: ± 7-8 weeks **Duration of Postdose Recovery:** 28 days **Location in CTD:** 4.2.3.2.3
Date of First Dose: [redacted] **Route:** Oral gavage
Vehicle/Formulation: aqueous suspension containing 0.5% methylcellulose, 0.4% Cremophor EL and 0.1% sodium lauryl sulfate **GLP Compliance:** Yes
No Observed Adverse Effect Level: 2.5 mg/kg/day

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**2.5**		**40**		**300**	**150**
No. of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Toxicokinetics:								
No. of Animals	M: 3	F: 3	M: 7	F: 7	M: 7	F: 7	M: 7	F: 7
AUC (µg·h/mL)								
Day 0 $_{(0-\infty)}$	-	-	0.090	0.16	1.01	3.33	11.1	14.8
Day 25 $_{(0-24h)}$	-	-	0.14	0.18	2.80	4.00	24.0	19.0
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.040	0.060	0.37	1.10	1.28	2.94
Day 25	-	-	0.050	0.070	0.65	1.70	2.00	3.13
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1	0
Clinical Observations (2x daily)[a]								
Dried red material around nose[b]								
Time of dosing	0	0	-	-	-	-	5	3
1 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	10	1
Dried red material around eyes (left/right)[b]								
Time of dosing	0/1	-	-	-	-	-	1/1	-
1 h post-dosing	0/1	-	-	-	-	-	1/1	-
Wet clear material around mouth								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
1 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	5	1

(Continued)

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**2.5**		**40**		**300**	**150**
No. of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Clinical Observations (2x daily; Continued)								
Soft feces[b]								
Time of dosing	0	0	-	-	-	-	9	4
1 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	5	5
Wet yellow material urogenital area[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	3	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Dried yellow material urogenital area[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
Wet brown material anogenital area[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	3	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	5	-
Dried brown material anogenital area[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	7	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	6	-
Thin body[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
Dermal atonia[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
Body cool to touch[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Pale extremities[b]								
Time of dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Partial closure of left/right eye[b]								
Time of dosing	0/0	-	-	-	-	-	2/2	-
1 h post-dosing	0/0	-	-	-	-	-	2/2	-

(Continued)

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**2.5**		**40**		**300**	**150**
No. of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Body Weight (Week 4) (g)[c]	406	-	-	-	-	-	0.83**	-
Body Weight Gain (Week 0-4) (g)[c]	165	-	-	-	-	-	0.60**	-
Food Consumption (Week 0-4) (g/day)[c]	109	-	-	-	-	-	0.83**	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[c]								
Hemoglobin (g/dL)	15.8	15.9	-	-	-	-	0.89**	0.94**
Hematocrit (%)	47.1	46.1	-	-	-	-	0.90**	0.93**
MCV (fL)	56.9	54.7	-	-	-	-	0.91**	0.95*
MCH (pg)	19.1	18.8	-	-	-	-	0.89**	0.97*
Lymphocytes (10^3/µL)	7.94	5.89	-	-	-	-	0.67	0.69*
Reticulocytes (10^3/µL)	173.4	145.7	-	-	-	-	1.72**	1.42**
Neutrophils (10^3/µL)	0.93	0.78	-	-	-	-	4.97**	3.01**
Monocytes (10^3/µL)	0.17	0.13	-	-	-	-	2.59**	1.77*
Serum Chemistry[c]								
ALT (U/L)	38	34	-	-	-	1.41*	2.32**	1.94**
Albumin (g/dL)	3.9	4.6	-	-	-	-	0.85**	0.89**
Total protein (g/dL)	6.2	6.8	-	-	-	-	0.84**	0.90**
Globulin (g/dL)	2.3	-	-	-	-	-	0.83**	-
AST (U/L)	90	-	-	-	-	-	1.29**	-
Potassium (non-adverse; mEq/L)	5.30	4.85	-	-	0.91	0.88**	0.89	0.86**
Triglycerides (non-adverse; mg/dL)	72	-	-	-	-	-	1.33*	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued)

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**2.5**		**40**		**300**	**150**
No. of Animals	M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Organ Weights[c]								
Thymus[d] (g)	0.6160	-	-	-	-	-	0.66**	-
Liver/body weight ratio (g/100 g)	3.211	3.202	-	-	-	-	1.20**	1.07*
Necropsy								
Enlarged mandibular lymph nodes	0	0	-	-	-	-	6	4
Histopathology								
Number of animals evaluated	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Lymphoid hyperplasia mandibular lymph node	0	0	-	-	1	-	6	5
Mild	0	0	-	-	1	-	5	3
Moderate	0	0	-	-	0	-	1	2
Lymphoid depletion spleen	0	0	-	-	-	-	9	7
Minimal	0	0	-	-	-	-	1	2
Mild	0	0	-	-	-	-	8	5
Single-cell necrosis in thymus (cortex)	0	0	-	-	-	-	5	2
Minimal	0	0	-	-	-	-	4	1
Mild	0	0	-	-	-	-	1	1
Hepatocellular necrosis (liver)	0	0	-	-	-	1	1	2
Minimal	0	0	-	-	-	0	1	2
Moderate	0	0	-	-	-	1[e]	0	0
Skin: exudate, epidermal surface	0	0	-	-	-	-	3	3
Mild	0	0	-	-	-	-	2	3
Moderate	0	0	-	-	-	-	1	0
Skin: necrosis, epidermal- minimal/mild	0	0	-	-	-	-	1	1
Skin: Abscess- Mild	-	0	-	-	-	-	-	2
Skin: inflammation acute/subacute-minimal/mild	0	0	-	-	-	-	2	2

(Continued)

2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**2.5**		**40**		**300**	**150**
Histopathology (Continued)								
Number of animals evaluated	M: 10	F: 10	M: 10	F: 0	M: 10	F: 0	M: 10	F: 10
Stomach, non-glandular								
Edema	0	-	-	NA	-	NA	2	-
Mild	0	-	-	NA	-	NA	1	-
Moderate	0	-	-	NA	-	NA	1	-
Hyperplasia, squamous- mild	0	-	-	NA	-	NA	2	-
Inflammation, acute- minimal	0	-	-	NA	-	NA	1	-
Inflammation, subacute- mild	0	-	-	NA	-	NA	2	-
Ulceration- mild	0	-	-	NA	-	NA	1	-
Recovery								
Number of animals evaluated	M: 5	F: 5	NA	NA	NA	NA	M: 4	F: 5
Liver/body weight ratio (g/100 g)	-	2.849	NA	NA	NA	NA	-	1.08*
Enlarged mandibular lymph nodes	0	0	NA	NA	NA	NA	1	1
Hepatocellular necrosis- minimal	0	-	NA	NA	NA	NA	1	-

[a] Clinical observations were performed twice daily (at the time of dosing and 1 h after dose administration). These data are tabulated above. In addition a detailed physical examination was performed once weekly. These data are not tabulated here (unless specifically mentioned) but can be found in the report.
[b] Observation (also) seen in dead animal
[c] At end of dosing period. For vehicle controls, group means are shown. For treated groups, multiples of vehicle control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the multiples of vehicle controls).
[d] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated.
[e] Multifocal and hemorrhagic from probable torsion of the median lobe (panlobular necrosis) and ischemia.

ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; NA = not applicable

- No noteworthy findings

Statistical analyses: body weight (change), food consumption, clinical pathology, and organ weights: Dunnett's test; gamma glutamyltransferase: Mann-Whitney U-test
* - $p<0.05$, ** - $p<0.01$

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley **Duration of Dosing:** 91 or 92 days (TK: 79 days) **Study No.:** [redacted]-068-R-PO-TX
Age at First Dose: 8 weeks **Duration of Postdose Recovery:** 42 days **Location in CTD:** 4.2.3.2.4
Date of First Dose: [redacted] **Route:** Oral gavage
Vehicle/Formulation: aqueous suspension containing 0.5% methylcellulose and 0.1% sodium lauryl sulfate **GLP Compliance:** Yes
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Toxicokinetics:								
No. of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
IBRUTINIB								
$AUC_{0\text{-last}}$ (µg.h/mL)								
Day 0	-	-	1.45	4.41	3.41	14.6	10.2	43.2
Day 78	-	-	2.48	19.7	5.51	20.7	21.7	51.5
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.55	1.56	0.63	3.05	0.99	5.26
Day 78	-	-	0.62	1.41	0.67	1.92	1.85	3.97
PCI-45227								
$AUC_{0\text{-last}}$ (µg.h/mL)								
Day 0	-	-	1.93	4.38	2.01	4.40	12.5	12.6
Day 78	-	-	1.54	12.8	3.70	6.87	17.5	13.1
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.50	1.01	0.44	0.64	1.28	1.50
Day 78	-	-	0.28	0.74	0.41	0.74	1.32	0.96
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	7[b]	1[b]
Clinical Observations (2x daily)[c]								
Thin body (detailed)	0	0	-	-	-	-	6	3
Soft feces								
At time of dosing	0	0	-	-	-	4	13	7
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	2	12	6

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Clinical Observations (2x daily)[c] (Continued)								
Partial closure of left eye								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	3	2
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	4	3
Partial closure of right eye								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	3	2
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	3	3
Wet clear material around mouth								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	3	6
2 h post-dosing	1	0	-	-	-	-	1	5
Dried red material around mouth								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	5	6
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	9	6
Dried red material around nose								
At time of dosing	9	0	-	11	-	18	14	20
2 h post-dosing	10	2	-	8	-	19	17	19
Scabbing facial area (detailed)	0	0	-	3	-	10	4	12
Scabbing dorsal neck (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	8
Scabbing dorsal trunk (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	10
Scabbing ventral neck (detailed)	1	0	-	-	-	-	2	8
Scabbing ventral trunk (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	7
Hair loss hindlimb(s) (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	2
Hair loss dorsal neck (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	2
Hair loss dorsal trunk (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	5
Hair loss ventral trunk (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	3
Hair loss urogenital area (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	2
Reddened facial area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	3	2	17
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	4	2	17

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Clinical Observations (2x daily)[c] (Continued)								
Dried brown material anogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	1	9	6
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	1	13	6
Wet brown material anogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	1	11	5
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	1	12	5
Dried yellow material anogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	2	4
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	2	5
Wet yellow material anogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	4	1
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	3	1
Dried brown material urogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	-	1	3
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	2	2
Wet brown material urogenital area								
At time of dosing	-	0	-	-	-	-	-	1
2 h post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	2
Dried yellow material urogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	0	6	6
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	3	5	6
Wet yellow material urogenital area								
At time of dosing	0	0	-	-	-	0	5	2
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	2	4	3
Dried red material forelimb(s)								
At time of dosing	0	0	-	-	-	4	4	1
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	7	5	9
Unkempt appearance								
At time of dosing	-	0	-	-	-	-	-	3
2 h post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	3

