2.6.6 毒性試験の概要文

タグリッソ®錠

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

目次　　頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 5
2.6.6.1 まとめ 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 12
2.6.6.3 反復投与毒性試験 12
2.6.6.3.1 ラットを用いた反復投与毒性試験 12
2.6.6.3.1.1 ラットを用いた最大耐量経口投与毒性試験（3544KR 試験） 12
2.6.6.3.1.2 ラットを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験（3278DR 試験） 13
2.6.6.3.1.3 ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（3310DR 試験） 14
2.6.6.3.1.4 ラットを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（4 週間回復性試験を含む）（3416AR 試験） 15
2.6.6.3.1.5 ラットを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（526248 試験） 17
2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験 19
2.6.6.3.2.1 イヌを用いた MTD 及び 14 日間反復投与毒性試験（1324DD 試験） 19
2.6.6.3.2.2 イヌを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（4 週間回復性試験を含む）（1351AD 試験） 20
2.6.6.3.2.3 イヌを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（526253 試験） 22
2.6.6.4 遺伝毒性試験 23
2.6.6.4.1 *In vitro* 23
2.6.6.4.1.1 細菌を用いる変異原性試験による遺伝毒性評価（793061 試験） 23
2.6.6.4.1.2 マウスリンフォーマ細胞チミジンキナーゼ遺伝子座試験を用いた遺伝毒性評価（793056 試験） 24
2.6.6.4.2 *In vivo* 24
2.6.6.4.2.1 ラット小核試験を用いた遺伝毒性評価（793538 試験） 24
2.6.6.5 がん原性毒性試験 25
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 25
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 25
2.6.6.6.2 雄受胎能の評価 25
2.6.6.6.3 胚・胎児発生に関する試験 26
2.6.6.6.3.1 ラットを用いた胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に関する試験（496800 試験） 26
2.6.6.6.3.2 出生前及び出生後の発生に関する試験 28
2.6.6.7 幼若動物を用いた毒性試験 28
2.6.6.8 局所刺激性試験 28

2.6.6.9　その他の毒性試験 29
2.6.6.9.1　光毒性試験（8273754 試験） 29
2.6.6.9.2　機序検討試験 30
2.6.6.9.2.1　AZD9291 のラット 3 カ月間反復投与毒性試験で得られた肺についての電子顕微鏡検査（EM-14.148 試験） 30
2.6.6.9.3　代謝物の毒性試験 30
2.6.6.9.3.1　代謝物 AZ5104 のラットを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（3500KR 試験） 30
2.6.6.9.4　抗原性試験 32
2.6.6.9.5　免疫毒性試験 32
2.6.6.9.6　依存性試験 32
2.6.6.9.7　不純物の試験 32
2.6.6.9.7.1　**細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物C＊ の遺伝毒性評価**（8306010 試験） 33
2.6.6.9.7.2　**細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物A＊ の遺伝毒性評価**（8303535 試験） 33
2.6.6.9.7.3　**細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物D＊ の遺伝毒性評価**（8303536 試験） 34
2.6.6.9.7.4　**細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物B＊ の遺伝毒性評価**（8303534 試験） 34
2.6.6.9.7.5　不純物の安全性確認のためのラットを用いた 1 カ月間反復投与毒性試験（528622 試験） 34
2.6.6.10　考察 35
2.6.6.11　結論 43
2.6.6.12　参考文献 44

表目次

表 1　AZD9291 毒性試験パッケージの概要 7
表 2　ラット、イヌ及びヒトに反復経口投与したときの平均総 AZD9291 AUC（nmol·h/L）及び C_{max}（nmol/L）の比較 9
表 3　AZD9291 遺伝毒性試験の要約 24
表 4　妊娠 16 日の雌ラットにおける AZD9291 及び AZ7550 の群平均トキシコキネティクス（第 2 相） 27
表 5　AZD9291 の重要な毒性試験の最高用量における AZ5104 及び AZ7550 曝露量の平均値並びにラット探索的試験における AZ5014 経口投与後の曝露量とヒトとの比較 42

＊新薬承認情報提供時に置換えた

図目次

図 1　AZD9291 の UV 吸収スペクトル（メシル酸塩）.....29

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ALP	Alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ
AST	Aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity：投与後 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
AUC_{0-24}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to 24 hours after dosing：投与後 0～24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
C_{max}	Maximum plasma drug concentration：最高血漿中薬物濃度
CYP	Cytochrome P450：チトクロム P450
DMPK	Drug Metabolism and Pharmacokinetics：薬物動態
EGF	Epidermal Growth Factor：上皮成長因子
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor：上皮成長因子受容体
EGFRm	Epidermal Growth Factor Receptor (containing activating/sensitising mutation)：活性化変異／感受性変異を有する上皮成長因子受容体
ErbB	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog：赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
GLDH	Glutamate dehydrogenase：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 (also known as ErbB2)：ヒト上皮成長因子受容体 2（別名 ErbB2）
HER4	Human epidermal growth factor receptor 4 (also known as ErbB4)：ヒト上皮成長因子受容体 4（別名 ErbB4）
ICH	International Conference on Harmonisation：日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF1R	Insulin-like Growth Factor Receptor-1：インスリン様成長因子 1 受容体
InsR	Insulin receptor tyrosine kinase：インスリン受容体
MTD	Maximum tolerated dose：最大耐量
NA	Not applicable：該当せず
NSCLC	Non small cell lung cancer：非小細胞肺癌
QWBA	Quantitative whole -body autoradiography：定量的全身オートラジオグラフィー
S9	*In vitro* rat liver metabolic activation system：*In vitro* ラット肝臓代謝活性化系
TEM	Transmission Electron Microscope：透過型電子顕微鏡
TK	Toxicokinetics：トキシコキネティクス
TKI	Tyrosine kinase inhibitor：チロシンキナーゼ阻害剤

2.6.6.1 まとめ

AZD9291 は強力かつ不可逆的な変異型上皮成長因子受容体（EGFRm 及び T790M）阻害剤であり、野生型 EGF 受容体（EGFR）に対する阻害作用はより弱い。本申請は、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）治療経験のある進行／転移性 EGFR T790M 変異陽性の非小細胞肺癌（NSCLC）の患者を対象とした AZD9291 の経口治療（予定治療用量は 80 mg 1 日 1 回投与）を目的としたものである。本資料においてはヒトの曝露量について言及しているが、これは AZD9291 を 80 mg の用量で投与された患者 32 例から得られた定常状態における曝露量の算術平均（臨床薬理の要約、2.7.2 項参照）に基づくものである。技術的な問題により、GLP 適用下で血漿蛋白結合に関するデータを得ることができなかったため（薬物動態試験の概要文、2.6.4.4.2 項参照）、総薬物濃度のみを提示した。

この患者集団を対象とした使用をサポートする非臨床毒性試験パッケージを表 1に概説する。この試験パッケージは対象患者集団への使用をサポートする目的において適切なものと考えられ、また進行癌を対象とした開発のために設けられたICHS9, 2009ガイドラインに従って実施した。

AZD9291 の毒性は、ラット及びイヌを用いた最長 3 カ月間の反復経口投与毒性試験、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験（雄受胎能はラット 3 カ月間反復投与毒性試験で評価し、胚・胎児発生及び生後の生存／成長への影響をラットで検討）並びに *in vitro* 光毒性試験で評価した。ラット 3 カ月間反復投与毒性試験で確認された肺の所見については、更に電子顕微鏡検査で特性を明らかにした。含まれる可能性のある複数の不純物について、*in vitro* 遺伝毒性試験を追加実施した。

1 カ月間反復投与毒性試験では、高用量での 1 カ月間の休薬による回復性を評価した。3 カ月間反復投与毒性試験でみられた所見の大部分は 1 カ月間投与後にも認められたものであったが、3 カ月間投与後に新規に発現した所見の回復性については、病変の性質及び重症度やその器官系の再生能に基づいて考察した。

全ての主要な毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。用量設定試験は GLP 適用試験ではないが、GLP 適用施設で実施した。全ての GLP 適用毒性試験において AZD9291 メシル酸塩（臨床製剤に使用）を使用したが、例外として 1 カ月間反復投与毒性試験ではフリー体を使用した。大部分の GLP 非適用用量設定試験では、AZD9291 フリー体を使用した（表 1参照）。いずれの試験においても、用量はフリー体当量として表示した。なお、*in vivo* 試験においては AZD9291 を 0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース-0.1%ポリソルベート 80 水溶液、0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース（3500-5600 cps)又は pH 3～3.5 に調整した超純水に懸濁して、*in vitro* 試験においては AZD9291 又は不純物をジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド又はアセトニトリル：水：酢酸混合液 (67:23:10, v/v/v) に溶解して試験に用いた。

毒性試験はラット及びイヌを用いて実施した。これらはいずれも正常組織における野生型 EGFR 阻害作用に関連した毒性リスクを評価するための動物種として妥当と考えられ、他の EGFR 阻害剤の毒性評価にも使用されている（Yano et al, 2003）。加えて、AZD9291 の *in vitro* 代謝について行った検討では、ヒト肝細胞で確認された代謝物は、いずれもラット及び／又はイヌの肝細胞でも検出されている（薬物動態試験の概要文、2.6.4.5.1 項参照）。

AZ5104 及び AZ7550 は 2 つの薬理活性代謝物であり、AZD9291 をラット及びイヌに経口投与したときに生成する。いずれの代謝物もヒト血漿中濃度は総循環血中薬物曝露量の 10%未満であ

ったことから（臨床薬理の要約、2.7.2 項参照）、これらの代謝物について特定の非臨床における検討は必要ないと考えられる。しかしながら、毒性試験開始の時点でヒトにおけるこれらの代謝物の濃度は不明であり、いずれも薬理活性を有することから、主要な毒性試験では AZ5104 及び AZ7550 の全身曝露量を測定した。AZ7550 の曝露量は全ての主要な毒性試験で定量できたが、AZ5104 は分析上の問題によりイヌ 1 カ月間反復投与毒性試験のみで定量できた（薬物動態試験の概要文、2.6.4.3.4.2 項参照）。また、AZ5104 を雌ラットに 1 カ月間経口投与して毒性を評価する探索的試験を実施した。

一部の試験報告書では、AZD9291 を AZ13552748 とも称している。試験報告書においては、AZ5104 及び AZ7550 をそれぞれ AZ13575104 及び AZ13597550 と称している。

表 1　　AZD9291 毒性試験パッケージの概要

試験の種類及び期間	被験物質	投与経路	動物種	試験番号（当社の参照番号）	GLP 適用の有無
反復投与毒性試験：					
2 日間[a]	AZD9291	経口	ラット	3544KR	非適用
7 日間	AZD9291	経口	ラット	3278DR	非適用
14 日間	AZD9291	経口	ラット	3310DR	非適用
1 カ月間 + 1 カ月間回復性	AZD9291	経口	ラット	3416AR	適用
3 カ月間（雄受胎能を含む）[a]	AZD9291	経口	ラット	526248 (3698PR)	適用
MTD 及び 14 日間	AZD9291	経口	イヌ	1324DD	非適用
1 カ月間 + 1 カ月間回復性	AZD9291	経口	イヌ	1351AD	適用
3 カ月間[a]	AZD9291	経口	イヌ	526253 (1454PD)	適用
遺伝毒性試験：					
細菌を用いる変異原性試験[a]	AZD9291	*In vitro*	サルモネラ菌及び大腸菌	793061 (2948BV)	適用
マウスリンフォーマ試験[a]	AZD9291	*In vitro*	L5178Y 細胞	793056 (2949MV)	適用
骨髄小核試験[a]	AZD9291	経口	ラット	793538 (3553QR)	適用
生殖発生毒性試験：					
胚・胎児発生、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[a]	AZD9291	経口	ラット	496800 (3710RR)	適用
その他の試験：					
3T3 光毒性試験[a]	AZD9291	*In vitro*	Balb/c 3T3 線維芽細胞	8273754 (2950BV)	適用

表 1　　AZD9291 毒性試験パッケージの概要

試験の種類及び期間	被験物質	投与経路	動物種	試験番号（当社の参照番号）	GLP 適用の有無
ラット 3 カ月間反復投与毒性試験における肺の電子顕微鏡検査	AZD9291	NA	NA	EM-14.148 (3358KV)	非適用
探索的 1 カ月間反復投与毒性試験	AZ5104 代謝物	経口	ラット	3500KR	非適用
不純物の試験：					
復帰突然変異試験	不純物C＊（不純物C＊）	*In vitro*	サルモネラ菌及び大腸菌	8306010 (3398BV)	適用
復帰突然変異試験	不純物A＊（不純物A＊）	*In vitro*	サルモネラ菌及び大腸菌	8303535 (3353BV)	適用
復帰突然変異試験	不純物D＊（不純物D＊）	*In vitro*	サルモネラ菌及び大腸菌	8303536 (3354BV)	適用
復帰突然変異試験	不純物B＊（不純物B＊）	*In vitro*	サルモネラ菌及び大腸菌	8303534 (3352BV)	適用
1 カ月間 [b]	AZD9291	経口	ラット	528622 (3898DR)	適用

MTD = 最大耐量；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；NA= 該当せず

[a] 当該試験では AZD9291 メシル酸塩（臨床製剤に使用）を使用した。AZD9291 の他の全ての試験ではフリー体を使用した。

[b] 当該試験は市販品生産工場において市販スケールで製造された原薬に含まれる不適切な不純物のリスクを軽減させるために実施したものであるが、実際に市販品生産工場で製造された AZD9291 メシル酸塩を分析した結果、この試験は不純物の安全性確認上は必要ないものであることが判明した。申請資料として完璧を期すために当該試験を収載した。

反復投与毒性試験の動物における総曝露量を予定治療用量（80 mg）でヒトに投与したときの曝露量と比較した結果を、表 2（AUC 及び C_{max}）に示す。技術的な問題により、GLP 適用下で血漿蛋白結合に関するデータを得ることができなかったため（薬物動態試験の概要文、2.6.4.4.2 項参照）、総薬物濃度のみを提示した。ヒト（80 mg）の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、重要な 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験の最大耐量（MTD）における曝露量と概ね同程度又はより高かった。1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験の高用量では用量制限毒性が確認されたが、抗がん剤では、患者の治療用量での血漿中濃度と同程度又はより低い濃度で、動物における安全性及び忍容性の限界がみられることは珍しくない（Collins et al, 1990）。ラット及びイヌを用いた 7 及び 14 日間

＊新薬承認情報提供時に置換えた

用量設定試験において、より高い曝露量（最大でヒト（80 mg）の AUC 及び C_{max} の約 6～8 倍）を検討したところ、その毒性プロファイルは主要な毒性試験でみられた所見と概ね一致していた。

同一用量における曝露量は、しばしば雄ラットより雌ラットの方が高く、これは用量設定試験において雄でより高い用量まで忍容性がみられたことと一致する。その結果、ラットの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験で選択した高用量は雌雄で異なり、雄における用量は雌より高かったが、これは雌雄ともに確実に MTD を評価できるようにするためであった。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験の最高用量（30 mg/kg/日）における AZD9291 の平均 AUC（21200 nmol·h/L）は、ヒトに 80 mg を投与したときの値の約 1.4 倍であった。

1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験の最高用量で得られた AZ5104 及び AZ7550 の曝露量を、ヒトに 80 mg を投与したときの曝露量と比較した結果を2.6.6.10項、表 5に示す。AZ5104 については、ヒト（80 mg）における曝露量がイヌ 1 カ月間反復投与毒性試験で得られた曝露量より高かったが（この代謝物は他の主要な毒性試験では定量されなかった）、AZ5104 を雌ラットに経口投与した探索的 1 カ月間反復投与毒性試験ではより高い曝露量が認められた（80 mg を投与したヒトと比較して AUC は約 3 倍、C_{max} は約 4 倍）。AZ7550 については、80 mg を投与したヒトにおける曝露量は重要な 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験において MTD で得られた曝露量と同程度又はより高かったが、例外としてイヌ 1 カ月間反復投与試験における曝露量はヒトより高かった（80 mg を投与したヒトと比較して AUC は約 2 倍、C_{max} は約 3 倍）。

ラット及びイヌの 1 カ月間反復投与毒性試験でトキシコキネティクス（TK）試験用に採取した血漿サンプルを、分析前に種々の期間にわたり凍結保存し、AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 の凍結条件下での安定性を評価した。その結果、保存後に測定した血漿中濃度は、サンプル採取時の値より低かった（薬物動態試験の概要文、2.6.4.2.1.項参照）。したがって、これらの動物における AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 の曝露量は低めの値が得られた（最大で AZD9291 については-23%、AZ5104 については-52%、AZ7550 については-21%）可能性があるが、これらの血漿中濃度データをヒトのリスク評価に使用する上での影響はないと考えられた。更に、3 カ月間反復投与毒性試験及びラットの胚・胎児発生に関する試験については、凍結安定性が確認された期間内にサンプルを分析したことから、保存期間の問題が TK データに影響を及ぼすことはなかった。