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Clinical Observations (2x daily)[c] (Continued)								
Dermal atonia (detailed)	-	0	-	-	-	-	-	1
Circling: 2 h post-dosing on SD 10	-	0	-	-	-	-	-	1
Body Weights (Week 12) (g)[d]	565	309	-	-	-	-	0.92	0.91**
Body Weight Gain (Week 0-12) (g)[d]	276	111	-	-	-	-	0.83**	0.76**
Food consumption (g/day)[d]								
Week 0 to 1	-	20	-	-	-	-	-	0.70**
Week 11 to 12	27	-	-	-	-	-	0.96	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[d,e]								
White blood cells (10^3/µL)	-	6.90	-	-	-	-	-	1.53**
MCV (fL)	-	53.0	-	-	-	-	-	0.95**
MCH (pg)	-	18.1	-	-	-	-	-	0.93**
MCHC (g/dL)	-	34.1	-	-	-	-	-	0.99*
Reticulocytes (10^3/µL)	147.6	129.1	-	-	-	1.25*	1.17*	1.38**
Reticulocytes (%)	1.6	1.5	-	-	-	1.27*	1.19	1.40**
Neutrophil (10^3/µL)	1.38	0.90	-	-	1.41*	-	1.43	5.11**
Monocyte (10^3/µL)	0.24	0.17	-	-	1.38	-	1.58*	3.12**
Large unstained cells (10^3/µL)	-	0.06	-	-	-	-	-	2.00
RDW (%)	-	11.5	-	-	-	1.04*	-	1.15**
HDW (g/dL)	-	2.27	-	-	-	-	-	1.07**
Serum Chemistry[d,e]								
Albumin (g/dL)	4.3	5.2	-	-	0.95*	0.88**	0.95*	0.83**
Total protein (g/dL)	6.8	7.5	-	-	0.96*	0.87**	0.94**	0.84**
Globulin (g/dL)	2.5	2.3	-	-	-	0.83**	0.92*	0.87**
Total bilirubin (mg/dL)	-	0.11	-	-	-	0.73*	-	0.64**
Urea nitrogen (mg/dL)	13.6	16.0	-	-	-	-	1.23**	1.23*
ALT (U/L)	39	-	-	-	1.23*	-	1.31**	-

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Serum Chemistry[d,e] (Continued)								
Glucose (mg/dL)	-	109	-	-	-	0.90*	-	0.91*
Calcium (mg/dL)	-	12.8	-	-	-	-	-	0.95*
Phosphorus (mg/dL)	-	6.1	-	-	-	-	-	1.13*
Triglyceride (mg/dL)	80	-	-	-	-	-	0.63*	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral Blood Immunophenotyping (Week 11)[d]								
Total B cells (%)	32.2	37.0	-	-	NA	NA	0.54**	0.26**
Total B cells (10^3/µL)	2.88	3.14	-	0.58*	NA	NA	0.45**	0.16**
Total T cells (%)	50.6	50.3	-	-	NA	NA	1.20*	1.28**
Helper T cells (%)	30.4	33.1	-	-	NA	NA	1.27**	1.30**
Natural Killer cells (%)	4.0	4.8	-	-	NA	NA	1.78*	1.67*
Cytotoxic T cells (%)	-	16.6	-	-	NA	NA	-	1.28*
Lymphocytes (10^3/µL)	8.87	8.26	-	0.81	NA	NA	0.89	0.57**
Organ Weights[d,f]								
Uterus (g)	NA	0.69	NA	-	NA	0.71**	NA	0.67**
Gross Pathology								
Number Examined	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 8	F: 14
Small thymus	-	0	-	-	-	-	-	1
Histopathology								
Number Examined	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 8	F: 14
Axillary lymph node: lymphoid depletion	0	0	-	-	-	-	1[e]	2
Minimal	0	0	-	-	-	-	1	0
Mild	0	0	-	-	-	-	0	1
Moderate	0	0	-	-	-	-	0	1

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Histopathology (Continued)								
Number Examined	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 8	F: 14
Mandibular lymph node: lymphoid depletion cortex	0	0	-	-	-	-	3[e]	9[e]
Minimal	0	0	-	-	-	-	1	3
Mild	0	0	-	-	-	-	2	6
Mesenteric lymph node: lymphoid depletion	-	0	-	-	-	-	-	6
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	4
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Moderate	-	0	-	-	-	-	-	1
Spleen: lymphoid depletion	0	0	-	-	2[e]	7[e]	3[e]	12
Minimal	0	0	-	-	2	7	2	3
Mild	0	0	-	-	0	0	1	8
Severe	0	0	-	-	0	0	0	1
Thymus: lymphoid depletion- severe	-	0	-	-	-	-	-	1
Nonglandular stomach:								
Atrophy of squamous epithelium	-	0	-	-	-	1[e]	-	3
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	1
Mild	-	0	-	-	-	0	-	1
Moderate	-	0	-	-	-	0	-	1
Edema	-	0	-	-	-	-	-	3
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Moderate	-	0	-	-	-	-	-	1
Hyperplasia of squamous epithelium	-	0	-	-	-	-	-	1
Mild	-	0	-	-	-	-	-	0
Moderate	-	0	-	-	-	-	-	1

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Histopathology (Continued)								
Number Examined	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 8	F: 14
Nonglandular stomach (Continued):								
Ulceration	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Cecum: acute inflammation	0	1	-	-	-	-	1[e]	4
Minimal	0	1	-	-	-	-	1	3
Mild	0	0	-	-	-	-	0	1
Colon: acute inflammation- minimal	-	0	-	-	-	-	-	2
Rectum: acute inflammation	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Rectum: ulceration	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Femur: decreased cortical and trabecular bone	-	0	-	-	-	2	-	2
Minimal	-	0	-	-	-	2	-	1
Mild	-	0	-	-	-	0	-	1
Sternum: decreased cortical and trabecular bone	0	0	-	-	-	2	1	5
Minimal	0	0	-	-	-	2	1	3
Mild	0	0	-	-	-	0	0	2
Pancreas: acinar atrophy	0	0	15[e]	5[e]	13	4[e]	8	1[e]
Minimal	0	0	13	3	6	3	3	1
Mild	0	0	2	2	6	1	1	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	4	0
Pancreas: decreased zymogen granules	-	0	-	-	-	-	-	1[e]
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Adrenal cortex: necrosis- minimal	0	0	-	-	2[e]	-	-	1[e]
Duodenum: dilatation, crypts: minimal	0	0	-	-	-	-	1[e]	2[e]

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	**300/175[a]**
No. of Animals	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Histopathology (Continued)								
Number Examined	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 8	F: 14
Esophagus: atrophy squamous epithelium	0	0	-	1[e]	3[e]	3[e]	1[e]	7[e]
Minimal	0	0	-	1	3	3	1	6
Mild	0	0	-	0	0	0	0	1
Pituitary: cytoplasmic vacuolation	1	-	9[e]	-	7[e]	-	8[e]	-
Minimal	1	-	8	-	7	-	8	-
Mild	0	-	1	-	0	-	0	-
Skin: atrophy of squamous epithelium	0	0	-	-	-	-	2[e]	1[e]
Minimal	0	0	-	-	-	-	2	1
Vagina: atrophy of squamous epithelium	NA	0	NA	-	NA	-	NA	1[e]
Mild	NA	0	NA	-	NA	-	NA	1
6-Week Recovery Period:								
Histopathology								
Number Examined	M: 5	F: 5	M: 0	F: 0	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Pancreas: acinar atrophy	0	0	NA	NA	4	1	4	1
Minimal	0	0	NA	NA	3	1	2	1
Mild	0	0	NA	NA	1	0	2	0
Pituitary: cytoplasmic vacuolation	1	-	NA	NA	3	-	2	-
Minimal	1	-	NA	NA	3	-	2	-

(Continued)

2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in rats with a 6-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

[a] From Day 0-7 females were administered 300 mg/kg/day; however, due to body weight loss, the dosage level for females was lowered to 175 mg/kg/day from Day 8 until the end of the dosing period.

[b] Test article-related clinical observations noted in the dead or euthanized animals included hypoactivity, dermal atonia, thin body, extremities and body pale and cool to the touch, rales, partial closure of eye(s), decreased defecation, soft feces, red material around the nose, clear and red material around the mouth, reddened and/or swollen facial area, brown and yellow material on the urogenital and/or anogenital areas, and/or red material on the forelimb(s). At necropsy the animals had a small thymus and spleen, pale brain, kidneys, pituitary and liver, distended stomach, cecum and jejunum, enlarged mandibular lymph node, lung not fully collapsed, red and brown matting of the skin, dark red areas of the stomach and thick gray contents of the stomach. Histologically widespread lymphoid depletion, bone marrow depletion, decreased trabecular and cortical bone, acute inflammation of intestines, dilatation of intestinal crypts and glands, atrophy of squamous epithelium, hemorrhage in the glandular stomach, cytoplasmic vacuolation of pituitary, acinar atrophy of pancreas and decreased zymogen granules in the pancreas were observed in the males. The cause of death for 2 of the males found dead was acute inflammation and ulceration of the intestinal tract; the cause of death was undetermined for the remaining toxicology animals with unscheduled deaths.

[c] Clinical observations were performed twice daily (at the time of dosing and 2 h after dose administration). These data are tabulated above. In addition a detailed physical examination was performed once weekly. These data are not tabulated here (unless specifically mentioned) but can be found in the report.

[d] At end of dosing period (or specific weeks indicated). For vehicle controls, group means are shown. For treated groups, multiples of vehicle control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the multiples of vehicle controls).

[e] Changes are test article-related but not considered adverse

[f] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates multiple of control for the absolute organ weights.