表 2　ラット、イヌ及びヒトに反復経口投与したときの平均総 AZD9291 AUC（nmol·h/L）及び C_{max}（nmol/L）の比較

用量 (mg/kg/日)	AUC_{0-24} (nmol·h/L)			C_{max} (nmol/L)		
	ラット	イヌ	ヒト	ラット	イヌ	ヒト
1	雄：254、雌：543[f]	761[i]	-	雄：24.3、雌：50.5[f]	69.1[i]	-
1.3[a]	-	-	15000[b]	-	-	780[b]
2	-	2670[h]	-	-	230[h]	-
3	-	2210[i]	-	-	196[i]	-
4	雄：1660、雌：2470[e]	-	-	雄：129、雌：200[e]	-	-
6	-	7270[h] 5420[i#]	-	-	692[h] 425[i#]	-

表 2　ラット、イヌ及びヒトに反復経口投与したときの平均総 AZD9291 AUC（nmol·h/L）及び C_{max}（nmol/L）の比較

用量 (mg/kg/日)	AUC_{0-24} (nmol·h/L)			C_{max} (nmol/L)		
	ラット	イヌ	ヒト	ラット	イヌ	ヒト
10	雄：2500、雌：3410[e] 雄：2810、雌：6190[f]	24250[g]	-	雄：218、雌：329[e] 雄：294、雌：472[f]	2100[g]	-
12	-	12200[h]	-	-	1060[h]	-
20	雄：5230、雌：7650[d] 雌：9980[e] 雄：5880、雌：16200[f#]	雌：19900[g]	-	雄：428、雌：476 [d] 雌：615[e] 雄：408、雌：1020 [f#]	雌：1330[g]	-
40	雄：12200、雌：16400[d] 雄：9530[e]	雄：97100[g]	-	雄：678、雌：1020[d] 雄：546[e]	雄：6050[g]	-
50	雄：19200[c]	-	-	雄：1090[c]	-	-
60	雄：19400[d]	雄：58100[g]	-	雄：1160[d]	雄：3610[g]	-
100	雄：50200[c]	-	-	雄：2310[c]	-	-
200	雄：96600[c]	-	-	雄：4830[c]	-	-

ラットにおける曝露量には性差がみられたため、雌雄のデータを別々に示した。イヌについては、特に記載しない限り雌雄を併合した。いずれの試験においても、特に記載しない限り投与期間終了時のデータを示した。
3 カ月間反復投与毒性試験で忍容性がみられた最大の曝露量
[a] 80 mg を 60 kg の被験者に投与した場合の用量
[b] 日本人進行 NSCLC 患者に AZD9291（80 mg）錠を投与したときの定常状態における曝露量の算術平均
[c] ラット 7 日間反復投与毒性試験（3278DR ；50、100 及び 200 mg/kg/日：各投与 7、5 及び 4 日）
[d] ラット 14 日間反復投与毒性試験（3310DR；雌 40 mg/kg/日：投与 11 日）
[e] ラット 1 カ月間反復投与毒性試験（3416AR）
[f] ラット 3 カ月間反復投与毒性試験（526248；投与 1～55 日は 40 mg/kg/日、投与 62 日からは 20 mg/kg/日）
[g] イヌ 14 日間反復投与毒性試験（1324DD；雄 40 及び 60 mg/kg/日：投与 7 日）
[h] イヌ 1 カ月間反復投与毒性試験（1351AD；投与 1～7 日は 20 mg/kg/日、投与 11 日からは 12 mg/kg/日）
[i] イヌ 3 カ月間反復投与毒性試験（526253；投与 23 日より 10 mg/kg/日から 6 mg/kg/日に減量）

注：1 カ月間反復投与毒性試験から得られたサンプルで測定された AZD9291 の血漿中濃度は、凍結安定性の問題により採血時より低かった可能性がある（薬物動態試験の概要文、2.6.4.2.1 項参照）。

これらの試験で得られた主要な所見を以下に要約する：

- AZD9291 をラット及びイヌに最長 3 カ月間反復経口投与したときの主要な病理組織学的所見は野生型 EGFR の阻害に一致するものであり、所見としては用量に関連した萎縮性、炎症性及び／又は変性性の変化が、両動物種の皮膚、眼（角膜）及び消化管（舌を含む）の上皮並びに雌ラットの生殖器に認められた。白血球数増加及び赤血球パラメータ減少（ラット及びイヌ）並びに脾臓の造血亢進（ラット）は、これらの組織における変性性及び炎症性変化による二次的なものと考えられる。
- 用量制限性の毒性所見として、体重減少を伴う摂餌量減少（ラット及びイヌ）並びに眼の症状及び眼科学的所見（イヌにおける角膜上皮潰瘍／びらん及び結膜発赤）が認められた。
- 病理組織学的変化が雄性生殖器（主としてラット及びイヌの精巣における精細管萎縮／変性及び／又は精子細胞停留であり、ラット 3 カ月間反復投与毒性試験では雄受胎能への悪

影響を伴っていた）及び雄の乳腺（ラットにおける腺萎縮）にみられたが、これらも本薬の薬理作用に関連する可能性がある。

- 泡沫状肺胞マクロファージ集簇の発現頻度増加が、ラット 3 カ月間反復投与毒性試験の雌雄で認められた。電子顕微鏡でこれらのマクロファージの特性を詳細に検討したところ、初期リン脂質症に一致する変化が雌にみられ、リポフスチン沈着（光学顕微鏡検査ではリポフスチン色素は検出されなかったが）又は多胞体が雌雄で認められた。これらの所見は概ね軽微から軽度であり、他の炎症性／変性性変化はみられなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。
- ラット 3 カ月間反復投与毒性試験の無影響量及び無毒性量は低用量の 1 mg/kg/日であった。イヌ 3 カ月間反復投与毒性試験では無影響量は確認されなかったが、無毒性量は中用量の 3 mg/kg/日であった。
- ラット及びイヌの 1 カ月間反復投与毒性試験で回復性を評価したところ、全ての所見（皮膚、眼、消化管及び雌雄の生殖器の病理組織学的変化を含む）について回復性が認められたが、1 カ月間の休薬中における一部の角膜の変化（ラットの角膜上皮萎縮及びイヌの角膜半透明化）の回復は部分的であった。
- ラット及びイヌを用いた重要な毒性試験において、代謝物 AZ5104 及び AZ7550 への曝露が確認された。AZ5104 をラットに 1 カ月間経口投与したときの毒性プロファイルは AZD9291 と類似していた。これらの試験は、代謝物に関する十分な安全性評価を提供するものと考えられる。
- AZD9291 は *in vitro* 及び *in vivo* のいずれの試験においても遺伝毒性を示さなかった。
- AZD9291 を妊娠中又は授乳中のラットに投与したところ、本薬の薬理作用から予想された通り、胚の生存並びに生後初期の生存及び成長に重度の悪影響が認められた。
- AZD9291 の *in vitro* 光毒性試験において、UV 光の存在下及び非存在下で光毒性を示すデータは認められなかった。
- AZD9291 原薬中に含まれる可能性がある 4 種の不純物の変異原性について、細菌を用いる復帰突然変異試験により評価したところ、このうち 2 種の不純物（　不純物A＊　及び　不純物B＊　）に変異原性が認められた。これらの不純物のコントロールについての更なる情報は、CMC、3 項の資料に示す。

ICHQ3A, 2006ガイドラインで求められている全ての不純物について適切に安全性を確認した。AZD9291 メシル酸塩の製造工程で生じる可能性のある変異原性不純物あるいはICHM7, 2014ガイドラインに示されているような分解産物を特定するための完璧な分析を実施した（不純物、3.2.S.3.2 項を参照）。変異原性あるいは変異原性を有する可能性のある不純物については規格値又は製造工程によって制御した（不純物、3.2.S.3.2 項参照）。

AZD9291 の非臨床毒性プロファイルは、予定している適応症において許容可能なものと考えられる。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.6.2 単回投与毒性試験

AZD9291 について独自の単回投与毒性試験は実施しなかったが、急性経口投与毒性の情報は、短期投与による MTD を求めたラットの試験（3544KR 及び 793538 試験、それぞれ2.6.6.3.1.1項及び2.6.6.4.2.1項参照）及びイヌの試験（1324DD 試験、2.6.6.3.2.1項参照）の成績より得られた。

ラットを用いた 2 日間経口投与試験（3544KR 試験）では、1000 mg/kg/日投与（1/1 例）で投与後 2 時間に立毛がみられ、投与 2 日には投与後 10 分に軽度活動性低下、呼吸不整、呼吸減少、投与後 3～4 時間に軟便、円背位がみられたため、動物愛護の観点から安楽殺した。300 mg/kg/日投与では投与 1 日に摂水量増加、立毛がみられたが、6 日間の観察期間中に死亡例はみられなかった。

ラットを用いた小核試験（793538 試験）では、300 mg/kg/日を 2 日間経口投与しても一般状態の変化はみられなかった。

イヌを用いた MTD 試験（1324DD 試験における MTD 試験）では、10 mg/kg 以上の単回投与で摂餌量減少（雄のみ）及びコレステロール増加、100 mg/kg 以上の単回投与で嘔吐、200 mg/kg 以上の単回投与で体重減少及びカリウム減少、400 mg/kg の単回投与で軽度行動抑制並びに赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビンの減少（雌のみ）とナトリウム減少がみられたが、各用量を単回投与後、2 日間以上休薬して 100 mg/kg/日の用量を 5 日間投与しても死亡例はみられなかった。

以上の成績より、ラットでは 1000 mg/kg の投与（2 日間）により 1/1 例で安楽死したことから、ラットにおける概略の致死量は 300～1000 mg/kg、イヌにおける概略の致死量は 400 mg/kg 超と考えられた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

最長 3 カ月間の反復経口投与毒性試験を、ラット及びイヌを用いて実施した。1 カ月間反復投与毒性試験では、最高用量について投与終了後に 1 カ月間の回復性評価期間を設けた。これらの試験データを以下に要約するとともに、毒性試験概要表 2.6.7.6 及び 2.6.7.7 に示す。これらの試験における AZD9291 の血漿中曝露量データを表 2（AUC 及び C_{max}）に示すが、例外として 3544KR 試験については試験の要約にデータを示す（2.6.6.3.1.1項参照）。1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験における代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の曝露量データを薬物動態試験の概要文、2.6.4.3.5 項に、これらの試験で検討した最高用量でのこれらの代謝物の曝露量を表 5に要約する。

2.6.6.3.1 ラットを用いた反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 ラットを用いた最大耐量経口投与毒性試験（3544KR 試験）

概要表 2.6.7.6

本試験の目的は、AZD9291 を 2 日間経口投与したときの MTD を確認することであった。Han Wistar ラット（1 群雄 1 匹とし、AZD9291 の 300 mg/kg のみ 1 群雄 3 匹とした）に、AZD9291 を 100、300 又は 1000 mg/kg/日の用量で 2 日間連日経口投与し、その後最長 6 日間の観察期間を設けた。検査項目は一般状態観察、体重及び剖検とした。別に雄 3 匹の群を設け、300 mg/kg の用

量で単回経口投与したときの AZD9291 並びにその代謝物 AZ7550 及び AZ5104 の血漿中曝露量を測定した。

AZD9291 を 300 mg/kg の用量で投与したときの AZD9291 の AUC_{0-24} は 34400 nmol·h/L、C_{max} は 1890 nmol/L であり、AZ5104 の AUC_{0-24} は 3140 nmol·h/L、C_{max} は 175 nmol/L、AZ7550 の AUC_{0-24} は 5440 nmol·h/L、C_{max} は 319 nmol/L であった（値はいずれも平均値）。

最高用量の 1000 mg/kg/日では忍容性がみられず、この動物では活動性低下、呼吸不整、呼吸減少、立毛、軟便及び円背位等の毒性症状がみられたため、投与 2 日に動物愛護の観点から安楽殺した。300 mg/kg/日の用量での 2 回投与では忍容性がみられたものの、一般状態の変化（立毛、軟便／液状便、摂水量増加及び皮膚緊張の喪失等）及び体重減少が認められた。100 mg/kg/日の用量での 2 回投与では良好な忍容性がみられたが、投与期間中は体重が軽度に減少し、観察期間中は体重増加が認められなかった。

300 及び 1000 mg/kg/日の用量の剖検では、消化管（盲腸、結腸、胃及び／又は空腸）の膨満が観察された。

以上、雄ラットに 2 日間経口投与したときの MTD は 300 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.1.2 ラットを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験（3278DR 試験）

概要表 2.6.7.6

本試験の目的は、AZD9291 を 7 日間連日経口投与したときの MTD を確認し、毒性を検討することであった。Han Wistar 雄ラット 1 群 3 匹に媒体又は AZD9291 を 50、100 又は 200 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、7 日間経口投与した。別に TK 試験群を設けた。検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血漿生化学的検査（グルコース検査、インスリン[1]及び α-2 マクログロブリンを含む）、血漿中 AZD9291 濃度、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

全ての用量で AZD9291 の全身曝露が示され、投与期間終了時にはほぼ用量に比例していた。100 及び 200 mg/kg/日の用量での反復投与により、曝露量の増加（最大で 4.6 倍）が認められた。

AZD9291 を 100 及び 200 mg/kg/日の用量で投与したところ忍容性がみられず、重度の摂餌量減少、体重減少（最大で-13%）及び便の硬さの変化を含む一般状態の変化が両用量で認められたため、動物愛護の観点から動物を投与 6 日又は 5 日に安楽殺した。50 mg/kg/日群では 7 日間にわたり忍容性がみられたが、摂餌量減少、体重減少（最大で-10%）及び便の硬さの変化が認められた。

100 及び 200 mg/kg/日の用量では病理組織学的変化（炎症、潰瘍）が前胃（一部の動物では胃重量の増加及び肉眼所見として噴火口状陥凹を伴う）及び／又は十二指腸にみられ、摂餌量減少及び体重減少の原因となった可能性が示唆された。噴火口状陥凹は 50 mg/kg/日群の雄 1 例でも肉眼的にみられたが、それに関連した病理組織学的変化は認められなかった。胃の炎症に伴う急性相蛋白質である α-2 マクログロブリンには変化はみられなかった。肝グリコーゲン減少（100 mg/kg/日以上、肝重量減少を伴う）及び血漿トリグリセリド減少（全用量）は、摂餌量減少に起因した可能性があると考えられる。

網状赤血球数及び白血球数の減少（主にリンパ球数の減少による）が全ての用量でみられた。これらは胸骨（100 mg/kg/日以上での骨髄低細胞性）及び胸腺（全ての用量でのリンパ球単細胞壊死を含むリンパ球減少）における病理組織学的変化と関連する可能性がある。100 及び

[1] AZD9291 はインスリン様成長因子 1 受容体（IGF1R）/インスリン受容体（InsR）をに対する良好な選択性を有するようにデザインされた。グルコース及びインスリンの *in vivo* での効果を確認するために本試験で測定した。

200 mg/kg/日群の一部の動物でみられた好中球数の増加は、消化管の病理学的変化と関連する可能性がある。

血漿生化学的変化（主に無機リン及びカリウムの増加並びにトリグリセリド、総蛋白及びナトリウムの減少）は軽微で一部の動物にのみみられる場合が多く、それに関連する病理組織学的所見は認められなかった。これらの所見は主に高用量でみられ、これらの動物の状態悪化に起因して生じた可能性がある。

その他のパラメータには、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 を雄ラットに 50 mg/kg/日の用量で 7 日間反復経口投与したところ忍容性がみられたが、摂餌量減少及び体重減少が認められた。100 及び 200 mg/kg/日の用量での反復投与では、重度の摂餌量減少及び体重減少がみられたため忍容性は認められなかった。病理組織学的所見が 100 mg/kg/日以上の用量で胃、十二指腸、肝臓及び胸骨に、50 mg/kg/日以上の用量で胸腺に観察された。

2.6.6.3.1.3 ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（3310DR 試験）

概要表 2.6.7.6

本試験の目的は、AZD9291 をラットに最長 14 日間投与したときの毒性を予備的に評価することであった。1 群雌雄各 4 匹からなる 4 群の Han Wistar ラットに、AZD9291 を 1 日 1 回、14 日間経口投与した。用量は 0、20、40 又は 60 mg/kg/日とした。別に TK 試験群を設けた。

検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血漿生化学的検査（グルコース検査、インスリン[2]を含む）、尿検査、血漿中 AZD9291 濃度、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。また、体温並びに呼吸系、消化管系、中枢神経系及び視覚系の機能を、60 mg/kg/日群の雌雄については投与 3 日に、60/40 mg/kg/日群（雄／雌）については投与 9 日に評価した。