ALT = alanine aminotransferase; HDW = hemoglobin distribution width; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; NA = not applicable; RDW = red blood cell distribution width; SD = Study Day; TK = toxicokinetics

- No noteworthy findings

Statistical analyses: body weight (change), food consumption, clinical pathology, immunophenotyping and organ weights: Dunnett's test; gamma glutamyltransferase: Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA and Dunn's test
* - $p<0.05$, ** - $p<0.01$

2.6.7.7 C 反復投与毒性試験

Report Title: A 28-day study oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Dog/Beagle **Duration of Dosing:** 28 or 29 days **Study No.:** [redacted]-018-D-PO-TX
Age at First Dose: 6.5 to 11 months **Duration of Postdose Recovery:** 29 days **Location in CTD:** 4.2.3.2.8
Date of First Dose: [redacted] **Route:** Oral gavage
Vehicle/Formulation: aqueous suspension containing 0.5% methylcellulose, 0.4% Cremophor EL and 0.1% sodium lauryl sulfate **GLP Compliance:** Yes
No Observed Adverse Effect Level: 1.5 mg/kg/day

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**24**		**150**	
No. of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Toxicokinetics:								
No. of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
AUC (µg·h/mL)								
Day 0 $_{(0-\infty)}$	-	-	0.0056	0.0099	1.78	1.99	2.06	4.80
Day 24 $_{(0-24h)}$	-	-	0.019	0.021	1.54	1.85	14.1	15.2
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.0035	0.0056	0.95	0.86	0.75	1.71
Day 24	-	-	0.010	0.012	0.68	0.91	1.48	2.18
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations (2x daily)[a]								
Diarrhea								
Time of dosing	1	1	-	-	-	-	3	4
2 h post-dosing	0	1	-	-	-	-	2	4
Pale feces								
Time of dosing	0	0	-	-	-	-	5	4
2 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	4	3
Soft feces								
Time of dosing	4	2	-	-	-	-	5	4
2 h post-dosing	3	0	-	-	-	-	4	3

(Continued)

2.6.7.7 C 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day study oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**24**		**150**	
No. of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Body Weight Gain (Week 0-1) (kg)	0.1	0.1	-	-	-	-	-0.1	-0.2*
Body Weight Gain (Week 0-4) (kg)	0.5	0.2	-	-	-	-	0.2	0.1
Food Consumption (Week 0-1) (g/day)[b]	-	261	-	-	-	-	-	0.85
Hematology and coagulation[b]								
Day 14:								
Eosinophils (10^3/µL)	-	0.28	-	-	-	0.36*	-	0.29**
Leukocytes (10^3/µL)	-	10.30	-	-	-	-	-	1.40
Neutrophils (10^3/µL)	-	6.63	-	-	-	-	-	1.63
Monocytes (10^3/µL)	-	0.59	-	-	-	-	-	1.49
Basophils (10^3/µL)	0.04	0.05	-	-	-	-	0.50	0.40*
Day 25:								
Eosinophils (10^3/µL)	-	0.25	-	-	-	0.56	-	0.40
Leukocytes (10^3/µL)	-	9.02	-	-	-	-	-	1.36
Neutrophils (10^3/µL)	-	5.38	-	-	-	-	-	1.69
Monocytes (10^3/µL)	-	0.47	-	-	-	-	-	1.45
Basophils (10^3/µL)	0.03	0.02	-	-	-	-	0.67	0.50
Lymphocytes (10^3/µL)	2.58	2.83	-	-	-	-	0.88	0.82
Serum Chemistry[b]								
Day 14:								
Albumin (g/dL)	3.4	3.5	-	-	-	-	0.82*	0.63**
Total protein (g/dL)	5.8	5.8	-	-	-	-	0.86	0.74**
Albumin/globulin	1.50	1.55	-	-	-	-	0.81	0.70*
Day 25:								
Albumin (g/dL)	3.3	3.4	-	-	-	-	0.79*	0.62**
Total protein (g/dL)	5.7	5.9	-	-	-	-	0.89	0.76**
Albumin/globulin	1.43	1.44	-	-	-	-	0.74**	0.65*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued)

2.6.7.7 C 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day study oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**24**		**150**	
No. of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Ophthalmology								
Corneal dystrophy								
Day 23 (Unilateral/bilateral)	0/0	0/0	-	-	-	-	1/0	0/1
Day 27 (Unilateral/bilateral)	0/0	0/0	-	-	-	-	2/0	0/1
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number of animals evaluated	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Cecum: chronic inflammation	0	-	-	-	-	-	1	-
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Colon: chronic inflammation	0	-	-	-	-	-	1	-
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-
Ileum: villous atrophy	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Rectum: acute/chronic inflammation	0	0	-	-	-	-	1	1
Minimal	0	0	-	-	-	-	1	1
Kidney: infarct	-	0	-	-	-	1	-	2
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	2
29 days Recovery								
No. of Animals	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2
Body Weight Gain (kg)[b]	0.2	0.2	NA	NA	NA	NA	3.0	3.5
Serum Chemistry[b]								
Albumin/globulin	1.65	1.88	NA	NA	NA	NA	0.82	0.73
Ophthalmology								
Corneal dystrophy								
Day 51 (Unilateral/bilateral)	0/0	0/0	NA	NA	NA	NA	2/0	1/0

(Continued)

2.6.7.7 C 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 28-day study oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 28-day recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1.5**		**24**		**150**	
29 days Recovery (Continued)								
Number of animals evaluated	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2
Histopathology								
Ileum: acute inflammation	0	-	NA	NA	NA	NA	1	-
Minimal	0	-	NA	NA	NA	NA	1	-

[a] Clinical observations were performed twice daily (at the time of dosing and 2 h after dose administration). These data are tabulated above. In addition a detailed physical examination was performed once weekly. These data are not tabulated here (unless specifically mentioned) but can be found in the report.

[b] For vehicle controls, group means are shown. For treated groups, multiples of vehicle control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the multiples of vehicle controls).

ECG = electrocardiogram; F = female; M = male; NA = not applicable

- No noteworthy findings

Statistical analyses: body weight (change), food consumption, ECG measurements, clinical pathology, and organ weights: Dunnett's test
* - $p<0.05$, ** - $p<0.01$

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Dog/Beagle **Duration of Dosing:** up to 92 days **Study No.:** [redacted]-069-D-PO-TX
Age at First Dose: approximately 5-6 months **Duration of Postdose Recovery:** 91 days **Location in CTD:** 4.2.3.2.9
Date of First Dose: [redacted] **Route:** Oral gavage
Vehicle/Formulation: aqueous suspension containing 0.5% methylcellulose and 0.1% sodium lauryl sulfate **GLP Compliance:** Yes
No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Toxicokinetics:								
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
IBRUTINIB								
AUC_{last} (µg·h/mL)								
Day 0	-	-	0.26	0.26	1.59	2.11	1.29	0.92
Day 37	-	-	0.31	0.52	1.06	5.81	17.7	5.04
Day 78	-	-	0.38	1.68	3.41	2.21	12.2	6.63
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.15	0.14	0.62	0.54	0.54	0.44
Day 37	-	-	0.087	0.27	0.25	1.19	2.14	1.00
Day 78	-	-	0.15	0.45	1.12	0.84	1.86	1.04
PCI-45227								
AUC_{last} (µg·h/mL)								
Day 0	-	-	0.22	0.22	1.12	1.30	0.78	0.47
Day 37	-	-	0.29	0.29	0.76	3.12	4.55	1.86
Day 78	-	-	0.12	0.35	0.77	0.35	1.49	1.13
C_{max} (µg/mL)								
Day 0	-	-	0.075	0.071	0.17	0.20	0.17	0.14
Day 37	-	-	0.051	0.093	0.11	0.37	0.41	0.25
Day 78	-	-	0.034	0.068	0.12	0.10	0.16	0.13

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1[c]	0	1[c]	0
Clinical Observations (2x daily)[d]								
Continuous tremors								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
Intermittent convulsions								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Hypoactivity								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Decreased activity								
1 h post-dosing	0	0	-	-	-	-	2	1
Hunched posture								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Rigid muscle tone								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Impaired muscle coordination								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Partial closure of right eye								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Impaired use of left forelimb								
Prior to dosing	-	0	-	-	-	1	-	-
1 h post-dosing	-	0	-	-	-	1	-	-
Impaired use of right forelimb								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Impaired use of right hindlimb								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Clinical Observations (2x daily; continued)[d]								
Prostrate (detailed)[e]	0	-	-	-	1	-	-	-
Thin								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Non-dosing days[f]	0	0	-	-	1	-	2	1
Body cool to touch (detailed)[e]	0	-	-	-	1	-	1	-
Dermal atonia								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	2	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Non-dosing days[f]	0	0	-	-	1	-	2	1
Swollen facial area								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Red nasal discharge (detailed)[e]	0	-	-	-	1	-	-	-
Red material around nose (detailed)[e]	0	-	-	-	-	-	1	-
Red material around mouth (detailed)[e]	0	-	-	-	1	-	1	-
Clear material around mouth								
Prior to dosing	0	0	-	-	2	-	4	3
1 h post-dosing	0	0	-	-	3	1	4	3
Non-dosing days[f]	0	0	-	-	1	-	1	1
White frothy material around mouth								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Emesis containing food								
Prior to dosing	4	2	-	-	3	2	4	3
1 h post-dosing	0	0	-	-	1	-	2	4
Non-dosing days[f]	0	-	-	-	-	-	1	-
Emesis containing white material								
Prior to dosing	4	3	-	-	-	-	1	2
1 h post-dosing	1	3	3	0	4	2	2	4
Non-dosing days[f]	0	-	-	-	-	-	1	-

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Clinical Observations (2x daily; continued)[d]								
Emesis containing yellow material								
Prior to dosing	1	0	0	1	1	2	1	1
1 h post-dosing	1	-	-	-	1	-	1	-
Reddened gums								
Prior to dosing	0	0	-	-	1	1	2	5
1 h post-dosing	0	0	-	-	1	2	3	5
Gums pale								
1 h post-dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Non-dosing days[f]	0	-	-	-	1	-	-	-
Raised reddened area(s) on gums								
Prior to dosing	-	0	-	-	-	-	-	1
1 hour post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	1
Non-dosing days[f]	0	-	-	-	-	-	1	-
Raised white area(s) on gums								
Prior to dosing	-	0	-	-	-	-	-	2
1 hour post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	2
Red material on gums								
Unscheduled observations (0-45 minutes)	0	-	-	-	-	-	1	-
Soft feces								
Prior to dosing	6	5	3	3	6	5	6	6
1 hour post-dosing	1	3	3	2	5	5	5	5
Non-dosing days[f]	-	0	-	-	-	-	-	1
Mucoid feces								
Prior to dosing	0	1	-	1	1	4	2	3
1 hour post-dosing	0	1	-	1	1	2	2	-
Non-dosing days[f]	-	0	-	-	-	-	-	1
Red mucoid feces								
Prior to dosing	0	0	-	-	1	1	-	1
1 hour post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	1

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Clinical Observations (2x daily; continued)[d]								
Yellow mucoid feces								
Prior to dosing	0	0	-	-	-	-	1	1
Non-dosing days[f]	-	0	-	-	-	-	-	1
Feces containing white material								
Prior to dosing	0	0	-	-	-	-	2	5
1 hour post-dosing	-	0	-	-	-	-	-	1
Feces containing red material								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Diarrhea								
Prior to dosing	1	2	0	1	1	5	5	5
1 hour post-dosing	1	0	-	-	1	4	3	2
Non-dosing days[f]	0	-	-	-	1	-	2	-
Diarrhea containing red material								
Prior to dosing	0	-	-	-	-	-	1	-
Body Weight (kg) (Week 6)[g]	10.4	8.8	0.97	0.98	0.98	0.95	0.91	0.93
Body Weight (kg) (Week 13)[g]	11.2	9.2	0.96	0.96	0.96	0.99	0.90	0.93
Body Weight Gain (kg) (Week 0-6)	1.0	0.8	0.9	0.8	0.6	0.5	-0.1*	0.3
Body Weight Gain (kg) (Week 0-13)	1.7	1.3	1.6	1.1	1.2	1.1	0.5**	0.6
Food Consumption (g/day)[g]								
Week 12 to 13	333	298	0.90	0.78	0.86	0.87	0.78	0.72*

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Hematology and Coagulation[g]								
Week 5:								
Red blood cell count (10^6/µL)	6.46	6.33	-	-	-	-	0.82**	0.92*
Hemoglobin (g/dL)	15.0	14.9	-	-	-	-	0.82**	0.91*
Hematocrit (%)	42.4	42.2	-	-	-	-	0.82**	0.92*
Red blood cell distribution width (%)	12.4	12.7	-	-	1.09**	-	1.13**	1.06*
Hemoglobin distribution width (g/dL)	1.70	1.67	-	-	1.06*	-	1.11**	1.08
Monocytes (%)	-	5.3	-	-	-	-	-	1.89*
Monocytes (10^3/µL)	-	0.56	-	-	-	-	-	2.43
Platelets (10^3/µL)	-	318	-	-	-	-	-	1.43*
APTT (sec)	-	10.5	-	-	-	-	-	1.13*
Week 12:								
Red blood cell count (10^6/µL)	6.62	6.38	-	-	-	-	0.85	0.93
Hemoglobin (g/dL)	14.8	14.5	-	-	-	-	0.86	0.92
Hematocrit (%)	44.1	43.2	-	-	-	-	0.89	0.94
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)	33.5	33.5	-	-	-	0.99*	0.98**	0.99*
Red blood cell distribution width (%)	12.7	12.9	-	-	1.06	-	1.09**	1.04
Hemoglobin distribution width (g/dL)	1.59	1.57	-	-	1.09	-	1.16*	1.09*
Neutrophils (%)	57.5	-	-	-	-	-	1.24**	-
Neutrophils (10^3/µL)	5.75	-	-	-	-	-	1.44	-
Lymphocytes (%)	33.4	-	-	-	-	-	0.59**	-
Lymphocytes (10^3/µL)	3.34	-	-	-	-	-	0.65	-
Monocytes (%)	-	4.2	-	-	-	-	-	1.38
Monocytes (10^3/µL)	-	0.46	-	-	-	-	-	2.02*
Platelets (10^3/µL)	-	350	-	-	-	-	-	1.55**
APTT (sec)	-	10.4	-	-	-	1.09*	-	1.13**

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Serum Chemistry[g]								
Week 5:								
Albumin (g/dL)	3.4	3.5	-	-	0.85**	0.80**	0.71**	0.74**
Globulin (g/dL)	-	2.0	-	-	-	1.35**	-	1.45**
Albumin/globulin ratio	1.48	1.78	-	-	0.75*	0.61**	0.56**	0.51**
ALT (U/L)	40	37	-	-	-	0.65**	0.53**	0.65**
GGT (U/L)	2.8	2.7	-	-	0.46**	0.37**	0.50**	0.48**
Glucose (mg/dL)	105	-	-	-	-	-	0.85**	-
Week 12:								
Albumin (g/dL)	3.4	3.4	-	-	0.85**	0.88	0.79**	0.76**
Globulin (g/dL)	-	2.0	-	-	-	1.25	-	1.50**
Albumin/globulin ratio	1.45	1.77	-	-	0.76*	0.71**	0.72**	0.50**
ALT (U/L)	42	-	-	-	-	-	0.55**	-
GGT (U/L)	1.8	1.8	-	0.11*	0.39	0.22**	0.44	0.33*
Glucose (mg/dL)	98	97	-	-	-	-	0.87**	0.90
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG[g]								
Week 12:								
RR Interval (ms)	519	-	-	-	1.32*	-	1.56**	-
QT Interval (ms)	199	-	-	-	1.09*	-	1.13**	-
PR Interval (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-
QRS Interval (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-
QTc (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology								
Corneal Dystrophy (bilateral)								
Week 12	0	0	-	-	-	-	1	0
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy								
Cecum: dark red area(s)	-	0	-	-	-	-	-	1
Ileum: dark red area(s)	-	0	-	-	-	-	-	1

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose During Dosing Period (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**30**		**80/60[a]**		**220/120[b]**	
No. of Animals	M: 6	F: 6	M: 3	F: 3	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Histopathology								
Number of animals evaluated	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Cecum: acute inflammation	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Duodenum: glandular dilatation	-	0	-	-	-	3	-	2
Minimal	-	0	-	-	-	3	-	2
Ileum: acute inflammation	-	0	-	-	-	-	-	1
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Peyer's patches: lymphoid depletion	0	0	-	-	1	1	2	3
Minimal	0	0	-	-	1	1	1	3
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Stomach: muscle degeneration	-	0	-	-	-	-	-	3
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	2
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
13 Week Recovery								
Body Weight Gain (kg)- Week 13-26	0.3	0.6	NA	NA	0.8	0.9	1.5	1.2
Food Consumption (g/day)[g]								
Week 25 to 26	355	249	NA	NA	0.93	0.92	1.11	1.13
Ophthalmology								
Corneal Dystrophy (bilateral)	0	-	-	-	-	-	1	-

(Continued)

2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: A 13-week oral (gavage) toxicity study of PCI-32765 in beagle dogs with a 13-week recovery period **Test Article:** Ibrutinib

[a] Animals were administered 80 mg/kg/day from Day 0-41 and 60 mg/kg/day from Day 42 until the end of the dosing period.
[b] Animals were administered 220 mg/kg/day from Day 0-41 and 120 mg/kg/day from Day 42 until the end of the dosing period.
[c] Sacrificed on Day 31, after showing signs of hypoactivity, thin body condition, dermal atonia, prostrate, body cool to touch, red nasal discharge, red material around nose and/or mouth, and/or diarrhea. In addition, the 220 mg/kg/day male had a swollen facial area, reddened gums, and raised reddened area(s) on the gums. Cause of moribundity of the 80 mg/kg/day male, acute lung inflammation and bacterial colonization, was not considered test article-related; cause of moribundity of 220 mg/kg/day male was considered test article-related enterocolitis.
[d] Clinical observations were performed twice daily (prior to dose and 1 h after dose administration). These data are tabulated above. In addition, a detailed physical examination was performed approximately once weekly. These data are not tabulated here (unless specifically mentioned) but can be found in the report.
[e] Observation only seen in moribund animal.
[f] One male in the mid dose group and 3 males and 1 female in the high dose group were not dosed for 1 to 12 days during the course of the study, to recover from their deteriorating condition.
[g] At end of dosing or recovery period (or specific weeks indicated). For vehicle controls, group means are shown. For treated groups, multiples of vehicle control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the multiples of vehicle controls).

ALT = alanine aminotransferase; APTT = activated partial thromboplastin time; ECG = electrocardiogram; F = female; GGT = gamma-glutamyltransferase; M = male; ms = milliseconds; NA = not applicable

- No noteworthy findings

Statistical analysis: body weight (change), food consumption, ECG measurements, clinical pathology, and organ weights: Dunnett's test
* - $p<0.05$, ** - $p<0.01$

2.6.7.8 A *In Vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay

Test Article: Ibrutinib

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Strains: *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 and *E. coli* strain WP2 *uvr*A
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9, 10%
Treatment: In Vitro/Plate incorporation method
Cytotoxic Effects: No appreciable cytotoxicity was observed
Genotoxic Effects: None

No. of Independent Assays: 2
No. of Replicates: 2 or 3
Approximate No. of Bacteria Assayed/Dose: 0.7 to 1.7 x10^8
Vehicles:
For Test Article: DMSO
For Positive Controls: DMSO or water

Study No: [redacted]-027-Sal-X-MU
Location in CTD: 4.2.3.3.1.1
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]

Metabolic Activation	Test or Control Article	Concentration Level (µg/plate)	Assay #1 (Plate Incorporation; Preliminary) Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA
Without Activation	DMSO	0	16 ± 2	166 ± 11	15 ± 1	10 ± 6	23 ± 11
	Ibrutinib	1.5	15 ± 4	136 ± 4	18 ± 1	6 ± 1	17 ± 3
		5.0	16 ± 2	120 ± 6	16 ± 1	7 ± 1	16 ± 6
		15	13 ± 1	163 ± 19	15 ± 1	10 ± 1	17 ± 4
		50	16 ± 1	136 ± 5	17 ± 1	7 ± 5	16 ± 4
		150	14 ± 1	142 ± 16	16 ± 1	9 ± 4	20 ± 1
		500	14 ± 1	154 ± 15	11 ± 1	7 ± 1	16 ± 2
		1500	12 ± 2	120 ± 5	16 ± 0	5 ± 2	11 ± 6
		5000	15 ± 1	131 ± 16	15 ± 3	4 ± 0	14 ± 1
	2-Nitrofluorene[a]	1.0	206 ± 8	-	-	-	-
	Sodium azide[a]	1.0	-	638 ± 45	440 ± 75	-	-
	9-Aminoacridine[a]	75	-	-	-	1058 ± 83	-
	Methyl methanesulfonate[a]	1000	-	-	-	-	177 ± 3

(Continued)

2.6.7.8 A *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay **Test Article:** Ibrutinib

Metabolic Activation	Test or Control Article	Concentration Level (μg/plate)	Assay #1 (Plate Incorporation; Preliminary) Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA
With Activation	DMSO	0	19 ± 2	148 ± 22	11 ± 5	8 ± 1	19 ± 2
	Ibrutinib	1.5	16 ± 0	148 ± 1	11 ± 4	5 ± 0	17 ± 1
		5.0	16 ± 4	124 ± 2	13 ± 4	7 ± 1	19 ± 1
		15	19 ± 1	163 ± 16	16 ± 2	5 ± 0	15 ± 4
		50	17 ± 4	127 ± 11	12 ± 3	6 ± 2	16 ± 5
		150	18 ± 2	105 ± --[b]	11 ± 1	11 ± 1	18 ± 0
		500	18 ± 1	146 ± 7	15 ± 1	10 ± 1	20 ± 6
		1500	17 ± 4	114 ± 27	15 ± 4	5 ± 0	13 ± 1
		5000	15 ± 0	130 ± 6	15 ± 4	4 ± 1	14 ± 1
	2-Aminoanthracene[a]	1.0	761 ± 101	792 ± 105	141 ± 15	76 ± 8	-
	2-Aminoanthracene[a]	10	-	-	-	-	314 ± 7