AZD9291 は対照群から採取したサンプル中には検出されなかった。AZD9291 の曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24}）はほぼ用量に比例して増加し、反復投与後と単回投与後で同程度であった。40 及び 60 mg/kg/日群では、雌は雄と比較して曝露量が幾分高い値を示していた。

40 及び 60 mg/kg/日群の雌では忍容性がみられず、これらの動物では摂餌量減少、体重減少（60 mg/kg/日で最大-17.5%、40 mg/kg/日で最大-16%）に加えて円背位、立毛、活動性低下、爪先歩行、皮膚緊張の喪失、呼吸不整、軟便／液状便並びに泌尿／肛門性器部、外鼻腔及び／又は眼の汚れといった一般状態の変化がみられたため、それぞれ投与 13 日及び 8 日に安楽殺した。

40 及び 60 mg/kg/日群の雄では忍容性がみられたが、活動性低下、立毛、円背位、鼻口部の汚れといった一般状態の変化並びに摂餌量及び体重増加量の減少（40 mg/kg/日群では対照群と比較して-6%）又は体重減少（60 mg/kg/日群で最大-8.5%）が認められた。20 mg/kg/日群では雌雄ともに忍容性がみられたが、雌では軽度の摂餌量減少が認められた。

60 mg/kg/日/群において投与 3 日に糞粒数が減少したが、投与 9 日には被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

[2] AZD9291 は IGF1R/InsR に対する良好な選択性を有するようにデザインされた。グルコース及びインスリンの *in vivo* での効果を確認するために本試験で測定した。

OptoMotry を用いた検査（方法はRedfern et al, 2011の報告に基づく）では、軽微な視力低下が、60 mg/kg/日群の雄 2 例及び 40 mg/kg/日群の雌 1 例で投与 9 日に認められた。これらの変化は病理組織学的所見の角膜上皮萎縮に関連して生じた可能性がある。

全ての用量（20 mg/kg/日群の雌を除く）でみられた網状赤血球数減少は骨髄の病理組織学的所見（低細胞性）に一致するものであり、白血球パラメータの増加（好中球数及び単球数は全ての用量で、リンパ球数は 40 mg/kg/日以上の用量で）は、腸の上皮萎縮により誘発された炎症性変化に伴って二次的に生じた可能性があると考えられる。

40 mg/kg/日以上の用量で、血漿生化学的パラメータの変化として、クレアチニン増加（雌）並びに ALP（40 mg/kg/日群の雄を除く）、総蛋白、アルブミン、グロブリン、カルシウム（40 mg/kg/日群の雌を除く）及びグルコース（雌）の減少が認められた。60 mg/kg/日群では尿素の増加並びにトリグリセリド、コレステロール（雄）及び無機リン（雄）の減少もみられた。これらの変化は摂餌量減少に伴って生じた可能性があると考えられる。

用量に依存した尿蛋白の減少が全ての用量群の雄にみられたが、それに関連する病理組織学的所見は認められなかったことから、この所見の毒性学的意義は不明である。

被験物質投与に関連する病理組織学的所見が 60 mg/kg/日群の雌雄で眼（炎症性細胞浸潤を伴う又は伴わない角膜の上皮萎縮）、胸腺（リンパ球溶解を伴う又は伴わない低細胞性）及び骨髄（低細胞性）にみられ、この群の雌では肝臓（摂餌量減少による二次的変化と考えられるグリコーゲン減少）及び小腸（絨毛／上皮の萎縮及び／又は上皮の変性／壊死／炎症）にも認められた。肝臓、胸腺、骨髄及び小腸の所見は 40 mg/kg/日群の雌にもみられ、眼の所見が 20 mg/kg/日群（雌）及び 40 mg/kg/日群（雌雄）で認められた。60 mg/kg/日群の雄では脾臓及び肝臓の重量減少もみられ、40 mg/kg/日以上の群の雄では胸腺重量減少も認められた。

他のいずれのパラメータにおいても、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 を 40 及び 60 mg/kg/日の用量で 14 日間反復経口投与したところ、雌ラットでは体重及び摂餌量の減少並びに毒性症状が認められ、忍容性がみられなかった。雄ラットでは 60 mg/kg/日までの用量で 14 日間にわたり忍容性がみられたが、毒性症状（60 mg/kg/日群のみ）、体重増加量減少／体重減少（40/60 mg/kg/日群）及び摂餌量減少が認められた。20 mg/kg/日の用量では雌雄ともに 14 日にわたり忍容性がみられた。病理組織学的変化が 40 及び 60 mg/kg/日群では眼、肝臓、胸腺、骨髄及び小腸に、20 mg/kg/日群の雌では眼に認められた。

2.6.6.3.1.4 ラットを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（4 週間回復性試験を含む）（3416AR 試験）

概要表 2.6.7.7

本試験の目的は、AZD9291 をラットに 1 カ月間連日経口投与して誘発される毒性の検討及びその後の回復性の評価であった。1 群雌雄各 10 匹からなる 4 群の Han Wistar ラットに、AZD9291 を 1 日 1 回、1 カ月間経口投与した。投与量はラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験（3310DR 試験）の成績に基づいて設定した。14 日間反復投与毒性試験では、60 mg/kg/日群の雄及び 20 mg/kg/日群の雌で忍容性が認められた。40 及び 60 mg/kg/日群の雌では体重及び摂餌量の減少並びに毒性症状がみられ、それぞれ投与 13 日及び 8 日に安楽殺された。60 mg/kg/日群の雄では忍容性はみられたが、体重及び摂餌量の減少並びに毒性症状がみられた。これらのことから、高用量は雄では 40 mg/kg/日、雌では 20 mg/kg/日とした。中用量は毒性の用量反応性を明らかにできると考えられる 10 mg/kg/日とした。低用量は無影響量であることが期待され、臨床用量（80

mg）における AUC を上回ることが期待される 4 mg/kg/日とした。以上のことから用量は雄で 0、4、10 又は 40 mg/kg/日、雌で 0、4、10 又は 20 mg/kg/日とした。別に TK 試験群（1 群雌雄各 3 匹）及び高用量で投与終了後の回復性を 4 週間評価する群（対照群及び高用量群；1 群雌雄各 5 匹）を設けた。

検査項目は、一般状態観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、摂水量、糞数及び外観、血液学的検査、血漿生化学的検査（グルコース検査[3]を含む）、尿検査、血漿中 AZD9291 及び代謝物 AZ7550 濃度（代謝物 AZ5104 は血漿中の存在が確認されたが、分析方法の問題により定量されなかった）、肝臓における CYP アイソフォーム、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

対照動物の血漿サンプル中には、AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 は検出されなかった。全ての用量において AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 への全身曝露が示された。AZD9291 の曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は投与 1 日にはほぼ用量に比例して増加したが、投与 28 日には用量比を下回った。AZ7550 の曝露量は投与 1 及び 28 日にほぼ用量に比例して増加したが、例外として投与 28 日の C_{max} は用量比を下回って増加した。10 mg/kg/日群では雌の曝露量の方が全体により高く、AZD9291 の曝露量には性差がある可能性が示唆された。

AZD9291 又は AZ7550 の曝露量には反復投与による明らかな変化はみられなかったが、例外として 40 mg/kg 群の雄では投与 28 日の曝露量が減少した（AZD9291 及び AZ7550 の AUC_{0-24} がそれぞれ約-32%及び-36%）。これに伴う高用量群の動物の肝臓での CYP1A、CYP2B、CYP3A 又は CYP4A 蛋白質濃度の増加は認められなかった。

雄では 40 mg/kg/日、雌では 20 mg/kg/日までの用量で 1 カ月間にわたり忍容性がみられた。雄では 40 mg/kg/日の用量で体重増加量減少（対照群と比較して-50%）、摂餌量減少（最大で-20%）並びに立毛及び鼻口部痂皮形成といった一般状態の変化が認められた。20 mg/kg/日群の雌 1 例に立毛がみられた。

10 mg/kg/日以上の群の雄でヘモグロビン及びヘマトクリットの軽度の減少がみられた。40 mg/kg/日群の雄では主に好中球数、リンパ球数及び単球数の増加に起因する総白血球数の軽度の増加が認められた。4 mg/kg/日群の雄 1 例で白血球数の軽度の増加がみられた。これらの所見は、皮膚等の組織の上皮萎縮により誘発された炎症性変化に対する二次的反応を示す可能性があると考えられる。

40 mg/kg/日群の雄でトリグリセリド、コレステロール、総蛋白、アルブミン及びグロブリンの軽度の減少がみられたが、これらは摂餌量減少に起因して生じた可能性がある。総蛋白及びアルブミンの軽度の減少は、20 mg/kg/日群の雌にも認められた。

雄では 40 mg/kg/日、雌では 20 mg/kg/日の用量で被験物質投与に関連する病理組織学的所見が、眼（角膜上皮萎縮）、皮膚及び／又は鼻口部（炎症性細胞浸潤、表皮の毛包異形成及び／又は潰瘍／びらん）、舌（上皮萎縮）、腸間膜リンパ節（雄における洞内赤血球及び赤血球貪食）、精巣（精子細胞停留及び精細管変性）、精巣上体（精子減少、細胞残屑増加及び精巣上体重量減少）及び子宮／卵巣（子宮の上皮菲薄化、炎症性細胞浸潤及び／又は上皮変性並びにそれに伴う卵巣の黄体変性及び炎症性細胞浸潤を特徴とする周期的な発情休止期像の発現率増加）に認められた。また、胸腺重量減少が 40 mg/kg/日群の雄及び 20 mg/kg/日群の雌にみられ、40 mg/kg/日群の雄では肝臓及び前立腺の重量減少も認められた。

[3] AZD9291 は IGF1R/InsR に対する良好な選択性を有するようにデザインされた。グルコース及びインスリンの *in vivo* での効果を確認するために本試験で測定した。

同様の病変が 10 mg/kg/日群では眼、舌（雌のみ）、精巣（精子細胞停留）及び卵巣／子宮にみられ、4 mg/kg/日群では眼に認められた。

これらの所見は 1 カ月間の休薬後にはみられなかったことから、全ての標的器官における完全な回復性が示唆された。唯一の例外は、休薬期間終了時に雌 1 例でみられた軽微な角膜上皮萎縮であった。

他のいずれのパラメータにおいても、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 をラットに 4、10 及び 40/20 mg/kg/日（それぞれ雄／雌）の用量で 1 カ月間反復経口投与したところ、忍容性が認められた。被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、40/20 mg/kg/日群で眼、皮膚／鼻口部、舌、精巣、精巣上体、子宮、卵巣及び腸間膜リンパ節（雄のみ）にみられた。舌（雌のみ）、精巣、子宮及び卵巣の所見は 10 mg/kg/日群でもみられ、眼の所見は 4 及び 10 mg/kg/日群でも認められた。無影響量及び無毒性量は確定できなかった。これらの所見は 4 週間の休薬後にはみられなかった（例外は雌 1 例における軽微な角膜上皮萎縮）ことから、回復性が示唆された

2.6.6.3.1.5 ラットを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（526248 試験）

概要表 2.6.7.7

本試験の目的は、AZD9291 をラットに 3 カ月間連日経口投与して誘発される毒性を検討することであった。1 群雌雄各 10 匹からなる 4 群の Han Wistar ラットに、AZD9291 を 1 日 1 回、最長 92 日間経口投与した。投与量はラットを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（3416AR 試験）の成績に基づき、0、1、10 又は 40/20 mg/kg/日（雄/雌）とした。すなわち、3416AR 試験において雄では 40 mg/kg/日、雌では 20 mg/kg/日までの用量で忍容性がみられた。40 mg/kg/日群の雄で体重増加量及び摂餌量の減少並びに立毛及び鼻口部痂皮形成、20 mg/kg/日群の雌 1 例に立毛がみられた。病理組織学的所見が眼、皮膚、舌、腸間膜リンパ節及び雌雄生殖器にみられたが、用量制限性の所見ではなかった。高用量は 3 カ月間投与に耐えられることを期待して 40 mg/kg/日（雄）、20 mg/kg/日（雌）を、低用量は無影響量又は無毒性量となることが期待される 1 mg/kg/日を、中用量は毒性の用量反応性を明らかにする 10 mg/kg/日を設定した。高用量群の雄には投与 1 日から 55 日まで 40 mg/kg/日の用量で投与したが、重度の毒性症状がみられたため試験 56 日から休薬し、20 mg/kg/日に減量して試験 62 日から投与期間終了時まで投与を実施した。別に TK 試験群（1 群雌雄各 3 匹）を設けた。雄受胎能を評価するため、10/11 週に主試験群のそれぞれの雄ラットを無処置雌ラットと 1 : 1 で同居させた。

検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学的検査、尿検査、尿化学的検査、血漿中 AZD9291 及び代謝物 AZ7550 濃度（AZ5104 については、実サンプルの再現性が本分析対象物の許容基準を満たさなかったため、TK パラメータを算出しなかった）、器官重量、剖検、病理組織学的検査及び雄受胎能（交尾能及び妊娠成績）とした。

対照動物の血漿サンプル中には、AZD9291 又はその代謝物である AZ7550 及び AZ5104 は検出されなかった。AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 への全身曝露が全ての用量で示された（AZ5104 については TK パラメータを算出しなかった）。AZD9291 の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、雌雄でほぼ用量に比例して増加した。AZ7550 については、雌雄で低用量と中用量の間で AUC の増加が用量比を上回り、C_{max} は概ね用量に比例して増加した。AZD9291 の曝露量は AZ7550 よりも大

きかった。AZD9291 の曝露量は一貫して雌が雄より大きく、AZ7550 の曝露量には性差は認められなかった。

AZD9291 を 40 mg/kg/日の用量で投与したところ、雄では毒性的な一般状態の変化（鋤起こし様動作、皮膚剥離、痂皮形成及び／又は発赤、活動性低下、円背位、軟便／液状便、立毛及び異常歩行）、体重減少及び摂餌量減少により良好な忍容性がみられなかったため、高用量群の雄については試験 56 日から休薬した。これらの動物では一般状態、体重及び摂餌量に回復性がみられたため、試験 62 日により低い 20 mg/kg/日の用量で投与を再開した。減量後、雄には乾燥被毛、粗毛及び皮膚剥離がみられた。投与期間終了時において、全体の体重増加量減少が対照群と比較して認められた（対照群と比較して-35%）。

1、10 及び 20 mg/kg/日の用量では、雌雄ともに良好な忍容性が認められた。20 mg/kg/日群の雌では鋤起こし様動作、円背位、異常歩行、皮膚剥離、痂皮形成、乾燥被毛及び粗毛といった一般状態の変化がみられた。10 mg/kg/日群では相当数の動物に皮膚剥離及び痂皮形成がみられ、体重増加量減少（雄では対照群と比較して-10%）が認められた。1 mg/kg/日群の動物にみられた唯一の一般状態の変化は、雄 1 例で 2 回観察された痂皮形成である。本施設ではラットの背景所見として痂皮が散見されること、また、この動物では一過性にみられたのみであることから、この所見と被験物質との関連は不明であった。

白血球数（主に雌雄で好中球数、単球数、好塩基球数及び雄でリンパ球数の増加による）、フィブリノゲン及びグロブリンの軽度増加並びにアルブミン及びアルブミン：グロブリン比の軽度減少が、40/20 mg/kg/日群の雄及び 20 mg/kg/日群の雌にみられたが、これらは皮膚で観察された炎症性変化に関連すると考えられた。

尿量の減少及び尿成分の変化（高用量群でみられた一部は蛋白質：クレアチン比増加を伴う尿比重増加及び／又は血液の存在並びに 10 mg/kg/日以上の群の雌における N アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ：クレアチニン比増加）に伴う病理組織学的所見は認められなかったことから、これらの変化の毒性学的意義は曖昧なものと考えられた。

40/20 mg/kg/日群の雄及び 20 mg/kg/日群の雌において、被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、角膜上皮（主にびまん性菲薄化）、食道、舌、前胃（一部の動物では潰瘍を伴う）、皮膚（痂皮形成及び／又は過角化を伴う場合もある毛包異形成を伴った毛包／毛包周囲炎症）、腟及び子宮（子宮重量減少を伴う）にみられ、それに伴って雄の乳腺（腺萎縮）、精巣（精子細胞停留；前立腺及び精巣上体重量減少）、ハーダー腺（変性／再生／単細胞壊死及びリンパ球浸潤）、肺（泡沫状肺胞マクロファージ集簇の発現頻度増加）、脾臓（造血亢進）及び腸間膜リンパ節（赤血球貪食；暗色化の肉眼所見）に認められた。

角膜、食道、舌、皮膚（雌）、腟、子宮（及び子宮重量減少）、精巣、ハーダー腺、肺（雄）及び脾臓（雌）の病理組織学的所見は 10 mg/kg/日群にも認められた。1 mg/kg/日群では、被験物質投与に関連する病理組織学的所見及び器官重量の変化はみられなかった。

高用量群の動物から採取した肺について、別の機序的試験で電子顕微鏡検査により更に評価した（2.6.6.9.2.1項参照）

40/20 mg/kg/日群の雄を無処置雌と交配させたとき、生存着床数の減少及び着床前胚死亡率の増加がみられたことから、雄受胎能に対する AZD9291 の影響が示唆された。1 及び 10 mg/kg/日の用量では、雄受胎能への影響は認められなかった。

その他のパラメータについては、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 40 mg/kg/日の用量で雄ラットに経口投与したところ良好な忍容性がみられず、毒性症状、体重減少及び摂餌量減少が認められたため、試験 56 日から休薬し、その後試験 62 日から 20 mg/kg/日に減量した。1、10 及び 20 mg/kg/日の用量では雌雄ともに最長 3 カ月にわたり良好な忍容性がみられたが、10 mg/kg/日以上の用量では一般状態の変化が認められた。被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、10 mg/kg/日以上の用量で皮膚（雌）、角膜、食道、舌、精巣、子宮、膣、ハーダー腺、肺及び脾臓にみられ、40/20 mg/kg/日（雄）及び 20 mg/kg/日（雌）の用量ではさらに胃、雄の乳腺及び腸間膜リンパ節に認められた。40/20 mg/kg/日群では雄受胎能への影響が示唆された。無影響量及び無毒性量は低用量の 1 mg/kg/日であった。

2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 イヌを用いた MTD 及び 14 日間反復投与毒性試験（1324DD 試験）

概要表 2.6.7.6

本試験の目的は、イヌにおける AZD9291 の毒性を予備的に評価することであった。用量漸増で得られた結果は、非げっ歯類動物種における本薬の急性毒性評価とみなすことができる。

用量漸増相においては、雌雄ビーグル犬各 1 匹に、AZD9291 の 10、30、100、200 及び 400 mg/kg の用量での単回経口投与を、それぞれの投与間に 2 日以上の休薬日をおいて実施し、その後 100 mg/kg/日の用量で 5 日間連日投与した。最終投与後 10 日間観察した後、安楽殺して剖検した。反復投与相では、1 群雌雄各 1 匹のイヌに 10、20、40 又は 60 mg/kg/日の用量で最長 14 日間経口投与した。これらのイヌは最終投与の翌日に安楽殺して剖検した。

用量漸増相及び反復投与相における検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血漿生化学的検査（グルコース検査、インスリンを含む）及び AZD9291 血漿中濃度とした。また、反復投与相においては、心電図検査、血圧、眼科学的検査、尿検査、リンパ球サブセット、剖検及び病理組織学的検査も実施した。

AZD9291 の曝露量にはばらつきがみられたが、$AUC_{0\text{-}24}$ 及び C_{max} はいずれの試験相においても概ね用量に比例して増加した。反復投与相では投与 1 日から 7/8 日にかけて概ね軽度の曝露量増加がみられたが、投与 14 日までに更なる増加は認められなかった。

用量漸増相では、400 mg/kg までの用量での単回投与後に 100 mg/kg/日の用量で連日 5 日間投与したところ忍容性がみられ、一般状態の変化（主に嘔吐が 100 mg/kg 以上の群でみられ、400 mg/kg 群の雄では複数回の嘔吐及び行動抑制が認められた）、体重減少（200 mg/kg 以上の用量での単回投与後に雄でみられ、100 mg/kg/日の用量での反復投与後に雌雄で認められた）及び摂餌量減少が認められた。

反復投与相では、20 mg/kg/日以上の群の雄及び 40 mg/kg/日以上の群の雌で忍容性がみられず、これらのイヌは、主として摂餌量減少、体重減少及び一般状態の変化（結膜発赤、嘔吐、軽度の行動抑制／活動性低下、四肢冷感、振戦、軽度の運動失調、散発的な軟便／液状便及び／又は赤色便等）がみられたことにより、動物愛護の理由で投与 6 日から 8 日の間に安楽殺した。10 mg/kg/日群の雌雄及び 20 mg/kg/日群の雌では 14 日間にわたり忍容性がみられ、軽微な一般状態の変化（低頻度の嘔吐及び糞便異常）及び軽度の体重減少がみられたが、20 mg/kg/日群の雌では摂餌量減少、眼の病変（眼科学的検査でみられた上皮びらんを示す所見を伴う角膜半透明化）及び流涙も認められた。

反復投与相では動脈血圧の上昇がみられたが、これらの変化は忍容性がみられない用量（40 mg/kg/日以上）又は忍容性が低い用量（20 mg/kg/日）のみで認められたことから、これらの動物の臨床状態がこのパラメータにみられた散発的な変化及びばらつきに寄与した可能性がある。心電図パラメータには一貫した変化は認められなかった。

被験物質投与に関連する病理組織学的所見が、腸、眼、皮膚及び舌に認められた。腸の病変（軽度の上皮変性及び浮腫による二次的な炎症性細胞浸潤）が忍容性がみられない用量（雄では 20 mg/kg/日以上、雌では 40 mg/kg/日以上）のみでみられたのに対し、皮膚の病変（表皮変性）、舌の病変（軽度の上皮びらん／潰瘍を伴う上皮萎縮）及び眼の病変（散発的な潰瘍／びらんを伴う角膜上皮萎縮）は全ての用量で認められた。

臨床病理検査における変化の一部は、皮膚及び／又は消化管の病理組織学的変化への二次的反応を示すと考えられる軽度の炎症過程を示唆するものであった。これらの変化には、両試験相でみられた軽度の白血球数増加（好中球、単球及び大型未染色細胞）並びに反復投与相でみられた総蛋白及びグロブリンの増加が含まれていた。両試験相でみられた軽度の ALP 増加並びに軽度の赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビンの減少（反復投与相では 60 mg/kg/日の用量で網状赤血球数減少を伴う）は、消化管の炎症性変化に関連して生じた可能性がある。

両試験相において、コレステロール及びトリグリセリドの軽度から中等度の増加が認められた。用量漸増相では、カリウム及びナトリウムの軽度の減少も認められた。反復投与相においては、血小板数の重度な減少（末梢血塗抹標本では巨大血小板がみられた）、ナトリウム及びクレアチニンの軽度から中等度の減少並びに無機リンの軽度から中等度の増加もみられた。反復投与相では一部の動物（40 mg/kg/日群の雄及び 10 mg/kg/日群の雌）でインスリンの軽度の増加がみられたものの一過性であり、グルコースの変化を伴わなかったことから、これらの変化は毒性学的意義のないものと考えられた。

他のいずれのパラメータにおいても、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 は 400 mg/kg までの用量での単回経口投与により忍容性がみられ、毒性症状、体重減少及び摂餌量減少が認められた。AZD9291 を雄では 20 mg/kg/日以上、雌では 40 mg/kg/日以上の用量で反復経口投与したところ、一般状態の変化、摂餌量減少及び体重減少がみられたため、忍容性はみられなかった。より低い用量の 10 mg/kg/日では雌雄で、20 mg/kg/日では雌で、それぞれ 14 日間にわたり忍容性がみられたが、一般状態の変化及び軽度の体重減少が両用量で、摂餌量減少及び眼の病変が 20 mg/kg/日で認められた。病理組織学的所見が、皮膚、舌及び眼については全ての用量で、腸については 20 mg/kg/日以上の用量で観察された。

2.6.6.3.2.2 イヌを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（4 週間回復性試験を含む）（1351AD 試験）

概要表 2.6.7.7

本試験の目的は、AZD9291 をイヌに 1 カ月間連日経口投与して誘発される毒性を検討するとともに、その回復性を評価することであった。1 群雌雄各 3 匹からなる 4 群のビーグル犬に、AZD92921 を 1 カ月間反復経口投与した。投与量はイヌを用いた MTD 及び 14 日間反復投与毒性試験（1324DD 試験）の成績に基づき 0、2、6 又は 20 mg/kg/日の用量を設定した。すなわち、1324DD 試験において 10 mg/kg/日の用量では 14 日間の投与で忍容性がみられ、軽度の体重減少が認められ反復投与での MTD と考えられた。20 mg/kg/日以上の用量では 14 日間の投与で忍容性がみられず、これらの動物は一般状態の変化（嘔吐、行動抑制、運動失調及び四肢冷感）、食欲

不振及び体重減少がみられたことにより、早期安楽殺した。この試験において AZD9291 の曝露量には大きなばらつきがみられ、次に実施した薬物動態試験では、本試験に使用した化合物のバッチによる 20 mg/kg/日の単回投与の曝露量が 1324DD 試験（反復投与相）の 10 mg/kg/日の曝露量に類似していた。1324DD 試験からの忍容性データ及び薬物動態試験の曝露量データに基づき、20 mg/kg/日が本試験の適切な最高用量であると考えられ、1 カ月間の投与に耐えうることが期待された。より低用量（2 及び 6 mg/kg/日）は用量反応性を評価するのに適切であると考えられた。高用量群として 20 mg/kg/日で投与を開始したが、重度の一般状態の変化がみられため試験 8 日から 10 日まで休薬し、12 mg/kg/日に減量して試験 11 日から投与を再開した。高用量については別の動物（雌雄各 3 匹）をおき、投与期間終了後に 4 週間の休薬期間を設けた。

検査項目は、一般状態観察、心電図検査、血圧、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学的検査（グルコース検査、インスリン[4]を含む）、尿検査、AZD9291 並びに代謝物 AZ7550 及び AZ5014 の血漿中濃度、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

対照群の動物の血漿サンプル中には AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 は検出されなかった。全ての用量で AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 への曝露が示された。AZD9291 の曝露量は投与 1 日にはほぼ用量に比例して増加したが、投与 28 日には用量比をわずかに下回った。AZ7550 及び AZ5104 の曝露量はほぼ用量比例的であったが、例外として投与 15 及び 28 日の AZ5104 の曝露量は用量比をわずかに下回った。反復投与後の AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 の曝露量は、単回投与と比較して概ね高かった（最大で約 2 倍）。AZD9291 又はその代謝物の曝露量には、明らかな性差は認められなかった。

20 mg/kg/日の用量では、主に眼の症状及び眼科学的所見（角膜の半透明化、潰瘍／びらん、結膜の発赤及び流涙）がみられ、忍容性はみられなかった。摂餌量減少（最大で-95%）及び体重減少（投与 1 日と比較して最大で-11%）もみられ、その他の一般状態の変化（流涎、歯肉及び／又は舌の褪色化並びに投与 7/8 日に動物 1 例でみられた軽度かつ一過性の運動失調及び行動抑制）も低頻度で認められた。これらの所見の回復性又は部分的回復性が、大部分の動物で投与中止後（試験 8～10 日）又はより低い用量の 12 mg/kg/日での投与を試験 11 日から再開して間もなく認められた。

6 mg/kg/日までの用量では、一部の動物で軽度の摂餌量減少（最大で-20%）及び体重減少（最大で約-10%）が概ね 1 週及び／又は 2 週にみられ、その後回復した。糞便異常（全ての用量での軟便、液状便、赤色便及び／又は粘液含有便）及び嘔吐（6 mg/kg/日以上）が低頻度でみられ、用量依存性が認められた。

被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、20/12 mg/kg/日の用量で眼（角膜上皮萎縮）、十二指腸（粘膜萎縮）、回腸（急性炎症性細胞浸潤）、舌（上皮萎縮）及び皮膚（表皮萎縮）に認められた。眼及び舌の所見は 6 mg/kg/日でも観察された。精巣（精細管萎縮）及び精巣上体（円形胚細胞の存在）の所見が 2 及び 6 mg/kg/日でみられたが、20/12 mg/kg/日では認められなかった。しかしながら、被験物質投与に関連する精巣の病理学的変化が、その後イヌ 3 カ月間反復投与毒性試験でみられ、ラットの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験でも認められた。

フィブリノゲンの軽度の増加が 20/12 mg/kg/日で、コレステロールの軽度の増加が全ての用量でみられ、軽度のアルブミン減少が高用量群の雄に認められた。全ての用量で相当数の動物に軽度のインスリン増加がみられたが、一過性かつ用量依存性のない変化でグルコースの変化を伴わなかったことから、これらの変化は毒性学的意義がないと考えられた。

[4] AZD9291 は IGF1R/InsR に対する良好な選択性を有するようにデザインされた。グルコース及びインスリンの *in vivo* での効果を確認するために本試験で測定した。

4 週間の休薬後の動物における唯一の所見は眼科学的検査でみられた角膜半透明化であったが、その発現頻度及び重症度には低下がみられ、病理組織学的変化を伴わなかったことから、この変化の明らかな回復性が示唆された。

他のいずれのパラメータにおいても、AZD9291 に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 を 20 mg/kg/日の用量でイヌに経口投与したところ忍容性はみられず、眼科学的検査で角膜上皮のびらん／潰瘍が検出されただけでなく、摂餌量減少、体重減少及び一般状態の変化も認められたことから、試験 8～10 日にかけて休薬した。試験 11 日から用量を 12 mg/kg/日に減量したところ、これらの変化は概ね回復性を示すデータが認められた。2 及び 6 mg/kg/日の用量では良好な忍容性がみられ、軽微な一般状態の変化並びに軽度の摂餌量減少及び体重減少が認められた。病理組織学的変化が 20/12 mg/kg/日で眼、十二指腸、回腸、舌及び皮膚にみられた。眼及び舌の所見は 6 mg/kg/日でも認められた。精巣及び精巣上体の所見が 2 及び 6 mg/kg/日でみられたが、20/12 mg/kg/日では認められなかった。無影響量及び無毒性量は確定できなかった。4 週間の休薬後にはいずれの標的器官においても病理組織学的所見はみられず、回復性が示唆された。

2.6.6.3.2.3 イヌを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（526253 試験）

概要表 2.6.7.7

本試験の目的は、AZD9291 をイヌに 3 カ月間連日経口投与して誘発される毒性を検討することであった。1 群雌雄各 4 匹からなる 4 群のビーグル犬に、AZD9291 を 1 日 1 回、最長 92 日間経口投与した。投与量はイヌを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（1351AD 試験）成績に基づき、0、1、3 又は 10 mg/kg/日とした。すなわち、1351AD 試験において当初の高用量（20 mg/kg/日）群では、眼の所見、体重及び摂餌量の減少により忍容性は認められなかった。投与 8 日から休薬したところ、これらの所見は改善がみられたため投与 11 日から 12 mg/kg/日に減量して投与を再開した。減量した 12 mg/kg/日では残りの投与期間には忍容性を示した。この成績に基づいて高用量を 10 mg/kg/日とし、低用量は無影響量又は無毒性量が期待される 1 mg/kg/日を、中用量は毒性の用量反応性を明らかにする 3 mg/kg/日を設定した。高用量群として 10 mg/kg/日で投与を開始したが、重度の一般状態の変化がみられたため、投与 23 日以降、6 mg/kg/日に減量した。

検査項目は、一般状態観察、心電図検査、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学的検査、尿検査、尿化学的検査、AZD9291 並びにその代謝物 AZ7550 及び AZ5104 の血漿中濃度（AZ5104 については、実サンプルの再現性が本分析対象物の許容基準をみたさなかったため、TK パラメータを算出しなかった）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

対照動物の血漿サンプル中には、AZD9291 並びにその代謝物 AZ7550 及び AZ5104 は検出されなかった。全ての用量で AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 への曝露が示された（AZ5104 については TK パラメータを算出しなかった）。AZD9291 及び AZ7550 の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、用量範囲全体でほぼ用量に比例して増加した。AZD9291 の曝露量はその代謝物 AZ7550 の曝露量より大きかった。AZD9291 及び AZ7550 の曝露量には性差は認められなかった。

10 mg/kg/日の用量では、眼の症状（結膜発赤、閉眼、半眼及び分泌物）及びそれに伴う角膜上皮潰瘍／びらん（フルオレセイン色素で陽性に染色される領域）が雄 4 例全例、雌 4 例中 3 例のイヌにみられ、忍容性はみられなかった。このため、一部の動物では投与 9 日から 25 日にかけて短期間休薬し、全例について投与 23 日より 6 mg/kg/日に減量した。これらの一般状態の変化は

休薬期間中又は減量後に回復し、6 mg/kg/日の用量では残りの投与期間中に良好な忍容性がみられ、一般状態の変化は軽微であった（散発的な軟便／液状便及び嘔吐）。10 mg/kg/日では体重減少及び摂餌量減少（雌）がみられたものの、減量後は回復し、投与期間終了時には対照群と同程度であった。

1 及び 3 mg/kg/日の用量では良好な忍容性が認められた。中用量群の雄 2 例で一過性の結膜発赤及び分泌物（投与 5～9 日）がみられたが、投与継続中に解消した。