(Continued)

2.6.7.8 A *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay **Test Article:** Ibrutinib

Metabolic Activation	Test or Control Article	Concentration Level (µg/plate)	Assay # 2 (Plate Incorporation; [Confirmatory] Mutagenicity Assay) Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA
Without Activation	DMSO	0	16 ± 1	106 ± 8	12 ± 2	8 ± 3	15 ± 3
	Ibrutinib	50	10 ± 2	119 ± 5	12 ± 5	7 ± 0	16 ± 4
		150	14 ± 2	115 ± 8	16 ± 5	7 ± 1	17 ± 7
		500	13 ± 2	114 ± 19	13 ± 2	7 ± 2	14 ± 5
		1500	9 ± 5	110 ± 8	14 ± 3	5 ± 2	16 ± 4
		5000	5 ± 2	98 ± 6	10 ± 5	3 ± 1	12 ± 1
	2-Nitrofluoren[a]	1.0	218 ± 25	-	-	-	-
	Sodium azide[a]	1.0	-	694 ± 38	670 ± 22	-	-
	9-Aminoacridine[a]	75	-	-	-	905 ± 110	-
	Methyl methanesulfonate[a]	1000	-	-	-	-	233 ± 3

(Continued)

2.6.7.8 A *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay **Test Article:** Ibrutinib

Metabolic Activation	Test or Control Article	Concentration Level (µg/plate)	Assay # 2 + 3 (Plate Incorporation; [Confirmatory] Mutagenicity Assay) Revertant Colony Counts (Mean ± SD)					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA	TA1537[c]
With Activation	DMSO	0	21 ± 8	131 ± 16	18 ± 1	11 ± 7	22 ± 7	6 ± 3
	Ibrutinib	5.0	-	-	-	-	-	10 ± 2
		15	-	-	-	-	-	7 ± 3
		50	22 ± 1	139 ± 13	12 ± 5	8 ± 2	21 ± 5	6 ± 4
		150	15 ± 1	138 ± 19	11 ± 5	8 ± 2	29 ± 4	10 ± 3
		500	21 ± 5	118 ± 7	12 ± 2	4 ± 3	16 ± 6	11 ± 2
		1500	10 ± 4	115 ± 7	12 ± 1	5 ± 3	13 ± 5	8 ± 3
		5000	8 ± 2	114 ± 3	9 ± 1	4 ± 1	10 ± 2	5 ± 3
	2-Aminoanthracene[a]	1.0	676 ± 73	948 ± 27	136 ± 27	91 ± 19	-	196 ± 25
	2-Aminoanthracene[a]	10	-	-	-	-	211 ± 38	-

[a] Positive control
[b] Based on one plate; plate lost due to water damage
[c] Confirmatory assay with TA1537 with activation due to a decrease in revertant counts observed beginning at 500 µg/plate in the presence of S9-mix with TA1537 in the first mutagenicity assay

DMSO = dimethylsulfoxide; *E.* = *Escherichia*; *S.* = *Salmonella*; SD = standard deviation; - = not applicable

2.6.7.8 B *In Vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test **Test Article:** Ibrutinib

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Cell Line: CHO cells
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9, 2%
Vehicle:
For Test Article: DMSO
For Positive Controls: Sterile distilled water
No. of Independent Assays: 1
No. of Replicate Cultures: 2
No. of Cells Analyzed/Cultured: 100
Study No: [redacted]-038-CHO-X-MU
Location in CTD: 4.2.3.3.1.2
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]

Treatment: Lot [redacted] (micronized)[a]: without S9 for 4 and 20 h
Lot [redacted] (micronized) and [redacted][a]: with S9 for 4 h

Cytotoxic effects: Cytotoxicity was observed at 12.5 to 40 µg/mL.

Genotoxic effects: Ibrutinib lot [redacted] (micronized) was positive for induction of structural chromosome aberrations in the presence and absence of metabolic activation and negative for induction of numerical chromosome aberrations in the presence and absence of metabolic activation.
Clinical grade Ibrutinib lot [redacted] was negative for induction of structural and numerical chromosome aberrations in the presence of metabolic activation.

Metabolic Activation	Duration of Exposure (Treatment Time)	Test/Control Article	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity[b] (% of control)	Cells with Structural Abs (%)	Aberrations per Cell (Mean)	Cells with Numerical Abs (%)
Without Activation	4 h	DMSO	0	–	1.0	0.010	2.0
Lot [redacted]		Ibrutinib	25	-22	3.5	0.080	3.0
(micronized)			32.5	-17	5.5**	0.055	2.5
			37.5	52	8.5**	0.100	3.5
		Mitomycin C[c]	0.2	-15	18.0**	0.260	0.0
With Activation	4 h	DMSO	0	–	0.5	0.005	2.0
Lot [redacted]		Ibrutinib	10	87	4.0*	0.060	2.5
(micronized)			37.5	55	11.0**	0.125	4.0
		Cyclophosphamide[c]	10	-1	19.0**	0.270	0.0
Without Activation	20 h	DMSO	0	–	0.0	0.000	1.5
Lot [redacted]		Ibrutinib	5	44	1.5	0.015	0.5
(micronized)			10	52	4.0**	0.090	2.0
			12.5	51	7.0**	0.075	1.0
		Mitomycin C[c]	0.1	50	17.0**	0.270	0.0

(Continued)

2.6.7.8 B *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test **Test Article:** Ibrutinib

Metabolic Activation	Duration of Exposure (Treatment Time)	Test/Control Article	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity[b] (% of control)	Cells with Structural Abs (%)	Aberrations per Cell (Mean)	Cells with Numerical Abs (%)
With Activation	4 h	DMSO	0	–	0.5	0.005	0.0
Lot [redacted]		Ibrutinib	10	9	0.0	0.000	0.5
			20	14	0.5	0.010	0.5
			40	58	1.0	0.010	1.5
		Cyclophosphamide[c]	10	43	21.0**	0.300	0.0

[a] Lot [redacted] (micronized) is a non-GMP batch with 97.3% purity. Lot [redacted] is a GMP batch with 99.7% purity.
[b] Cell growth inhibition
[c] Positive control

Abs = aberrations; CHO = Chinese hamster ovary; DMSO = dimethylsulfoxide

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Fisher's Exact test

2.6.7.8 C *In Vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test **Test Article:** Ibrutinib

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Cell Line: CHO cells
Metabolizing System: NA
Vehicle:
For Test Article: DMSO
For Positive Controls: Sterile distilled water
Treatment: Lot [redacted][a]: without S9 for 4 and 20 h
No. of Independent Assays: 1
No. of Replicate Cultures: 2
No. of Cells Analyzed/Cultured: 100
Study No: [redacted]-071-CHO-X-MU
Location in CTD: 4.2.3.3.1.3
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]

Cytotoxic effects: Cytotoxicity was observed at 37.5 µg/mL with 4 h exposure and at 20 µg/mL with 20 h exposure.
Genotoxic effects: Clinical grade Ibrutinib lot [redacted] was negative for induction of structural and numerical aberrations in the absence of metabolic activation. At concentrations of 5 to 37.5 µg/mL, a statistically significantly higher number of cells with structural aberrations was observed but not considered biologically significant because data were within the historical control range.

Metabolic Activation	Duration of Exposure (Treatment Time)	Test/Control Article	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity[b] (% of control)	Cells with Structural Abs (%)	Aberrations per Cell (Mean)	Cells with Numerical Abs (%)
Without Activation	4 h	DMSO	0	–	0.0	0.000	0.5
Lot no. [redacted]		Ibrutinib	10	7	1.0	0.010	4.0*[c]
			20	7	3.5**[c]	0.045	4.0*[c]
			37.5	50	3.5**[c]	0.045	3.5*[c]
		Mitomycin C[d]	0.2	27	20.0**	0.240	1.0
Without Activation	20 h	DMSO	0	–	0.0	0.000	2.0
Lot no. [redacted]		Ibrutinib	5	24	2.5*[c]	0.030	3.5
			10	30	3.5**[c]	0.035	3.0
			20	58	3.5**[c]	0.040	3.5
		Mitomycin C[d]	0.1	48	24.0**	0.240	2.0

[a] Lot [redacted] is a GMP batch with 99.7% purity.
[b] Cell growth inhibition
[c] Results within historical control range; not considered biologically significant
[d] Positive control

Abs = aberrations; CHO = Chinese hamster ovary; DMSO = dimethylsulfoxide; NA = not applicable

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Fisher's Exact test

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

Report Title: Mouse Bone Marrow Erythrocyte Micronucleus Test Following Oral Administration of PCI-32765 **Test Article:** Ibrutinib

Test for Induction of: Micronuclei in bone marrow
Species/Strain: Male Mice/ICR
Age/Weight: 6 to 8 weeks/29.7-35.5 g
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes of bone marrow
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000
Treatment Schedule: Single dose
Sample Time: 24 and 48 h postdose
Method of Administration: Oral gavage
Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose, 0.4% Cremophor EL and 0.1% sodium lauryl sulfate
Positive Control: cyclophosphamide monohydrate
Study No: [redacted]-037-M-PO-MU
Location in CTD: 4.2.3.3.2.1
GLP Compliance: Yes
Date of Dosing: [redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: No mortality and no clinical observations/Ibrutinib was not toxic to bone marrow
Genotoxic Effects: None
Evidence of Exposure: Maximum plasma concentrations were 2.30, 4.90 and 7.98 µg/mL for the 500, 1000, and 2000 mg/kg dose levels, respectively. Plasma samples were collected at 1 hr and 4 hrs post dose for the test article groups. Maximum plasma concentrations were observed at 4 hrs post dose for the 1000 and 2000 mg/kg dose levels. At the 500 mg/kg dose level, the plasma concentrations were similar at 1 and 4 hrs post dose.

		24 h post dose			48 h post dose		
Test Article	**Dose (mg/kg)**	**Number of Animals**	**PCE/RBC (Mean ± SD)**	**MN-PCEs/1000 PCE (Mean ± SD)**	**Number of Animals**	**PCE/RBC (Mean ± SD)**	**MN-PCEs/1000 PCE (Mean ± SD)**
Vehicle	0	5	0.485 ± 0.05	0.2 ± 0.3	5	0.550 ± 0.03	0.3 ± 0.45
Ibrutinib	500	5	0.477 ± 0.03	0.1 ± 0.2	0	–	–
	1000	5	0.438 ± 0.05	0.1 ± 0.2	0	–	–
	2000	5	0.451 ± 0.09	0.0 ± 0.0	5	0.440 ± 0.17	0.3 ± 0.45
Cyclophosphamide	50	5	0.362 ± 0.05	18.1 ± 4.5[a]	0	–	–

[a] Statistically different from vehicle control ($p \leq 0.05$) by Kastenbaum-Bowman Tables.