眼科学的検査では、高用量群の相当数の動物に、角膜半透明化（投与 7 日以降）及び白濁（8 週以降）が観察された。

被験物質投与に関連する臨床病理検査パラメータの変化（フィブリノゲン及び好中球数の増加並びにアルブミン及びカルシウムの減少）は高用量群のみにみられたが、例外としてコレステロールの増加は全ての用量で認められた。カルシウムの減少はアルブミンの減少による二次的変化と考えられる。全体として、これらの変化は軽微であり、病理組織学的変化を伴わなかったことから、その毒性学的意義は不明である。

被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、10/6 mg/kg/日群の動物で眼（角膜上皮萎縮）、精巣（精細管萎縮）及び精巣上体（精子減少）に認められた。これらの所見は 1 及び 3 mg/kg/日群の動物にはみられなかった。

他のいずれのパラメータにおいても、AZD9291 の投与に関連すると考えられる毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上、AZD9291 をイヌに 10 mg/kg/日の用量で経口投与したところ、眼の症状が認められ、忍容性がみられなかったことから、一部の動物では投与 9 日から投与 25 日にかけて短期間休薬し、全例について投与 23 日より 6 mg/kg/日に減量した。これらの一般状態の変化は回復し、6 mg/kg/日の用量では残りの投与期間中に良好な忍容性がみられ、一般状態の変化は軽微であった。1 及び 3 mg/kg/日の用量では 3 カ月間にわたり良好な忍容性がみられ、3 mg/kg/日群の雄 2 例で一過性の眼の症状が認められた。被験物質投与に関連する病理組織学的変化が 10/6 mg/kg/日群で眼、精巣及び精巣上体に観察された。3 mg/kg/日群における眼の所見は一過性であったことから、無毒性量は 3 mg/kg/日であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

AZD9291 について *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験を実施した。その結果を以下に記載するとともに表 3に要約する。

2.6.6.4.1 *In vitro*

2.6.6.4.1.1 細菌を用いる変異原性試験による遺伝毒性評価（793061 試験）

概要表 2.6.7.8

本試験の目的は、細菌を用いて AZD9291 の復帰突然変異誘発能の有無を評価することであった。用量設定試験で細胞毒性がみられなかった 333 μg/プレートまでの濃度範囲において、遺伝子改変したサルモネラ菌 LT2 の TA1535、TA1537、TA98 及び TA100 株並びに大腸菌 WP2 *uvrA*

（pKM101）株を指示菌とし、ラット肝由来代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下で検討を行った。

本試験の条件下において、AZD9291 は、サルモネラ菌及び大腸菌に対して変異原性を示さないと結論された。

2.6.6.4.1.2 マウスリンフォーマ細胞チミジンキナーゼ遺伝子座試験を用いた遺伝毒性評価（793056 試験）

概要表 2.6.7.8

本試験の目的は、L5178Y マウスリンフォーマ細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座における AZD9291 の前進突然変異誘発能の有無を判定することであった。AZD9291 の 5 µmol/L（S9 mix 非存在下）及び 10 µmol/L（S9 mix 存在下）までの濃度範囲で検討を行った。

AZD9291 はマウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた試験で変異原性を示さないと結論された。

2.6.6.4.2 *In vivo*

2.6.6.4.2.1 ラット小核試験を用いた遺伝毒性評価（793538 試験）

概要表 2.6.7.9

本試験の目的は、AZD9291 を、Han Wistar 雄ラット（1 群 7 匹）に、0、30、150 又は 300 mg/kg/日の用量で、2 回経口投与（24 時間間隔）したときの染色体損傷誘発能の有無を *in vivo* で評価することであった。本試験の条件下において、最高用量は MTD であった。2 回目の投与後 24 時間に動物を安楽殺し、骨髄塗抹標本について小核を有する幼若赤血球の発現頻度を計数した。

本試験では TK 用サンプルは採取しなかったが、300 mg/kg/日での AZD9291 並びに AZ5104 及び AZ7550 代謝物の曝露量は、用量設定試験の一環として評価した（試験番号 3544KR；2.6.6.3.1.1項参照）。

AZD9291 を MTD である 300 mg/kg/日までの用量で雄ラットに 2 回経口投与（24 時間間隔）したとき、骨髄中での小核を有する幼若赤血球の発現頻度を増加させないと結論された。

表 3 AZD9291 遺伝毒性試験の要約

動物種/系統	**試験番号/経路**	**動物数/群**	**AZD9291 の用量範囲**	**投与関連所見**
Ames/サルモネラ菌（TA1535、TA1537、TA98 及び TA100）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）	793061/ *in vitro*	NA	0～333 µg/プレート（+/-S9）	変異原性はみられず（細胞毒性がみられなかったことから最高濃度まで試験を実施）
マウスリンフォーマ/L5178Y 細胞	793056/ *in vitro*	NA	**-S9**：0～8 µmol/L（0～4 µg/mL） **+S9**：0～13 µmol/L（0～6.5 µg/mL）	変異原性はみられず（細胞毒性がみられなかったことから最高濃度まで試験を実施）

表 3 AZD9291 遺伝毒性試験の要約

動物種/系統	試験番号/経路	動物数/群	AZD9291 の用量範囲	投与関連所見
ラット小核/Han Wistar ラット	793538/経口	雄 7/群	0～300 mg/kg で 2 日間	変化はみられず（MTD まで試験を実施）

S9：ラット肝由来代謝活性化系；NA：該当せず

2.6.6.5 がん原性毒性試験

予定している適応症を考慮し、ICHS9 ガイドラインに従って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 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

進行がんを適用とした申請であることから、ICHS9, 2009ガイドラインに従い 、いわゆる雌受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。しかしながら、ICHS9 ガイドラインに従い、反復投与毒性試験における生殖器の病理組織学的検査により、雌受胎能への影響の有無についての代用評価を行った（ラット反復投与毒性試験における生殖器の変化の記述については、2.6.6.3.1.4項及び2.6.6.3.1.5項を参照のこと）。加えて、妊娠 2 日（着床前）から妊娠 20 日まで AZD9291 を投与するラット胚･胎児発生試験を改変した試験（2.6.6.6.3.1項参照）を実施した。

2.6.6.6.2 雄受胎能の評価

雄受胎能に対する AZD9291 の影響を、ラット 3 カ月間反復投与毒性試験の一環として評価した。この試験では 10 mg/kg/日以上の用量で被験物質投与に関連する病理組織学的所見（精子細胞停留）が精巣に認められた（試験番号 526248、2.6.6.3.1.5項参照）。媒体又は AZD9291 を 1、10 及び 40/20 mg/kg/日の用量で投与した雄ラット（1 群 10 匹）を、10/11 週に無処置雌と 1：1 で同居させた。40/20 mg/kg/日群の雄と交尾した雌では、生存着床数の減少及び着床前胚損失率の増加がみられたことから、AZD9291 による雄受胎能への悪影響が示唆された。1 及び 10 mg/kg/日の用量では雄受胎能への影響は認められず、雄の生殖に及ぼす影響に関する無毒性量は 10 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.6.3 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.3.1 ラットを用いた胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に関する試験（496800 試験）

概要表 2.6.7.13

本試験の目的は、AZD9291 を交尾が確認された雌ラットに妊娠中（着床前から）及び初期授乳期を通して投与したときの影響を評価することであった。本試験は、妊娠 2～20 日に投与する第 1 相、妊娠 6～16 日に投与する第 2 相、妊娠 6 日から分娩後 6 日まで投与する第 3 相の計 3 相の試験で構成され、1 群雌 6 匹からなる 13 群の Han Wistar ラットに、AZD9291 を 1 日 1 回強制経口投与した。投与量はラットを用いた 3 カ月間反復投与毒性試験（526248 試験）の成績に基づき設定した。すなわち、1、10 又は 20 mg/kg/日の用量で忍容性が認められた。体重増加量の減少は全ての用量で投与 1～11 日、投与 1～15 日に約 20%、20 mg/kg/日で投与 1～25 日に約 9%であった。摂餌量に関連した変化はなかった。先の試験では、類似した薬理作用を有する化合物の情報に基づいて、AZD9291 が軽微な母動物毒性のみを示す用量で胚胎児毒性が生じる可能性があると考えられた。器官形成期の終了までの妊娠期の曝露の影響は、第 3 相の用量を決定する前の第 1 及び 2 相で得られた。第 1 相では体重増加量の軽度な減少が予想される 20 mg/kg/日を選択し、着床前から硬口蓋閉鎖まで投与した AZD9291 の作用を評価した。第 2 相では高用量を短期間投与したときの AZD9291 の毒性プロファイルを評価するため 30 mg/kg/日を選択した。本用量は忍容性がみられ、体重増加量の減少が生じると予想された。残りの 1、10 及び 20 mg/kg/日の用量は、胚及び胎児の生存、胚胎児の発生及び TK に関して用量反応性を評価するために選択した。第 1 及び 2 相からの結果のレビューに続いて第 3 相は 1 及び 30 mg/kg/日の用量を選択し、妊娠 6 日から分娩後 6 日まで母動物に投与したときに出生児の生存に及ぼす AZD9291 の影響を評価した。以下に各相の概略を示す：

第 1 相：0 又は 20 mg/kg/日の用量で妊娠 2 日から妊娠 20 日まで投与し、妊娠 20 日に剖検

第 2 相：0、1、10、20 又は 30 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日から妊娠 16 日まで投与し、妊娠 21 日に剖検

第 3 相（バッチ 1）：0、1 又は 30 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日から分娩後 6 日まで投与（剖検は分娩後 7～9 日）。対照群における全同腹児死亡が予想外に多かったため、本試験のこの相は再度実施した（バッチ 2）。

第 3 相（バッチ 2）：0、1 又は 20 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日から分娩後 6 日まで投与（剖検は分娩後 7～9 日）

母動物の検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠・生殖能、妊娠子宮重量、剖検並びに角膜及び舌の病理組織学的検査（第 1 相及び第 3 相）とした。胎児及び出生児の体重を記録し、外表検査及び内臓検査を実施した。母動物、胎児（妊娠 20 日）及び出生児（生後 7～9 日）から血漿サンプルを採取し、AZD9291 並びに代謝物 AZ5104 及び AZ7550 の分析を行った。AZ5104 については、前の試験で実サンプルの再現性が本分析対象物の許容基準を満たさなかったため、TK パラメータを算出しなかった。対照群の母動物並びにその胎児及び出生児から採取したサンプルにおいて、AZD9291、AZ7550 及び AZ5104 は検出されなかった。

<u>第 1 相：妊娠 2～20 日に投与</u>

20 mg/kg/日群の母動物から得られた胎児において、AZD9291 及び AZ7550 の曝露が確認された。20 mg/kg/日群の胎児において、AZ5104 は全体に定量できなかった。

AZD9291 を 20 mg/kg/日の用量で投与したところ、母動物の体重増加量及び摂餌量の減少が認められた。AZD9291 を 20 mg/kg/日の用量で母動物に妊娠 2 日から投与しても平均着床数に対する影響はみられなかったが、対照群と比較して生存胎児数の減少及びそれに伴う早期胚死亡の発現頻度増加が認められた。

第 2 相：妊娠 6～16 日に投与

AZD9291 を投与した全ての母動物に、AZD9291、AZ5104 及び AZ7550 への曝露が認められた（表 4）。妊娠 16 日における AZD9291 及び AZ7550 の曝露量は、1～30 mg/kg/日の用量範囲でほぼ用量に比例していた。AZD9291 の曝露量は AZ7550 より大きかった。

表4　　妊娠 16 日の雌ラットにおける AZD9291 及び AZ7550 の群平均トキシコキネティクス（第 2 相）

用量 (mg/kg)	**1**	**10**	**20**	**30**
AZD9291				
C_{max} (nmol/L)	86.7	759	990	1430
AUC_{0-t} (nmol.h/L)	1130	10200	16600	21200
AZ7550				
C_{max} (nmol/L)	2.61	25.1	43.7	58.9
AUC_{0-t} (nmol.h/L)	31.1	380	756	1020

1 群当たりの雌動物数は 6 匹

AZD9291 を 20 mg/kg/日以上の用量で投与したところ、母動物の体重増加量及び摂餌量の減少並びに一般状態への影響が認められた。AZD9291 の 30 mg/kg/日以下の用量において着床数、生存胎児数及び着床胚死亡数には毒性変化はみられなかったが、20 mg/kg/日以上では用量に関連した平均胎児体重の減少が認められた。30 mg/kg/日までの用量において、被験物質投与に関連すると考えられる胎児外表及び内臓の重度の異常並びに胎児内臓の軽微の異常は認められなかった。

第 3 相、妊娠 6 日から分娩後 6 日まで投与

20 mg/kg/日群の母動物から生まれた出生児では AZD9291 及び AZ7550 への曝露が確認されたが、1 mg/kg/日群の大部分の出生児では信頼できる定量限界を下回った。20 mg/kg/日群の出生児における AZD9291 及び AZ7550 の濃度は、母動物を下回っていた（投与後 2 時間でそれぞれ 57 分の 1 及び 8 分の 1）。しかし、いずれの分析対象物の血漿中濃度も、母動物では 2 時間から 24 時間にかけて減少したのに対し、出生児ではいずれの時点においても同程度の曝露濃度が持続してみられた。1 及び 20 mg/kg/日群の母動物から得られた出生児において、代謝物 AZ5104 は全体に定量不能であった。

母動物 2 例で体重減少及び毒性症状がみられたため、動物愛護の理由により安楽殺した（20 及び 30 mg/kg/日群の各 1 例を、それぞれ分娩後 4 日及び妊娠 23 日に安楽殺）。残りの動物では、投与期間中に 20 mg/kg/日以上の用量で母動物の体重増加量及び摂餌量の減少並びに毒性症状が認められた。授乳期間中に 20 mg/kg/日群の母動物で摂餌量減少が依然としてみられたが、母動物の体重増加量は対照群と同程度であった。

妊娠期間中、30 mg/kg/日までのいずれの用量においても毒性変化は認められなかった。20 mg/kg/日までの群の出産児数（出産率）及び出生児数（出生率）は対照群と同程度であったが、30 mg/kg/日群では減少がみられた。バッチ 1 の動物での 0、1 及び 30 mg/kg/日群における全同腹

児死亡の発現頻度は、それぞれ 3/6、2/6 及び 5/5 であった。対照群の成績が異常かつ不十分と考えられたことから、この相を 0、1 及び 20 mg/kg/日の用量で再度実施した。バッチ 2 の動物での 0、1 及び 20 mg/kg/日群における全同腹児死亡の発現頻度は、それぞれ 0/6、1/6 及び 2/6 であった。

全体的な結論として、AZD9291 は 20 mg/kg/日以上の用量で同腹児生存率に影響を及ぼしたが、1 mg/kg/日の用量では被験物質投与に関連する同腹児生存率への影響は認められなかった。

20 mg/kg/日群において、出生時及び授乳期間を通した平均出生児体重には、対照群と比較して減少がみられた。1 mg/kg/日群では出生児体重への影響は認められなかった。いずれの群においても、被験物質投与に関連すると考えられる外表異常及び内臓異常は認められなかった。

母動物の病理組織学的検査

AZD9291 の 20 又は 30 mg/kg/日群の母動物（第 1 相及び第 3 相）において角膜及び舌の上皮萎縮がみられたが、これは野生型 EGFR 阻害作用に一致するものである。これらの所見は 1 mg/kg/日群（第 3 相）の母動物には認められなかった。

以上、AZD9291 を 20 mg/kg/日以上の用量で 1 日 1 回経口投与したところ、母動物の体重増加量及び摂餌量の減少、一般状態の変化並びに角膜及び舌の上皮萎縮が認められた。20 mg/kg/日の用量で妊娠 2 日（着床前）から妊娠 20 日まで投与した母動物において、着床後胚死亡率の増加がみられ、母動物の無毒性量は確定できなかった。AZD9291 を器官形成期（妊娠 6～16 日）に投与したところ、20 mg/kg/日以上の用量で胎児体重減少がみられたが、胚・胎児生存への悪影響は認められず、母動物及び胎児の無毒性量は 10 mg/kg/日と考えられた。20 mg/kg/日以上の用量で妊娠 6 日から少なくとも分娩後 6 日まで投与したところ、用量に関連した全同腹児死亡（30 mg/kg/日では 100%）及び平均出生児体重の減少がみられた。最高 30 mg/kg/日までの用量で投与した母動物から得られた胎児又は出生児において、被験物質投与に関連する外表異常及び内臓異常は認められず、母動物及び次世代動物（胎児又は出生児）の無毒性量は 1 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.6.3.2 出生前及び出生後の発生に関する試験

ICHS9, 2009ガイドラインに従い 、いわゆる出生前及び出生後の発生に関する試験は実施しなかった。しかしながら、分娩時期を含む妊娠 6 日から分娩後 6 日まで AZD9291 を投与するラット胚･胎児発生試験を改変した試験（2.6.6.6.3.1項参照）を実施した。