MN-PCEs = micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE = polychromatic erythrocyte; PCE/RBC = polychromatic erythrocyte/red blood cell ratio; SD = standard deviation

2.6.7.10　がん原性試験

Test Article: Ibrutinib

No carcinogenicity studies have been conducted.

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Dose (mg/kg/day)	Noteworthy Findings: Pregnant Dams	Noteworthy Findings: Fetuses	Study No./ Location in CTD
Rat/Sprague-Dawley 8F/Grp 6F/Grp for TK at 20 and 200 mg/kg	PO, gavage (0.5% MC, 0.1% SLS)	G 6-17	0, 20, 60, 200	20 mg/kg: Clinical signs: soft stool 60 mg/kg: ↓BW, ↓BWG, ↓FC; Clinical signs: soft stool 200 mg/kg: 3/8 euthanized *in extremis* due to ↓BW of 50-61 g. 8/8 ↓BW; ↓BWG; ↓FC; 100% early resorptions; Clinical signs: soft stool, mucoid feces, brown material on anogenital area or base of tail, dark red vaginal discharge, cool limbs. Exposure at 20 mg/kg G17: $AUC_{0\text{-}24h}$=3980 ng·h/mL; C_{max}=1530 ng/mL	60 mg/kg: ↓BW; ↓gravid uterine wt 200 mg/kg: No surviving fetuses (100% resorptions); ↓gravid uterine wt. Note: no external malformations or developmental variations were noted in fetuses at 20 or 60 mg/kg.	[redacted]-063-R-PO-TTE (non-GLP) 4.2.3.5.2.1
Rabbit/New Zealand White 6F/Grp	PO, gavage (0.5% MC, 0.1% SLS)	G 7-19	0, 10, 30, 100	30 mg/kg: ↓BW, ↓FC Clinical signs: 3/6 ↓defecation 100 mg/kg: 1/6 euthanized *in extremis* due to ↓BW (15.6%) and ↓FC (≤ 110 g/day) 3/6 aborted; ↓BW; ↓FC Clinical signs: 6/6 ↓defecation and/or small feces Exposure at 30 mg/kg G19: $AUC_{0\text{-}24h}$=1310 ng·h/mL; C_{max}=311 ng/mL	100 mg/kg: 1 of 2 remaining females: ↑postimplantation loss (early and late resorptions); ↓viable fetuses; ↓fetal BW Note: no external fetal malformations or developmental variations were noted in any fetuses in this study.	[redacted]-064-B-PO-TTE (non-GLP) 4.2.3.5.2.3

↓ = decreased; BW = body weight; BWG = body weight gain; F = female; FC = food consumption; G = gestation day; Grp = group; ↑ = increased; MC = methylcellulose; PO = oral; SLS = sodium lauryl sulfate; TK= toxicokinetics; wt = weight

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

Test Article: Ibrutinib

No fertility and early embryonic development to implantation studies were performed.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Report Title: An Oral (Gavage) Embryo/Fetal Development Study of PCI-32765 in Rats **Test Article:** Ibrutinib
Effects on Embryo-Fetal Development

Design Similar to ICH 4.1.3 Yes
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley
Age at First Dose: approximately 14 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Special Features: Toxicokinetics
No Observed Adverse-Effect Level:
F_0 Females: 80 mg/kg/day
F_1 Litters: 10 mg/kg/day

Duration of Dosing: G6 – G17
Day of Mating: Day 0
Day of C-Section: G20
Route: Oral gavage
Vehicle/Formulation: aqueous suspension containing 0.5% methylcellulose and 0.1% sodium lauryl sulfate

Study No.: [redacted]-132-R-PO-TT
Location in CTD: 4.2.3.5.2.2
GLP Compliance: Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle Control)**	**10**	**40**	**80**
No. of Animals	F: 25	F: 25	F: 25	F: 25
Toxicokinetics (Ibrutinib):				
No. of Animals	F: 4	F: 12	F: 12	F: 12
AUC (ng·h/mL)				
Day 6[a] (0-inf)	-	1398	4983	11603
Day 17[a] (0-24h)	-	1278	5348	13729
C_{max} (ng/mL)				
Day 6[a]	-	462	1590	2290
Day 17[a]	-	466	1310	2627
Toxicokinetics (Metabolite, PCI-45227):				
AUC (ng·h/mL)				
Day 6[a] (0-inf)	-	1271	4703	8227
Day 17[a] (0-24h)	-	1203	5110	12027
C_{max} (ng/mL)				
Day 6[a]	-	299	1026	1147
Day 17[a]	-	261	726	1665

(Continued)

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Effects on Embryo-Fetal Development — **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle Control)**	**10**	**40**	**80**
Noteworthy Findings					
No. Pregnant		25	23	25	24
No. Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter		0	0	0	8
Clinical Observations		-	-	-	-
Body Weight (g)[b]		419	0.2	-2.1	-13.8**
Body Weight Gain (g)[c]		91	0	-5.5	-40.7**
Mean gravid uterine weights (g)[b]		88.3	-	-	-68.6**
Food Consumption (g)[d]		25	0	-4.0	-4.0
Mean No. Corpora Lutea		17.0	16.4	18.1	16.8
Mean No. Implantations		16.1	15.8	16.2	15.7
Mean % Preimplantation Loss		4.5	3.6	8.6	7.0
Necropsy Observations		-	-	-	-
Litters:	No. of Litters Evaluated	25	23	25	24
	No. Live Fetuses	376	348	377	98
	Mean No. Live Fetuses	15.0	15.1	15.1	4.1**
	Mean No. Early Resorptions	1.1	0.7	1.1	11.5
	Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0
	Mean No. Total Resorptions	1.1	0.7	1.1	11.5
	No. Dead Fetuses	0	0	0	0
	Mean No. of Dead Fetuses	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	6.8	4.3	6.9	74.4++
	Mean Fetal Body Weight (g)	3.8	3.7	3.4**	3.1**
	Fetal Sex Ratios (% Males)	51.1	52.5	50.2	48.9

(Continued)

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Effects on Embryo-Fetal Development — **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle Control)**	**10**	**40**	**80**
Litters (Continued):				
Fetal Anomalies:				
External Malformations	-	-	-	-
External developmental variations	-	-	-	-
Visceral Malformations				
Dextrocardia				
No. Fetuses (%)[e]	0	0	0	1 (1.3)
No. Litters (%)	0	0	0	1 (6.3)
Retroesophageal Aortic Arch				
No. Fetuses (%)[e]	0	0	0	1 (0.7)
No. Litters (%)	0	0	0	1 (6.3)
Persistent Truncus Arteriosus				
No. Fetuses (%)[e]	0	0	0	1 (3.1)
No. Litters (%)	0	0	0	1 (6.3)
Right-Sided Aortic Arch				
No. Fetuses (%)[e]	0	0	0	1 (1.0)
No. Litters (%)	0	0	0	1 (6.3)
Interrupted Aortic Arch				
No. Fetuses (%)[e]	0	0	1 (0.3)	0
No. Litters (%)	0	0	1 (4.0)	0
Visceral developmental variations	-	-	-	-
Skeletal Malformations	-	-	-	-
Skeletal Developmental Variations				
Sternebra(e) #5 and/or #6 unossified[e]	5.4	3.9	11.0	30.2**
Reduced ossification of 13th rib[e]	0.3	0.6	1.9	17.4
Cervical centrum #1 ossified[e]	19.7	30.1	35.1	8.5
Total Affected Fetuses (Litters)	0 (0)	2 (1)	2 (1)	5 (5)
% per litter with malformations	0.0	0.6	0.6	6.6
% per litter with variations	33.8	42.1	45.1	52.5*

(Continued)

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（続き）

Effects on Embryo-Fetal Development **Test Article:** Ibrutinib

[a] Dosing was initiated on G6 and continued through G17.
[b] % difference from control on G20. For controls, group mean (g) is shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[c] % difference from control for G6-18. For controls, group mean (g) is shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[d] % difference from control for G6-18. For controls, group mean (g) is shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[e] Mean % fetuses affected per litter.

- No noteworthy findings; g = grams; G = Gestation Day;

Modified statistics used *- $p<0.05$, ** - $p<0.01$; * indicates parametric analysis and + indicates non-parametric analysis; ++significantly different from the control group at 0.01

Statistical analyses: Maternal body weight, body weight changes, food consumption, gravid uterine weights, numbers of corpora lutea, implantation sites, viable fetuses, and fetal body weights: Dunnett's test; mean litter proportions of prenatal data, total fetal malformations and developmental variations and each particular external, visceral, and skeletal malformation or variation: Dunn's test

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

Test Article: Ibrutinib

No studies examining pre- and postnatal development have been conducted.

2.6.7.15　新生児を用いた試験

Test Article: Ibrutinib

No studies were conducted in which juvenile animals were dosed.

2.6.7.16　局所刺激性試験

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Treatment	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test				
Balb/c 3T3 mouse fibroblasts	In vitro (DMSO)	First experiment: 0, 2.73, 4.10, 6.15, 9.22, 13.83, 20.74, 31.11, 46.67 and 70.00 µg/ml ± UV irradiation Second experiment: 0, 9.30, 11.16, 13.40, 16.08, 19.29, 23.15, 27.78, 33.33 and 40.00 µg/ml ± UV irradiation	First experiment: • Minimal precipitation ≥ 46.67 µg/ml • Non-irradiated cells IC_{50}: 28.22 µg/ml (95% CI: -95.36 – 151.80 µg/ml); irradiated cells IC_{50}: 21.66 µg/ml (95% CI: 21.45 – 21.88 µg/ml) • PIF value: 1.30 (95% CI: -4.40 – 7.01 µg/ml) Second experiment: • Minimal precipitation ≥ 33.33 µg/ml • Non-irradiated cells IC_{50}: 25.02 µg/ml (95% CI: 24.29 – 25.76 µg/ml); irradiated cells IC_{50}: 22.66 µg/ml (95% CI: 22.36 – 22.96 µg/ml) • PIF value: 1.10 (95% CI: 1.07 – 1.14 µg/ml) Conclusion: no phototoxic potential	[redacted]-120-3T3-X-PT (TOX10667) (non-GLP) 4.2.3.6.1

CI = confidence interval; DMSO = dimethylsulfoxide; IC_{50} = concentration at which cell viability is inhibited by 50%; NRU = neutral red uptake; PIF = photo-irritation factor