2.6.6.7 幼若動物を用いた毒性試験

AZD9291 の対象患者集団は NSCLC を有する成人患者であるため、幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.8 局所刺激性試験

反復投与毒性試験は経口投与により実施し、また予定臨床投与経路も経口であることから、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.9 その他の毒性試験

2.6.6.9.1 光毒性試験（8273754 試験）

AZD9291（メシル酸塩のメタノール溶液）は 290～700 nm の波長範囲で光を吸収し、吸収のピークは 313 nmol/L でモル吸光係数は 26335 L/mol·cm（図 1）である。また、ラット QWBA 試験において[^{14}C]AZD9291 関連物質はメラニン含有組織に結合し、その消失半減期は約 1200 時間であった（ 薬物動態試験の概要文、2.6.4.4.1.2 項参照）ことから、AZD9291 の *in vitro* 光毒性試験を実施した（8273754 試験）。その結果を、概要表 2.6.7.17 に示すとともに以下に記述する。

Balb/c 線維芽細胞を、UV 光の存在下及び非存在下で、0.0476～150 µg/mL の濃度範囲の AZD9291（0.0001～0.3 µmol/mL；溶解限度及び媒体中の安定性に基づく最高濃度）により処理した。インキュベーション期間終了時に、ニュートラルレッド取込みアッセイで細胞毒性を評価した。その結果，15 µg/mL 以上の濃度では UV-A 光照射の有無にかかわらず細胞毒性が認められたが、Photo Irritation Factor（PIF）は 1.2 であり、光毒性陰性（PIF＜2）の範囲であった。

本試験で採用した条件下で、AZD9291 は OECD ガイドライン 432 評価基準（OECD, 2004）に従った本 *in vitro* 試験系において光毒性を示さないと結論された。したがって、AZD9291 には光毒性のリスクはないと考えられる。

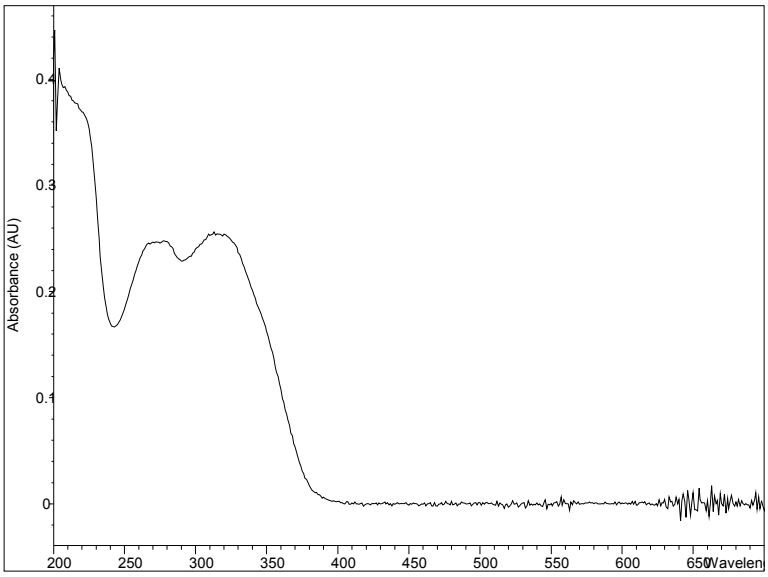


図 1 AZD9291 の UV 吸収スペクトル（メシル酸塩）

2.6.6.9.2 機序検討試験

2.6.6.9.2.1 AZD9291 のラット 3 カ月間反復投与毒性試験で得られた肺についての電子顕微鏡検査（EM-14.148 試験）

概要表 2.6.7.17

本試験の目的は、ラット 3 カ月間反復経口投与毒性試験（526248 試験）の AZD9291 投与動物から採取した肺の透過型電子顕微鏡検査を実施し、光学顕微鏡検査で雌雄にみられた肺胞マクロファージ集簇発現頻度増加の特性を更に検討することであった。媒体対照群（雌雄各 2 匹）及び AZD9291 投与群（40/20 mg/kg/日群の雄 3 匹及び 20 mg/kg/日群の雌 5 匹）のラットから採取したホルマリン固定肺サンプルについて、電子顕微鏡写真を撮影した。

先に光学顕微鏡検査でみられた肺胞マクロファージ集簇の発現頻度増加に一致して、被験物質投与に関連する肺胞マクロファージ数増加が認められた。マクロファージには細胞質量の増加がみられ、細胞質には種々の消化段階にある多数の二次ライソゾームが認められたが、ライソゾーム活性の上昇は対照群の動物でもみられたことから、認められた所見は被験物質投与による正常なライソゾーム活性の上昇を表すものと考えられた。

形態学的には、ライソゾーム内容物は膜遺残物質（AZD9291 投与雌における初期リン脂質症に一致すると考えられる特徴的な渦巻き状、密な多層性又は輪状の構造物）又は高電子密度基質内の低電子密度環状構造クラスターからなり、ライソゾーム内及びライソゾーム間で種々の形態を示し、雌雄ともに認められた。これらの形態学的特徴は対照動物及び AZD9291 投与動物のいずれにもみられたが、被験物質投与動物でより顕著であった。後者の変化は多胞体又はリポフスチンに一致するものであった。しかしながら、リポフスチン色素は肺の光学電子顕微鏡検査（ラット 3 カ月間反復投与毒性試験の一環として実施した）ではみられなかったことから、これは通常の病理組織学的検査で検出限界未満のリポフスチン又は多胞体の蓄積を示すものである。

2.6.6.9.3 代謝物の毒性試験

2.6.6.9.3.1 代謝物 AZ5104 のラットを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性試験（3500KR 試験）

概要表 2.6.7.17

本試験の目的は、AZ5104（AZD9291 の代謝物）を雌ラットに最長 28 日間経口投与したときに誘発される毒性を検討することであった。本試験は公式な代謝物の安全性確認試験を意図したものではなく、本代謝物の毒性に関する何らかの情報の提供を目的としたものであった。本試験の構成は MTD 相並びにその後の 28 日間主試験相及び回復性試験であった。MTD 相では、雌ラット各 3 匹に AZ5104 を 50 又は 100 mg/kg/日の用量を 6 日間、10 又は 20 mg/kg/日の用量を 14 日間経口投与することとした。主試験相では雌ラット各 8 匹に AZ5104 を 0、5、10 又は 15 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与し、4 匹の雌からなる別の回復性試験群には 15 mg/kg/日の用量で 28 日間投与した後に 28 日間の休薬期間を設けた。

MTD 相の検査項目は、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び AZ5104 の血漿中濃度とした。主試験相においても同じパラメータを評価し、更に眼科学的検査、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

MTD 相における AZ5104 の曝露量は、用量比を下回って増加した。主試験相における AZ5104 の曝露量はほぼ用量に比例して増加し、投与 1 日と 28 日の間で曝露量の差は認められなかった。主試験相で検討した最高用量（15 mg/kg/日）における AZ5104 の平均 $AUC_{0\text{-}24}$ は 4.06 µmol.h/L、C_{max} は 0.312 µmol/L であった。

MTD 相において、50 及び 100 mg/kg/日の用量では主として重度の摂餌量減少及び体重減少が認められ、忍容性はみられず、それぞれ投与 6 日及び 4 日に動物を安楽殺した。これらの動物では立毛、糞の硬さの変化及び泌尿／肛門性器部の汚れも観察された。10 又は 20 mg/kg/日の用量では 14 日間にわたり忍容性がみられ、軽度の摂餌量減少が両用量で、体重減少及び一般状態の変化（皮膚病変及び泌尿／肛門性器部の汚れを含む）が 20 mg/kg/日で認められた。

28 日間の主試験相では 15 mg/kg/日までの用量で良好な忍容性がみられたが、例外として 15 mg/kg/日群の動物 2 例では体重減少（最大で-15%）並びに糞の硬さの変化、立毛及び泌尿／肛門性器部の汚れといった一般状態の変化がみられたため、投与 8 日及び投与 16 日に安楽殺した。15 mg/kg/日群の残りの動物では、軽度の体重増加量及び摂餌量の減少並びに皮膚病変、鼻口部の汚れ、立毛及び脱毛といった一般状態の変化が観察された。10 mg/kg/日群でも皮膚病変及び鼻口部の汚れがみられた。一般状態の変化は休薬期間中に概ね消失したが、休薬期間終了時にひげの成長不良が認められた。

主試験相において、AZ5104 投与群で角膜の顆粒状の水平バンドの出現頻度が対照群と比較してごく軽度に増加したが、明らかな用量依存性は認められなかった。休薬期間終了時には、この所見の発現頻度は投与終了時と比較してわずかに減少した。この変化には一貫性がみられず軽微で用量反応を伴わなかったことから、AZ5104 に起因すると結論づけることはできなかった。

MTD 相及び主試験相において、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少並びに網状赤血球数及び血小板数の増加がみられたが、これらの変化の一部は、血液学的検査用サンプル採取の前日に主試験の動物から TK 用の採血をしたことに起因する可能性がある。また、好中球数、リンパ球数及び／又は単球数の増加に起因すると考えられる白血球数の増加も認められた。

MTD 相及び主試験相でみられた血漿生化学的変化には、アルブミンの減少並びにグロブリン及びクレアチニンの増加が含まれていた。また、全ての投与群で、肝酵素 AST、GLDH 及び/又は胆汁酸の散発的で軽微（2 倍未満）かつ非用量依存性の増加が認められた。これらの所見はこれらのパラメータの正常なばらつきを反映した可能性があると考えられるが、軽微な被験物質投与に関連した変化である可能性は否定できない。これらの所見に伴う肝臓の病理組織学的所見（軽度のグリコーゲン減少は摂餌量減少による二次的変化であった）は認められなかった。休薬期間終了時の臨床病理検査でみられた変化は、グロブリン及び総蛋白の軽微な増加であった。

主試験相において、被験物質投与に関連する病理組織学的変化が、全ての用量で眼（角膜上皮萎縮）及び皮膚／鼻口部（炎症性細胞浸潤、毛包／表皮変性及び／又はびらん／潰瘍）に認められた。15 mg/kg/日群では更なる所見が腸間膜リンパ節（洞内赤血球増加）及び副腎（動物 1 例における軽微な炎症性細胞浸潤）にみられた。15 mg/kg/日群のこの 2 例及び途中安楽殺動物では、肝臓（軽度のグリコーゲン減少）、副腎皮質（軽度の皮質変性／壊死）、前胃（軽微な炎症及び中等度の浮腫）、腸（軽度の炎症性細胞浸潤及び／又は絨毛鈍化）及び／又は膵臓（軽微な単細胞壊死）にも所見が観察された。これらの変化の一部はこれらの動物の状態悪化に関連する可能性があるが、腸及び副腎の所見については被験物質投与に関連する変化である可能性は否定できない。

休薬期間終了時にみられた所見は、皮膚の軽微から軽度の炎症性細胞浸潤及び副腎皮質の軽微な皮質炎症性細胞浸潤のみであった。

以上、AZ5104 を雌ラットに 5、10 及び 15 mg/kg/日の用量で投与したところ、1 カ月間にわたり良好な忍容性がみられたが、例外として 15 mg/kg/日群の 2 例は重度な体重減少及び一般状態の変化により安楽殺した。被験物質投与に関連する病理組織学的変化が全ての用量で眼及び皮膚／鼻口部にみられ、15 mg/kg/日で腸間膜リンパ節に認められた。15 mg/kg/日群の途中死亡の 2 例でみられた更なる腸及び副腎の所見も、被験物質投与に関連する可能性がある。これらの所見は 1 カ月間の休薬により完全に回復したが、例外として皮膚及び副腎の炎症性変化は部分的な回復性を示した。生存期間中に AZ5104 投与群でみられた臨床病理検査及び病理組織学的検査の所見は、AZD9291 を投与したラットでみられたものと一致していた。

2.6.6.9.4 抗原性試験

反復投与毒性試験において AZD9291 の免疫系に及ぼす影響が認められなかったことから、抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.9.5 免疫毒性試験

ICHS9, 2009ガイドラインに従い、一般毒性試験の検査項目で AZD9291 が免疫毒性を有する可能性について適切に評価できていたと考えられることから、独立した免疫毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.9.6 依存性試験

安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において中枢及び末梢神経系への毒性を示唆する確実な事象が認められなかったことから、依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.9.7 不純物の試験

不純物は AZD9291 メシル酸塩の製造工程で生成される不従物、あるいは ICH ガイドラインで安全性確認が必要な閾値が 0.15%と規定されている（ICHQ3A, 2006ガイドライン）不純物については、原薬規格（原薬の規格、3.2.S.4.1 の項参照）で特定し、AZD9291 のラット 3 カ月間反復投与毒性試験（試験番号 526248、2.6.6.3.1.5項参照）で適切に安全性を確認した。より詳細な内容については規格及び試験方法の妥当性、3.2.S.4.5 項に記載した。

原薬製造工程の開発を推進するため、ラット 1 カ月間反復投与毒性試験（試験番号 528622）を追加実施し、市販品生産工場において市販スケールで製造された原薬に含まれる不適切な不純物のリスクを軽減させた。その結果、実際に市販品生産工場で製造された AZD9291 メシル酸塩を分析した結果、安全性確認が必要な閾値とされている 0.15%（ICHQ3A, 2006ガイドライン）を超える新たな不純物は認められなかった。したがって、ラット 1 カ月間反復投与毒性試験の追加実施は AZD9291 メシル酸塩の原薬規格をサポートするためには必要なかったが、申請資料として完璧を期すために当該試験成績を収載した（2.6.6.9.7.5項参照）。

AZD9291 メシル酸塩の製造過程で生じる可能性のある変異原性不純物あるいはICHM7, 2014ガイドラインに示されているような分解産物を特定するための分析を実施した（不純物、3.2.S.3.2

項を参照）。当該アセスメントの一環として、AZD9291 メシル酸塩中に存在し、リスクがあると判断されたすべての不純物（予定市販用製剤の製造工程を含む）について、市販のデータベースの DEREK 及び Leadscope に加えて社内データベースを用いた構造活性相関（SAR）を評価した結果、変異原性を有する可能性がある 4 種の不純物について、復帰突然変異試験により変異原性を調べた（2.6.6.9.7項参照）。対象となる進行性非小細胞肺癌患者では平均余命は 5 年以下と考えられ、リスクベネフィットを考慮すると 100 μg/日（AZD9291 を 1 日 80 mg 投与した場合には AZD9291 メシル酸塩中の [redacted] ppm に相当）までの変異原性不純物の摂取は許容可能と考えられる。変異原性あるいは変異原性を有する可能性のある不純物については規格値又は [redacted] ppm を超えることはまずないとの評価により制御されており、結果的に製造工程によって管理されている（不純物、3.2.S.3.2 項を参照）。

ICH M7 ガイドラインの勧告では、不純物が遺伝子突然変異を引き起こす可能性を評価するための手法により、不純物が安全なレベルに管理できることを確実にしており、安全性確認の必要な閾値によらず、変異原性に関する更なる安全性評価を行う必要はない。これには、細菌による変異原性の予測として(Q)SAR ツールを使用することが含まれる。長期投与において 1 日当たりの不純物の量が 1 mg を超える場合は、ICH Q3A/Q3B ガイドラインで推奨されている遺伝毒性評価を考慮することができる。規格設定を行った AZD9291 の不純物は、いずれも 1 日当たりの投与量が 1 mg を超えないと考えられることから、ICH Q3A/3B 及び ICH M7 ガイドラインの要求を完全に満たすものと考える。

2.6.6.9.7.1 細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物C＊の遺伝毒性評価（8306010 試験）

概要表 2.6.7.17

不純物C＊ 不純物（ 不純物C＊ ）の変異原性の有無を、サルモネラ菌 4 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いて、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で検討した。

不純物C＊ は、毒性がみられるまでの濃度において、S9 の非存在下及び存在下での試験で変異原性を示さなかった。

2.6.6.9.7.2 細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物A＊ の遺伝毒性評価（8303535 試験）

概要表 2.6.7.17

不純物A＊ 不純物（ 不純物A＊ ）の変異原性の有無を、サルモネラ菌 4 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いて、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で検討した。

不純物A＊ はサルモネラ菌 TA1537 株において S9 の非存在下及び存在下で復帰突然変異コロニー数の増加を誘発した。 不純物A＊ は、毒性がみられるまでの濃度において、サルモネラ菌 3 株（TA98、TA100 及び TA1535）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いた S9 の非存在下及び存在下での試験で変異原性を示さなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.6.9.7.3 細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物D＊の遺伝毒性評価（8303536 試験）

概要表 2.6.7.17

不純物D＊ 不純物（ 不純物D＊ ）の変異原性の有無を、サルモネラ菌 4 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いて、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で検討した。

不純物D＊ は、毒性がみられるまでの濃度において、S9 の非存在下及び存在下での試験で変異原性を示さなかった。

2.6.6.9.7.4 細菌を用いる復帰突然変異試験による不純物B＊の遺伝毒性評価（8303534 試験）

概要表 2.6.7.17

不純物B＊ 不純物（ 不純物B＊ ）の変異原性の有無を、サルモネラ菌 4 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いて、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で検討した。

不純物B＊ は、サルモネラ菌 4 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）において S9 の非存在下及び存在下で復帰突然変異コロニー数の増加を誘発した。 不純物B＊ は、大腸菌 WP2 *uvrA*（pKM101）株を用いて最高 5000 µg/プレートまでの濃度で実施した試験において、S9 の非存在下及び存在下で変異原性を示さなかった。

2.6.6.9.7.5 不純物の安全性確認のためのラットを用いた 1 カ月間反復投与毒性試験（528622 試験）

概要表 2.6.7.17

当該試験は市販品生産工場において市販スケールで製造された原薬に含まれる不適切な不純物のリスクを軽減させるために実施したものである。しかしながら、実際に市販品生産工場で製造された AZD9291 メシル酸塩を分析した結果、この試験は不純物の安全性確認上は必要ないものであることが判明した。申請資料として完璧を期すために当該試験を収載し、結果を以下に概括する。

本試験では 2 ロットの AZD9291（フリー体）をラットに 28 日間経口投与し、その毒性プロファイルを比較した。市販品の合成ルート及び製造工程で製造された新規ロット（ロット番号 [redacted]）を先に実施した 1 カ月間反復投与毒性試験（試験番号 3416AR）に使用した AZD9291（ロット番号 [redacted]）と比較検討した。

1 群雌雄各 10 匹からなる 3 群の Han Wistar ラットに、媒体又は AZD9291（2 ロットのうちの 1 つ）を 10 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した。別に TK 試験群（1 群雌雄各 3 匹）を設けた。検査項目は、一般状態観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血漿生化学的検査、尿検査、尿生化学的検査、血漿中 AZD9291 濃度、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

2 ロットの AZD9291 の毒性プロファイルはほぼ同様で、新しいロットに含まれる不純物によると思われる新規毒性所見は認められなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.6.10 考察

AZD9291 の安全性評価のため、反復投与毒性試験（最長 3 カ月間；1 カ月間反復投与毒性試験では回復性の評価を実施）、遺伝毒性試験（AZD9291 及び不純物）、生殖発生毒性試験及び光毒性試験を実施した。この試験パッケージは、予定している患者集団での使用をサポートするのに妥当なものと考えられ、ICHS9, 2009ガイドラインでの要求を満たすものである。進行又は転移性 NSCLC の患者は予後不良で余命が短いと予想され、効果的な標準治療の選択肢がないことから、この適応症をサポートするためのがん原性試験は不要と考え実施しなかった。

ラット、イヌ及びヒトでの総 AZD9291 曝露量を比較したところ（表 2）、予定治療用量の 80 mg でのヒトにおける定常状態の平均 AUC（15000 nmol·h/L）は、ラット及びイヌを用いた 3 カ月間反復投与毒性試験の最高用量での値（ラットでは雄で 5880 nmol·h/L、雌で 16200 nmol·h/L、イヌでは 5420 nmol·h/L）とほぼ同程度又はそれより高かった。ヒトにおける定常状態の平均 C_{max}（780 nmol/L）は、ラット及びイヌを用いた 3 カ月間反復投与毒性試験の最高用量での値（ラットでは雄で 408 nmol/L、雌で 1020 nmol/L、イヌでは 425 nmol/L）とほぼ同程度又はそれより高かった。3 カ月間反復投与毒性試験の高用量で用量制限毒性が確認されたが、抗がん剤においては、患者への治療用量での血漿中濃度と同程度又はそれより低い濃度で動物の安全性及び忍容性の限界がみられることは珍しくない（Collins et al, 1990）。ラット及びイヌを用いた 14 日間用量設定試験において、より高い曝露量（80 mg 用量でのヒトの AUC 及び C_{max} 値を最大でそれぞれ約 6～8 倍上回る）での検討を行ったときの毒性プロファイルは、重要な毒性試験でみられた所見と概ね一致していた。技術的問題により、AZD9291 について GLP 適用の血漿蛋白結合データは得られていないため（薬物動態試験の概要文、2.6.4.4.2 項参照）、総薬物濃度のみを示す。

ラットの胚・胎児発生に関する試験の最高用量（30 mg/kg/日）における AZD9291 の平均 AUC（21200 nmol·h/L）は、ヒト（80 mg）で得られた AUC の約 1.4 倍であった（表 4参照）。

毒性試験はラット及びイヌを用いて実施した。これらはいずれも正常組織における野生型 EGFR 阻害作用に関連した毒性リスクを評価するための動物種として妥当と考えられ、他の EGFR 阻害剤の毒性評価にも使用されている（Yano et al, 2003）。また、AZD9291 の *in vitro* 代謝を検討したところ、ヒト肝細胞中で確認された全ての代謝物は、ラット及び／又はイヌの肝細胞にも認められた（薬物動態試験の概要文、2.6.4.5.1 項参照）。AZ5104 及び AZ7550 はラット及びイヌで生成する AZD9291 の 2 種の薬理活性代謝物であり、重要な毒性試験では両代謝物への全身曝露が確認された（表 5参照）。

AZD9291 の毒性プロファイルは、本薬の薬理作用を反映したものであった。AZD9291 は変異型の EGFR を強力に阻害するが、野生型 EGFR 及び正常組織に発現する ErbB 受容体ファミリーのその他のメンバー（HER2 等）（Yano et al, 2003; Wieduwilt and Moasser, 2008; Press et al, 1990）に対してはより弱い阻害作用を示す。野生型 EGFR は上皮、間葉及び神経細胞由来の組織に広く発現し、そこで増殖、再生、分化及び発生といった多くの生理的過程において重要な役割を果たす（Yano et al, 2003）。*In vitro* 薬理モデルにおいて、AZD9291 は、これらの密接に関連する受容体に対して高い選択性を示したが（薬理試験の概要文、2.6.4.2.1 項参照）、毒性試験において MTD までの用量で評価を行った場合に、これらの受容体の阻害に伴う毒性がみられた可能性は否定できない。

反復投与毒性試験でみられた主要な病理組織学的所見は、眼の上皮（角膜）、消化管（舌を含む）、皮膚及び雌性生殖器の萎縮性、炎症性及び／又は変性性の変化であり、脾臓の二次的変化も認められた。同様の所見は、ゲフィチニブ、エルロチニブの他、アファチニブ（EGFR、HER2 及び HER4 の汎不可逆的阻害剤）及びラパチニブ（EGFR 及び HER2 に対する選択的な二重阻害

剤）といった他の EGFR TKI を用いた動物試験においても報告されている[Gefitinib (Tradename Iressa) 2002、Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013、Lapatinib (Tradename Tykerb) 2007の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。その他の標的器官は、雄性生殖器、雄の乳腺、腸間膜リンパ節、ハーダー腺、肺、骨髄及び胸腺であった。

反復投与毒性試験における用量制限毒性の所見は体重減少を伴う摂餌量減少（ラット及びイヌ）並びに眼の症状及び眼科学的所見（イヌ）であり、そのためにラットの 3 カ月間反復投与毒性試験並びにイヌの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験では、投与期間の短縮及び減量が必要になった。

反復投与毒性試験でみられた主要な所見を、器官系ごとに以下に示す。

眼（角膜）

軽微から中等度の角膜上皮萎縮が、ラット及びイヌで 6 日間以上の投与後に観察された（ラットでは 4 mg/kg/日以上、イヌでは 6 mg/kg/日以上）。ラットにおいて、これらの病変は眼科学的検査では検出されなかった。14 日間反復投与毒性試験で少数例のラットにみられた軽微な視力低下は、これらの病理組織学的所見に関連している可能性がある。イヌでは、角膜半透明化が、眼科学的検査で一部の動物に認められた（7 日間以上の投与で検出された）。より高い用量（10 mg/kg/日以上）では、角膜半透明化の発現に伴ってフルオレセイン色素で陽性に染色される領域がみられる場合があったことから、角膜上皮の潰瘍又はびらんが示唆され、それに伴って結膜発赤及び流涙も認められた。これらの眼の所見はイヌの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験では用量制限毒性であったが、休薬及び／又は減量により速やかに消失した。イヌ 3 カ月間反復投与毒性試験では、高用量群の多くの動物で 8 週以降に角膜半透明化から白濁への進行がみられた。

1 カ月間反復投与毒性試験における角膜上皮萎縮は、1 カ月間の休薬によりイヌでは回復性が、ラットでは回復傾向が確認された（5 例中 1 例の雌で軽微な角膜上皮萎縮がみられた）。なお、1 カ月間投与終了時にイヌでみられた角膜の半透明化は病理組織学的には部分的な角膜の萎縮を示した。3 カ月間投与終了時にイヌでみられた角膜白濁に伴って上皮萎縮が観察されたが、変性性又は炎症性の浸潤は伴わなかった。他の EGFR 阻害剤であるゲフィチニブのイヌ 6 カ月間反復投与毒性試験でみられた同様の角膜白濁は、12 週間の休薬後も完全には回復しなかった（Yano et al, 2003）。

EGF は涙腺で合成され、正常な眼のホメオスタシスにおいて重要である（Carpenter and Wahl, 1990; Schultz et al, 1992）。角膜上皮の細胞分裂は細胞の基底層に限定される。角膜上皮幹細胞は角膜縁にみられ、これらの幹細胞に由来するのが速やかに分裂し基底層において求心性に移動する TA（transit amplifying）細胞（幹細胞と分化細胞の中間に一時的に存在して活発に増殖を行っている細胞）である。細胞が基底層から離れるともはや分裂することはなく、上皮の層を通過する間に分化し、その後角質表層で剥落する（Kruse, 1994）。内因性上皮成長因子は、TA 細胞の分裂を刺激するポリペプチド因子の 1 つである（Kruse, 1994; Tseng, 1996）。カニクイザルに EGF を投与したところ、角膜上皮の過形成が誘発された（Reindel et al, 2001）。したがって、AZD9291 投与動物でみられた角膜所見は、野生型 EGFR 阻害作用によって上皮細胞の産生及び移動が減少し、正常な剥落で消失した上皮細胞が置換されなくなった結果と考えられる。他の EGFR 阻害剤もラット及びイヌにおいて同様の角膜の変化を誘発する [Yano et al, 2003 ; Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013のFDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

消化管

舌を含む消化管の上皮萎縮がラット及びイヌで観察された。7 及び 14 日間反復投与毒性試験における胃及び／又は腸の病理学的変化（上皮萎縮、変性、潰瘍／びらん及び／又は炎症）は忍容性が認められない用量（ラットでは 40 mg/kg/日以上、イヌでは 20 mg/kg/日以上）のみでみられ、それに伴って体重減少、摂餌量減少、軟便／液状便及び嘔吐（イヌ）がみられたため、これらの動物は安楽殺した。

1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験でみられた消化管の所見は、7 及び 14 日間反復投与毒性試験で観察された所見ほど重篤ではなかった。ラットにおける上皮萎縮は、1 カ月間反復投与毒性試験（舌）及び 3 カ月間反復投与毒性試験（食道、舌及び前胃；軽度の潰瘍が高用量群の少数例のみにおいて前胃にみられた）において概ね軽微であったが、ラット 3 カ月間反復投与毒性試験では、軟便／液状便といった一般状態の変化を伴う摂餌量減少及び体重減少がみられたため、減量が必要になった（雄で 40 mg/kg/日から 20 mg/kg/日に減量）。同様に、イヌ 1 カ月間反復投与毒性試験では一部の動物でみられた摂餌量減少及び体重減少が高用量の減量（20 mg/kg/日から 12 mg/kg/日へ）の決定要因となり、投与期間終了時には軽度の病理学的変化（舌及び腸の萎縮又は炎症）がみられたのみであった。イヌ 3 カ月間反復投与毒性試験では消化管の病理学的変化はみられなかったが、低頻度の軟便／液状便及び嘔吐がイヌの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験で観察された。

1 カ月間反復投与毒性試験でみられた所見は、1 カ月間の休薬により完全に回復した。

AZD9291 はラット安全性薬理試験において消化管輸送抑制作用を示し（10 mg/kg 以上の単回投与；薬理試験の概要文、2.6.2.4.5 項参照）、それに一致してラット 14 日間反復投与毒性試験で糞排泄量減少が認められた。またこれが反復投与毒性試験でみられた摂餌量減少の一因である可能性がある。

なお、ラットでみられた一部の血液化学的変化（トリグリセリド、コレステロール、蛋白質、ALP、カルシウム、無機リン及びナトリウムの減少等）及び病理学的所見（肝グリコーゲン減少）は、摂餌量減少に関連して生じた可能性がある。イヌでみられた ALP の増加及び赤血球系パラメータの減少は、消化管で観察された炎症性変化に関連して生じた可能性がある。

EGF は消化管の全ての部分の成長に対して重大な影響を及ぼすため、EGF の投与により唾液腺、舌、食道、胃及び腸の上皮過形成が誘発された（Vinter-Jensen, 1999; Breider et al, 1996; Reindel et al, 1996）。消化管における EGF の役割には、細胞保護、胃酸分泌抑制及び腸酵素活性の調節が含まれる（Wong and Wright, 1999）。したがって、AZD9291 投与動物の消化管における病理組織学的所見は野生型 EGFR 阻害の結果と考えられ、ラットにおいて同様の変化を誘発する他の EGFR 阻害剤と一致する[Brown et al, 2008；Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

皮膚

ラット及びイヌの皮膚において、萎縮、炎症及び／又は変性性の変化が認められた。ラットの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験における主な皮膚の所見として毛包／毛包周囲の炎症がみられ、それに伴って表皮炎症／潰瘍、痂皮形成及び過角化が散見された。これらの変化は概ね軽微から軽度で（3 カ月後には中等度から重度の変化が散見された）、主に高用量群（20 mg/kg/日）でみられたが、3 カ月後には中用量群の少数例にも認められた。イヌでは軽微から軽度の表皮萎縮／変性が 14 日間反復投与毒性試験（10 mg/kg/日以上）及び 1 カ月間反復投与毒性試験（20/12 mg/kg/日）でみられたが、3 カ月間反復投与毒性試験（10/6 mg/kg/日までの用量）では認

められなかった。1 カ月間反復投与毒性試験でみられた所見は、1 カ月間の休薬により完全に回復した。

EGF はケラチノサイトの増殖、分化、遊走及び生存における重要な調節因子であるため、EGF 受容体の欠如により毛包発達及び皮膚構造の変化が誘発される（Murillas et al, 1995）。カニクイザルへの EGF の投与により表皮及び付属器の過形成が誘発された（Reindel et al, 2001）。したがって、AZD9291 の試験における皮膚の所見は野生型 EGFR 阻害の結果と考えられ、ラット及びイヌで同様の変化を誘発する他の EGFR 阻害剤に一致するものである [Brown et al, 2008；Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

雌性生殖系

ラットを用いた 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験において、10 mg/kg/日以上の群の多数例で雌性生殖器の検査により発情休止期の像がみられ、それに伴って子宮及び／又は腟の上皮菲薄化、子宮重量減少及び／又は黄体変性が認められた。1 カ月間反復投与毒性試験でみられた所見は 1 カ月間の休薬により完全に回復した。雌イヌでは同様の変化はみられなかった。ICHS9, 2009ガイドラインに従い、雌受胎能を評価する試験は実施しなかった。

EGF は正常な卵巣機能の調節に重要な役割を果たし、多くの異なる卵巣細胞に影響を及ぼす（Chabot et al, 1986; Assarsson et al, 1995）。また、EGFR は子宮にも発現して、子宮の内膜及び腺扁平上皮の増殖刺激における調節に重要な役割を果たすと考えられる（Yano et al, 2003）。EGF をカニクイザルに投与したところ、子宮、子宮頸部及び腟の過形成が誘発された（Reindel et al, 2001）。したがって、AZD9291 を投与した雌ラットにみられた変化は、野生型 EGFR 阻害作用の結果と考えられ、ラットで同様の変化を誘発する他の EGFR 阻害剤に一致する [Yano et al, 2003；Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

雄性生殖系

ラット及びイヌの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験（ラットでは 10 mg/kg/日以上、イヌでは 1 カ月間反復投与毒性試験で 2 mg/kg/日以上、3 カ月間反復投与毒性試験で 10/6 mg/kg/日）において、精巣の所見として精細管変性及び／又は精子細胞停留並びにそれに伴う二次的な精巣上体の変化（精子減少）及び器官重量減少（ラットの前立腺及び精巣上体）が認められた。ラット 3 カ月間反復投与毒性試験では、これらの所見に伴って 40/20 mg/kg/日の用量で雄受胎能が低下した。いずれの動物種においても病理組織学的所見は概ね軽微から軽度であり、1 カ月間投与と 3 カ月間投与の間で重症度の増加は認められなかった。