2.6.7.17 A その他の毒性試験：免疫毒性試験

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley (Crl:CD(SD)) **Duration of Dosing:** 28 and 33 days **Study No.:** [redacted]-017-R-PO-IMTX (TOX10535)
Initial Age: 7 to 8 weeks **Duration of Postdose Recovery:** 28 days **Location in CTD:** 4.2.3.7.2.1
Date of First Dose: [redacted] **Method of Administration:** Oral gavage
Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose and 0.1% sodium lauryl sulfate in ultra-pure water **GLP Compliance:** yes
Special Features: Immunology, immunochemistry
Minimal Effect Dosage Level: 100 mg/kg/day

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)[d]**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:20	F:5	F:12	F:12	F:20
Toxicokinetics (Day 33, n = 3)					
Ibrutinib					
AUC_{0-24} (ng·hr/mL)	BLLOQ	NA	995	4984	13765
C_{max} (ng/mL)	BLLOQ	NA	908	2473	2673
PCI-45227					
AUC_{0-24} (ng·hr/mL)	BLLOQ	NA	1027	4368	10162
C_{max} (ng/mL)	BLLOQ	NA	365	1203	1433
Noteworthy Findings					
Total Mortality	0	0	0	0	1[b]
Test-Item Related Mortality	0	0	0	0	0
Body Weight	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–
Clinical Observations	–	–	–	–	–
TDAR – Anti-KLH IgM (µg/mL)[c, e]					
Day 14	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ
Day 19	22.557	< LLOQ	13.327	8.616	1.599***
Day 21	21.086	< LLOQ	8.798	6.697*	1.296***
Day 24	13.524	3.416	3.769*	3.666**	1.549***
Day 28	13.058	7.206	2.180**	1.489***	1.121***
Day 34	58.177	4.194	24.263	21.788	18.377*

(Continued)

2.6.7.17　A　その他の毒性試験：免疫毒性試験（続き）

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period　**Test Article:** Ibrutinib

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)[d]**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:20	F:5	F:12	F:12	F:20
TDAR – Anti-KLH IgG (µg/mL) [c, f]					
Day 14	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ
Day 19	0.236	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ
Day 21	0.571	< LLOQ	0.221*	0.261	< LLOQ**
Day 24	1.632	0.790	0.889	0.996*	< LLOQ***
Day 28	5.828	4.480	2.178	2.606*	0.336***
Day 34	117.253	9.404	84.285	147.064	1.537***
Immunochemistry – Total IgM (mg/mL) [c]					
Day -7	0.210	0.186	0.204	0.194	0.200
Day 14	0.301	0.140	0.151**	0.143**	0.099***
Day 19	0.532	0.130	0.336*	0.308*	0.154***
Day 21	0.564	0.214	0.351*	0.304**	0.167***
Day 24	0.463	0.296	0.283*	0.294*	0.147***
Day 28	0.335	0.268	0.193	0.169**	0.090***
Day 34	0.363	–	0.215*	0.223*	0.126***
Immunochemistry – Total IgG (mg/mL) [c]					
Day -7	1.548	1.556	–	–	–
Day 14	2.774	2.490	–	–	–
Day 19	2.499	1.918	–	–	–
Day 21	3.129	2.770	–	–	–
Day 24	3.391	2.920	–	–	2.658
Day 28	4.025	3.290	–	–	2.721
Day 34	4.098	–	–	–	2.509*

(Continued)

2.6.7.17　A　その他の毒性試験：免疫毒性試験（続き）

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period　**Test Article:** Ibrutinib

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)[d]**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:20	F:5	F:12	F:12	F:20
Hematology [g] – Day 34					
Red blood cells (10^6/µL)	7.561	+ 4.54	–	–	–
Hemoglobin (g/dL)	14.28	+10.08	–	–	–
Hematocrit (%)	43.27	+10.29	–	–	–
Reticulocytes (10^9/L)	288.37	–	–	–	+23.40*
White blood cells (10^3/µL)	6.750	- 45.57	–	–	- 27.61*
Neutrophils (10^3/µL)	0.724	–	+38.78	+ 40.62	+ 114.40**
Lymphocytes (10^3/µL)	5.682	- 48.29	–	–	- 45.60***
Blood Phenotyping [g]					
Total lymphocyte count (cells/µL)	5681.7	-48	–	–	-46***
T-lymphocytes (cells/µL)	3448.251	-40	–	–	-43***
B-lymphocytes (cells/µL)	1762.068	-70	–	–	-54**
Natural-killer cells (cells/µL)	186.809	+6	–	–	+24
Bone Marrow Evaluation – Day 34 [g,h]					
Lymphoid Cells (# cells)	71.8	+14	–	–	-36
Atypical Cells (# cells)	0	8.6	13.6	11.4	5.9
Myeloid:Erythroid Ratio	0.72	+30	+26	+29	+25

(Continued)

2.6.7.17　A　その他の毒性試験：免疫毒性試験（続き）

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period　**Test Article:** Ibrutinib

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)[d]**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:20	F:5	F:12	F:12	F:20
Gross Pathology	–	–	–	–	–
Organ Weights (g) – Day 34	–	–	–	–	–
Histopathology - Day 34					
Spleen (# examined)	12	5	12	12	11
Lymphoid depletion, white pulp (# animals affected)	0	5	0	0	4
Minimal	–	1	–	–	2
Mild	–	3	–	–	2
Moderate	–	1	–	–	–
Lymph node, mandibular (# examined)	12	5	11	12	11
Lymphoid depletion	0	2	0	0	0
Mild	–	2	–	–	–
Lymph node, mesenteric (# examined)	12	5	12	12	11
Lymphoid depletion	0	2	0	0	0
Minimal	–	1	–	–	–
Mild	–	1	–	–	–
GALT (# Examined)	12	5	12	11	11
Lymphoid depletion	0	2	0	0	0
Minimal	–	2	–	–	–

(Continued)

2.6.7.17　A　その他の毒性試験：免疫毒性試験（続き）

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period　**Test Article:** Ibrutinib

RECOVERY PERIOD					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:8	F:0	F:0	F:0	F:8
TDAR – Anti-KLH IgM (µg/mL) [i]	–				–
TDAR – Anti-KLH IgG (µg/mL) [i]	–				–
Immunochemistry – Total IgM (mg/mL) [i]	–				–
Immunochemistry – Total IgG (mg/mL) [i]	–				–
Hematology [g] **– Day 70**					
Neutrophils (10^3/µL)	0.599				+89.98
Organ Weights (g) [g] **– Day 70**					
Lymph Node, Mandibular					
Absolute (g)	0.0663				+40**
% of body weight	0.0263				+37**
Histopathology - Day 70					
Lymph node, Mandibular (# examined)	8				8
Plasmacytosis (# animals affected)	0				5
Minimal	–				4
Mild	–				1
Lymphoid hyperplasia (# animals affected)	0				4
Minimal	–				1
Mild	–				3

(Continued)

2.6.7.17 A その他の毒性試験：免疫毒性試験（続き）

Report Title: A 28 and 33 Day Immunotoxicology Study of PCI-32765 by Oral Gavage in Rats with a 28 Day Recovery Period **Test Article:** Ibrutinib

RECOVERY PERIOD (Continued)					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**25 (Positive Control)**	**10**	**30**	**100**
No. of Animals/Sex/Group[a]	F:8	F:0	F:0	F:0	F:8
Bone Marrow Evaluation – Day 70 [j]					
Lymphoid cells (# cells)	97.9				-20
Atypical cells (# cells)	0				10.4
Myeloid:Erythroid Ratio	0.57				+49

[a] Twelve rats/treated group for the main study, 5 rats for positive control and 8 rats/vehicle control and 100 mg/kg/day ibrutinib groups for the recovery study.
[b] Animal No. 5509 (100 mg/kg/day) was euthanized on Day 7 due to an eye injury which was not test item-related.
[c] Group mean values presented for all groups.
[d] Positive control group received cyclophosphamide at 25 mg/kg/dose on Days 10, 11, 12, and 13.
[e] BLLOQ set at 0.782 µg/mL and treated as LLOQ/2 (0.391 µg/mL) for statistical purposes.
[f] BLLOQ set at 0.391 µg/mL and treated as LLOQ/2 (0.196 µg/mL) for statistical purposes.
[g] Group mean values presented for vehicle controls, % difference compared to vehicle controls presented for treated animals.
[h] Atypical cells presented as mean # cells.
[i] Anti-KLH IgM, anti-KLH IgG, total IgM, and total IgG were analyzed on Days 56, 61, 63, 66, and 70 in the recovery animals and there were no meaningful differences between animals dosed 100 mg/kg/day ibrutinib and vehicle controls at any time.
[j] Group mean values presented for vehicle control groups, % difference compared to controls presented for treated animals for lymphoid cells and M:E ratio, and mean values for atypical cells.

–: No treatment-related finding or results were not considered to be meaningfully different from mean control value, or not scheduled to be performed.
#: number

ANOVA = one-way analysis of variance; (B)LLOQ = (Below) lower limit of quantification; F = female; GALT = gut associated lymphoid tissue; KLH = keyhole limpet hemocyanin; M:E = Myeloid:Erythroid; NA = Not applicable; TDAR = T-Cell Dependent Antibody Response

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$; statistics were conducted between the treated groups and the vehicle control. For more than two groups, either a parametric ANOVA was performed followed by a Dunnett test or a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn test. For comparison of two groups, a two-sample t-test or a Wilcoxon rank-sum test was performed. Each pairwise group comparison was conducted via a two-sided test at the 5% significance level.

2.6.7.17 B その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - 反復投与毒性試験

Report Title: Ibrutinib: 28-Day Repeated Dose Oral Toxicity Study in the Rat (Impurity evaluation) **Test Article:** Ibrutinib

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley **Duration of Dosing:** 28 days **Study No.:** [redacted]-179-R-PO-TX-IMP (TOX10674)

Age at First Dose: 56-60 days **Duration of Postdose:** NA **Location in CTD:** 4.2.3.7.6.1

Date of First Dose: [redacted] **Route:** Oral gavage

Vehicle/Formulation: aqueous solution containing 0.5% w/v Methocel and 0.1% w/v sodium lauryl sulfate **GLP Compliance:** Yes

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**40**		**40[a]**	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body weight	-	-	-	-	-	-
Food consumption	-	-	-	-	-	-
Haematology[b]	-	-	-	-	-	-
Coagulation[b]	-	-	-	-	-	-
Clinical chemistry[b]						
Potassium (mmol/L)	5.21	4.91	0.871***	0.849***	0.885***	0.833***
AST (U/L)	114.7	95.5	0.713***	0.852**	0.684***	0.788***
Cholesterol (mg/dL)	-	75.8	-	0.815*	-	0.777*
Urinalysis[b]	-	-	-	-	-	-
Organ weight						
Spleen						
Absolute value (g)	0.65656	-	0.53849*	-	0.57729*	-
Relative to Body Weight (%)	0.17399	-	0.14367*	-	0.14983*	-
Relative to Brain Weight (%)	31.96	-	26.47*	-	27.74	-

(Continued)

2.6.7.17 B その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - 反復投与毒性試験（続き）

Report Title: Ibrutinib: 28-Day Repeated Dose Oral Toxicity Study in the Rat (Impurity evaluation) **Test Article:** Ibrutinib

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**40**		**40[a]**	
No. of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Gross pathology						
Pancreas						
Red Foci	-	-	1	-	1	-
Histopathology						
Pancreas (No. Examined)	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Acinar Atrophy	0	0	2	2	5*	2
Minimal	-	-	2	2	3	2
Mild	-	-	0	0	1	0
Moderate	-	-	0	0	1	0
Haemorrhage	0	0	1	1	1	0
Minimal	-	-	0	1	1	-
Mild	-	-	1	0	0	-

[a] Ibrutinib fortified with 不純物B* (3.30% wt/wt), 不純物E* (1.29% wt/wt), 不純物H* (0.37% wt/wt), 不純物D* (0.95% wt/wt) and 不純物C* (0.90% wt/wt).
[b] At end of dosing period. For vehicle controls, group means are shown. For (fortified) ibrutinib groups, fold-changes of vehicle control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the multiples of vehicle controls).

AST = aspartate transaminase; F = female; M = male; NA = not applicable

-: No noteworthy findings

Statistical analyses: clinical chemistry: Mann-Whitney U test (two-tailed); organ weights: Dunn's test with Bonferroni-correction for multigroup comparison using rank sums and Wilcoxon's test for two group comparison; histopathology: Fisher test using 1-sided analysis

*: $p<0.05$, **:$p<0.01$, ***: $p<0.001$

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17　C　その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vitro* 遺伝毒性試験

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Treatment	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
不純物F*: **Ames test (GLP)**				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Lot [redacted] (94.6% purity) Initial toxicity-mutation assay: 0, 1.5, 5.0, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate for TA98, TA1537, TA100 and TA1535; 0, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate for WP2 *uvrA*; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Lot [redacted] Confirmatory mutagenicity assay: 0, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Lot [redacted] Retest of confirmatory mutagenicity assay: 0, 50, 150, 500, 1500, 2500 and 5000 µg/plate for TA1535 + induced rat liver S9, plate incorporation method Lot [redacted] (99.9% purity) Retest of confirmatory mutagenicity assay: 0, 50, 150, 500, 1500, 2500 and 5000 µg/plate for TA1535 + induced rat liver S9, plate incorporation method	Lot [redacted] Initial toxicity-mutation assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Lot [redacted] Confirmatory mutagenicity assay: • Positive mutagenic response (3.5-fold increase) with TA1535 + S9 at 5000 µg/plate with profile of revertant counts at 500-5000 µg/plate suggestive of dose-responsive increase • No positive mutagenic responses with remaining test conditions • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Lot [redacted] Retest of confirmatory mutagenicity assay: • No positive mutagenic response (2.4-fold increase) with TA1535 + S9 at 5000 µg/plate • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Lot [redacted] Retest of confirmatory mutagenicity assay: • No positive mutagenic response • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Conclusion: not positive in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-098-Sal-X-Mu/ 4.2.3.7.6.2

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17　C　その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Treatment	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
不純物G* **: Ames test (GLP)**				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Initial toxicity-mutation assay: 0, 1.5, 5.0, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Confirmatory mutagenicity assay: 0, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method	Initial toxicity-mutation assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: reduction in revertant colonies at 5000 µg/plate with several test conditions • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Confirmatory toxicity-mutation assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: reduction in revertant colonies at 5000 µg/plate with few test conditions • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Conclusion: negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-099-Sal-X-Mu/ 4.2.3.7.6.3
不純物E* **: Ames test (GLP)**				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Initial toxicity-mutation assay: 0, 1.5, 5.0, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Confirmatory mutagenicity assay: 0, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method	Initial toxicity-mutation assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 500 µg/plate Confirmatory toxicity-mutation assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: reduction in revertant colonies at ≥ 1500 or 5000 µg/plate with few test conditions • Precipitate ≥ 500 or ≥ 1500 µg/plate Conclusion: negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-113-Sal-X-Mu/ 4.2.3.7.6.4

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17　C　その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Treatment	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
不純物B* : Ames test (GLP)				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Preliminary toxicity assay: 0, 6.7, 10, 34, 67, 101, 168 and 252 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Mutagenicity assay: 0, 6.7, 10, 33, 67, 100, 167 and 250 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method	Preliminary toxicity assay: • Precipitate observed in test tubes during treatment • Neither precipitate nor toxicity observed on plates Mutagenicity assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: no • Precipitate in test tubes ≥ 67 µg/plate; no precipitate on plates Conclusion: negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-170-Sal-X-MU-IMP/ 4.2.3.7.6.5
Ibrutinib fortified with 5 impurities (不純物H*, 不純物B*, 不純物E*, 不純物D* and 不純物C*)[a]: Ames test (GLP)				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Preliminary toxicity assay: 0, 6.7, 10, 33, 67, 100, 333, 667, 1000, 3333 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Mutagenicity assay: 0, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method	Preliminary toxicity assay: • Bacteriotoxicity: no • Precipitate ≥ 1000 µg/plate Mutagenicity assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: reduction in revertant counts at 5000 µg/plate with some test conditions • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Conclusion: negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-259-Sal-X-MU-IMP/ 4.2.3.7.6.7

(Continued)

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17　C　その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: Ibrutinib

Species/Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Treatment	Noteworthy Findings	Study No./ Location in CTD
Ibrutinib fortified with 不純物A* [b,c]**: Ames test (GLP)**				
Salmonella typhimurium TA98, TA1537, TA100, TA1535; *Escherichia coli* WP2 *uvrA*	In vitro (DMSO)	Preliminary toxicity assay: 0, 6.7, 10, 33, 67, 100, 333, 667, 1000, 3333 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method Mutagenicity assay: 0, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg/plate; ± induced rat liver S9, plate incorporation method	Preliminary toxicity assay: • Bacteriotoxicity: reduction in revertant counts at ≥ 3333 or 5000 µg/plate with several test conditions • Precipitate ≥ 1000 µg/plate Mutagenicity assay: • No positive mutagenic responses ± S9 • Bacteriotoxicity: reduction in revertant counts at 5000 µg/plate with several test conditions • Precipitate ≥ 1500 µg/plate Conclusion: negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay	[redacted]-260-Sal-X-MU-IMP/ 4.2.3.7.6.8

[a] Ibrutinib fortified with 不純物B* (3.47% wt/wt), 不純物E* (1.36% wt/wt), 不純物H* (0.39% wt/wt), 不純物D* (1.03% wt/wt) and 不純物C* (0.96% wt/wt)
[b] Ibrutinib fortified with 不純物A* (2.19% wt/wt)
[c] [redacted] of ibrutinib

DMSO = dimethylsulfoxide

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17 D その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vivo* 遺伝毒性試験

Report Title: *In Vivo* Micronucleus Assay in Male Mice Following Oral Administration of Fortified Ibrutinib **Test Article:** Ibrutinib

Test for Induction of: Micronuclei in bone marrow
Treatment Schedule: Single Dose
Study No: [redacted]-034-M-PO-MU (TOX10650)

Species/Strain: Male Mice/ICR (Hsd:ICR)
Sample Time: 24 & 48 hours after dose
Location in CTD: 4.2.3.7.6.6

Age/Weight: 7 weeks old/31.6 - 36.9 grams
Method of Administration: Oral Gavage
GLP Compliance: Yes

Cells Evaluated: Bone marrow erythrocytes
Vehicle/Formulation: Methylcellulose (0.5% w/v), 0.4% w/v Cremophor EL, 0.1% w/v sodium lauryl sulfate in sterile water

No. of Cells Analyzed/Animal: 1000 erythrocytes (PCEs + NCEs) for toxicity; 2000 PCEs for micronuclei screening
Positive Control: Cyclophosphamide
Date of Dosing: [redacted]

Toxic/Cytotoxic Effects: Piloerection in males at 2000 mg/kg/Fortified ibrutinib was not toxic to bone marrow.
Genotoxic Effects: None
Evidence of exposure: Plasma samples were collected at 1 and 4 hrs post-dose for the test article groups. Maximum mean plasma concentrations of ibrutinib were 1.68, 3.42 and 7.49 µg/ml for the 500, 1000 and 2000 mg/kg dose levels, respectively, observed at 4 hrs post-dose. Maximum mean plasma concentrations of PCI-45227 were 3.22, 4.72 and 5.70 µg/ml for the 500, 1000 and 2000 mg/kg dose levels, respectively, observed at 4 hrs post-dose.

Test Article	Dose[d] (mg/kg)	No./Sex of animals per Sampling time	PCE/RBC (Mean±SD) Sampling Time[a]		MN-PCEs/1000 PCE (Mean±SD) Sampling Time[a]	
			24 h	48 h	24 h	48 h
Vehicle	0	5/M	0.436 ± 0.02[b] 0.400 ± 0.06[c]	0.461 ± 0.04 [b] -	0.3 ± 0.27[b] 0.5 ± 0.35[c]	0.6 ± 0.22[b] -
Fortified Ibrutinib[d]	500	5/M	0.440 ± 0.03 [c]	-	0.5 ± 0.00[c]	-
	1000	5/M	0.458 ± 0.04 [c]	-	0.7 ± 0.45[c]	-
	2000	5/M	0.482 ± 0.04[b]	0.456 ± 0.04[b]	0.6 ± 0.22[b]	1.0 ± 0.61[b]
Cyclophosphamide	50	5/M	0.478 ± 0.04[b] 0.446 ± 0.04[c]	- -	19.4 ± 3.07[b] * 17.2 ± 5.16[c] *	- -

(Continued)

2.6.7.17　D　その他の毒性試験：不純物の毒性試験 - *In Vivo* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: *In Vivo* Micronucleus Assay in Male Mice Following Oral Administration of Fortified Ibrutinib　**Test Article:** Ibrutinib

[a] Time after dosing
[b] Initial Slide Scoring
[c] Subsequent Slide Scoring
[d] Ibrutinib fortified with 不純物B* (3.30% wt/wt), 不純物E* (1.29% wt/wt), 不純物H* (0.37% wt/wt), 不純物D* (0.95% wt/wt) and 不純物C* (0.90% wt/wt)

M = male; MN-PCEs = micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE = polychromatic erythrocytes; RBC = red blood cell; SD = standard deviation; wt = weight
-: not applicable

* $p \leq 0.05$ (Kastenbaum-Bowman Tables, binomial distribution)

*新薬承認情報提供時に置き換え