ラット 1 カ月間反復投与毒性試験ではこれらの所見は 1 カ月間の休薬後にはみられなかったことから、回復性が示唆された。イヌ 1 カ月間反復投与毒性試験では、精巣の病理学的変化は投与期間終了時に低及び中用量でみられたものの、高用量では認められなかった。したがって、イヌにおけるこれらの病変の回復性については明確には述べられない。しかしながら、イヌの 1 カ月間反復投与毒性試験（低及び中用量群）及び 3 カ月間反復投与毒性試験（高用量群）でみられた病変の種類及び重症度に基づくと、十分な休薬期間をおくことによって回復すると予想される。

EGFR は精巣に発現し、精子形成の調節における EGF の役割を裏付ける *in vitro* 及び *in vivo* のデータがある（Wald, 2005; Yan et al, 1998）。例えば、マウスを用いた試験により、顎下腺（EGF の主な供給源）を除去すると循環血中 EGF が検出不能なレベルに低下し、それに伴って精巣における精母細胞数及び精子細胞数の減少、精子数減少及び精子運動能低下並びに授胎能障害が生じることが示されている（Liu et al, 1994）。更に、これらの変化は EGF の投与により概ね回復し

た。雄性生殖器はアファチニブ [EGFR、HER2 及び HER4 の汎不可逆的阻害剤；Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ] の標的器官であることが確認されており、所見としては精子数減少（ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験）、精巣のアポトーシス増加（ラット）並びに前立腺及び精嚢の上皮萎縮（ラット及びミニブタ）が認められた。他の EGFR 阻害剤（ゲフィチニブ及びエルロチニブ等）又は EGFR/HER2 二重阻害剤（ラパチニブ等）については、非臨床試験において精巣又は雄受胎能への影響は報告されていない [Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びLapatinib (Tradename Tykerb) 2007の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

公表文献及びアファチニブでみられた変化に基づくと、AZD9291 投与動物でみられた精巣の所見は本薬の薬理作用に関連する可能性があるが、精巣は大部分の EGFR 阻害剤の標的器官としては報告されていないため、これらの所見のメカニズムは不明である。

雄の乳腺

ラット 3 カ月間反復投与毒性試験において、40/20 mg/kg/日群の雄で乳腺に軽度の腺萎縮が認められた。同様の変化は雌ラットにはみられず、イヌでは雌雄のいずれにも認められなかった。変性性又は炎症性の変化がみられなかったこと、また多くの上皮において再生能が知られていることから、この変化は投与終了により回復する可能性があると考えられた。

野生型 EGFR 及び HER2 を含む ErbB ファミリーメンバーは乳腺に発現し、この構造の成長及び発達の調節に関与すると考えられる（Wiesen et al, 1999; Jones and Stern, 1999; Jackson-Fisher et al, 2004）。成獣のカニクイザルに EGF を投与したところ、乳腺において上皮の過形成が認められた（Reindel et al, 2001）。乳腺はラパチニブ投与ラットの標的器官であることが確認されたが [EGFR 及び HER2 二重阻害剤；Lapatinib (Tradename Tykerb) 2007の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]、ゲフィチニブ、エルロチニブ及びアファチニブといった他の EGFR 阻害剤の標的器官としては報告されていない。したがって、AZD9291 投与ラットで観察された所見は本薬の薬理作用に起因する可能性があるが、雄の乳腺は一般に他の EGFR TKI の薬理作用の標的として報告されていないため、そのメカニズムは不明である。

ハーダー腺

ラット 3 カ月間反復投与毒性試験において、軽微から軽度のハーダー腺の変性／再生が、10 mg/kg/日以上の用量で認められた。イヌでは同様の変化はみられなかった。

EGF はハーダー腺に発現し、遺伝子組換えヒト EGF を注入したラットではこの器官の上皮過形成がみられた（Watanabe et al, 1993、Breider et al, 1996）。したがって、AZD9291 投与ラットでみられた所見は野生型 EGFR 阻害作用に一致するものであるが、ハーダー腺は他の EGFR 阻害剤の標的器官として報告されていないため、そのメカニズムは不明である。;

ヒトにはハーダー腺がないため、この所見の臨床的意義は限定的と考えられる。

造血系

ラット及びイヌで白血球数及びフィブリノゲンの増加並びに赤血球パラメータの減少がみられた。ラット 3 カ月間反復投与毒性試験では、これらの所見に伴って脾臓の造血亢進が認められた。同様の所見は他の EGFR 阻害剤でもみられており、皮膚及び消化管といった組織にみられる変性性及び炎症性変化による二次的変化と考えられる [Brown et al, 2008；Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。ラット 1 カ月間反復投与毒性試験でみられた赤血球及び白血球パラメータの変化は 1 カ月間の休薬により回復し（イヌでは 1 カ月の時点でこれらの変化は認められな

かった）、炎症性／変性性の病理学的変化の回復性と一致していた。ラット 3 カ月間反復投与毒性試験でみられた脾臓の造血亢進は軽微から軽度であり、やはり炎症性／変性性の病理学的変化の回復に伴って回復すると予想される。

ラットでは腸間膜リンパ節の病理組織学的所見（1 及び 3 カ月後に 20 mg/kg/日以上の用量で洞内赤血球及び赤血球貪食）及び胸腺重量減少（1 カ月後の 20 mg/kg/日以上）もみられたが、1 カ月間の休薬により回復した。腸間膜リンパ節の所見は軽微から軽度で、他の変性性の変化及び赤血球分解に由来する色素を伴わなかったことから、毒性学的意義は小さいと考えられる。

ラットの 7 及び 14 日間反復投与毒性試験で検討した高い用量（40 mg/kg/日以上）においては、別の変化が胸腺（軽微から中等度の低細胞性及び重量減少）、脾臓（重量減少）及び骨髄（軽微から軽度の低細胞性）にみられ、網状赤血球数及び白血球数の減少を伴う場合もあった。イヌでは同様の組織学的変化及び器官重量の変化は認められなかった。これらの変化は、重度の摂餌量減少、重度の体重減少及び毒性症状がみられ、忍容性がみられない用量又は忍容性の低い用量で認められたが、これらの所見の発現メカニズムは不明であり、これらの変化の一部又は全部はストレスに関連している可能性がある（Pearse, 2006; Everds et al, 2013）。イヌ 14 日間反復投与毒性試験で重度の血小板数減少がみられたが、忍容性がみられない用量（40 mg/kg/日以上）においてのみであり、それに伴う病理組織学的変化は認められず、そのメカニズムは不明であった。

肺

ラット 3 カ月間反復投与毒性試験で泡沫状肺胞マクロファージ集簇の発現頻度増加がみられたが（10 mg/kg/日以上の雄及び 20 mg/kg/日の雌）、その多くは軽微から軽度であった。電子顕微鏡検査で、マクロファージの細胞質中に膜遺残物質を含む多数の二次的ライソゾーム又は低電子密度の環状構造物のクラスターが認められた。これらの形態学的特徴は対照動物及び AZD9291 投与動物の両方でみられたが、被験物質投与動物の方がより顕著であった。AZD9291 投与群の雌にみられた膜遺残物質の特徴的な渦巻き状、密な多層性又は輪状の構造物は、初期リン脂質症に一致するものと考えられた。雌雄にみられた低電子密度の環状構造物のクラスターは、リポフスチン（光学顕微鏡検査ではリポフスチン色素は検出されなかったが）又は多胞体と解釈される。多胞体の場合、EGFR は多胞体を介して処理され、受容体リサイクリング又はライソゾームによる分解を受けることが知られていることから（Eden et al., 2009）、AZD9291 の投与によりこの過程が妨害される結果として、マクロファージの細胞質内にこれらの多胞体が蓄積する可能性がある。

肺にはこれらの所見に伴う他の炎症性又は変性性の変化はみられなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。イヌの試験では同様の所見は認められなかった。肺の形態学的変化はみられず、これらの変化は概ね軽微から軽度であったことから、可逆的と予想される（Chatman et al, 2009）。

遺伝毒性

AZD9291 は Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験で変異原性を示さず、*in vivo* ラット小核試験で遺伝毒性を示さなかったことから、ヒトにおける遺伝毒性のリスクはないと考えられる。

生殖発生毒性

ラット及びイヌへの 1 カ月間投与により可逆的な精巣の病理学的変化がみられ、ラット 3 カ月間反復投与毒性試験（40/20 mg/kg/日）では雄受胎能への悪影響が認められた。

AZD9291 を雌ラットに 1 カ月間投与したところ、10 mg/kg/日以上の用量で可逆的な病理学的変化が卵巣（黄体変性）及び雌性生殖器（発情休止期の像及び時に上皮変性を伴う上皮菲薄化）

にみられた。これは野生型 EGFR 阻害作用に一致するものである。ICH S9 ガイドラインに従い、雌受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

胚・胎児発生及び初期の生後生存／成長への影響を、出産期を含めた変法によるラットの胚・胎児発生に関する試験で評価した。20 mg/kg/日以上の用量で母動物毒性がみられた。ラットに着床前から妊娠 20 日まで投与したところ、20 mg/kg/日の用量で着床後胚損失率の増加が認められた。主要な器官形成期（妊娠 6～16 日）の投与に伴って、20 及び 30 mg/kg/日の用量で胎児体重減少がみられた。妊娠期間中及び初期授乳期間中における母動物への投与（妊娠 6 日から少なくとも分娩後 6 日まで）により、20 mg/kg/日以上の用量で出生児生存率低下（30 mg/kg/日で 100%の同腹児死亡）及び出生児体重減少が誘発された。被験物質に関連した胎児又は出生児の外表異常及び内臓異常は認められなかった（30 mg/kg/日までの用量）。出生児においても AZD9291 及び AZ7550 への曝露が確認されたことから、AZD9291 及びその代謝物の乳汁中排泄の可能性が示唆される。

EGF は胎盤の着床並びに胚の成長及び分化において大きな役割を果たすことが知られており、EGFR ノックアウトマウスでは成長遅滞、上皮発達障害並びに着床前及び生後の致死性が誘発される（Miettinen et al, 1995; Threadgill et al, 1995; Sibilia and Wagner, 1995）。他の ErbB ファミリーメンバーのノックアウトマウスにおいても、胚致死性及び周生期致死性が認められている（Wieduwilt and Moasser, 2008）。したがって、妊娠期又は授乳期のラットへの AZD9291 の投与後にみられた毒性変化は、本薬の薬理作用に基づくものと予想され、同様の変化は他の EGFR 阻害剤でも報告されている [Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002及びAfatinib (Tradename Gilotrif) 2013の FDA 新薬承認申請資料パッケージ]。

AZD9291 は、臨床使用時の曝露量で、ラットの胚生存率並びに出生後初期の生存及び成長に対する影響を示したことから、ウサギを用いた確証的胚・胎児発生に関する試験並びにラットの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を実施して製品表示にその情報を記載する必要はないと考え、ICHS9, 2009ガイドラインに従って試験を実施しなかった。

蛋白質への共有結合

AZD9291 は強力かつ不可逆的な EGFR 阻害剤であり、薬物動態試験において蛋白質への共有結合を示した（薬物動態試験の概要文、2.6.4.4.2.5 及び.2.6.4.4.2.6 項参照）ことから、理論的に特異体質性肝臓毒性及び／又は免疫を介した毒性のリスクがある。しかしながら、AZD9291 の非臨床毒性プロファイルは可逆的 EGFR 阻害剤（ゲフィチニブ及びエルロチニブ等）でみられるものと概ね一致しており、最長 3 カ月間の反復投与毒性試験では、明らかな肝臓又は免疫に関連した徴候は確認されなかった。白血球パラメータの増加がラット及びイヌでみられたが、同様の変化は可逆的 EGFR 阻害剤でも観察されており、これらの変化は皮膚及び消化管にみられた野生型 EGFR 関連の変性性／炎症性変化による二次的なものと考えられる。用量設定試験では他の潜在的な免疫活性化のマーカー（ラット 7 日間反復投与毒性試験における α-2 マクログロブリン及びイヌ 14 日間反復投与毒性試験におけるリンパ球サブセット）についての予備的な評価を実施したが、特記すべき変化は認められなかった。

代謝物

ヒトにおける AZ5104 及び AZ7550 代謝物の曝露量は循環血中総薬物曝露量の 10%未満であったことから（AURA 試験において AZD9291 を 80 mg の用量で投与された患者 32 例からの定常状態における曝露量に基づく；ヒト PK データについては 2.7.2 項参照）、ICHM3, 2009ガイドラインに基づくと、これらの代謝物についての特定の非臨床における安全性検討は必要ないと考えられる。しかしながら、毒性試験を開始した時点でこれらの代謝物のヒトにおける血中濃度は不明

であり、いずれの代謝物も薬理活性を有することから、ラット及びイヌの 1 及び 3 カ月間反復投与毒性試験、ラットの胚・胎児発生に関する試験並びに GLP 適用の安全性薬理試験において AZ5104 及び AZ7550 への全身曝露量を測定した（薬理試験の概要文、2.6.2.4 項参照）。AZ7550 の曝露量は全ての試験で定量されたが、分析上の問題により、AZ5104 の曝露量を定量できたのはイヌ 1 カ月間反復投与毒性試験及びイヌの心血管系テレメトリー試験のみであった（薬物動態試験の概要文、2.6.4.2.1 項参照）。また、AZ5104 を雌ラットに 1 カ月間経口投与したときの毒性を評価する探索的試験を実施した。生存期間中の所見、臨床病理検査所見及び病理組織学的所見は、ラットに AZD9291 を投与してみられたものと一致していた。AZD9291 の重要な反復投与毒性試験及び AZ5104 のラット 1 カ月間反復投与毒性試験で検討した最高用量でのラット及びイヌにおけるこれらの代謝物の曝露量と、ヒトに 80 mg を投与したときにみられた曝露量との比較を表 5に示す。

In vitro 副次的薬理スクリーニングによると、これらの代謝物のプロファイルは AZD9291 と類似していた（薬理試験の概要文、2.6.2.3 項参照）。

これらの試験は、予定している標的患者集団において、これらの代謝物に関する十分な安全性評価を提供するものと考えられる。

表5　AZD9291 の重要な毒性試験の最高用量における AZ5104 及び AZ7550 曝露量の平均値並びにラット探索的試験における AZ5014 経口投与後の曝露量とヒトとの比較

試験	用量 (mg/kg/日)	AZ5104 AUC_{0-24} (nmol·h/L)	AZ5104 C_{max} (nmol/L)	AZ7550 AUC_{0-24} (nmol·h/L)	AZ7550 C_{max} (nmol/L)
AZD9291 の試験：					
ラット 1 カ月間	雄：40	ND	ND	雄：1340	雄：70.9
	雌：20			雌：554	雌：31.0
ラット 3 カ月間	雄：40/20	ND	ND	雄：870	雄：52.5
	雌：20			雌：909	雌：50.2
イヌ 1 カ月間	20/12	646	39.6	2450	199
イヌ 3 カ月間	10/6	ND	ND	579	41.0
AZ5104 の探索的試験：					
ラット 1 カ月間	雌：15	4060	312	NA	NA
ヒト	80 mg [a]	1600	80	1300	61

ND：分析上の問題により算出せず；NA：該当せず
動物データは、AZD9291 の試験（試験番号 3416AR、526248、1351AD 及び 526253；いずれも GLP 適用で実施）及び AZ5104 のラット 1 カ月間探索的試験（3500KR、非 GLP 試験）の投与期間終了時における総薬物濃度の群平均値（イヌの試験では雌雄併合）である。

[a] 日本人進行 NSCLC の患者に AZD9291 錠を 80 mg の用量で連日投与したときの定常状態における曝露量の算術平均 [AURA 試験における患者 32 例から得られたデータ；ヒト PK データについては、モジュール 2.7.2 臨床薬理の概要を参照]。

注：凍結時安定性の問題により、1 カ月間反復投与毒性試験で測定した AZ7550 及び AZ5104 の血漿中濃度は、採血時より低かった可能性がある（薬物動態試験の概要文、2.6.4.2.1 項参照）。

不純物

ICHQ3A, 2006ガイドラインで求められている全ての不純物について適切に安全性を確認した。AZD9291 メシル酸塩の製造過程で生じる可能性のある変異原性不純物あるいはICHM7, 2014ガイドラインに示されているような分解産物を特定するための完璧な分析を実施した（不純物、3.2.S.3.2 項を参照）。変異原性あるいは変異原性を有する可能性のある不純物については規格値又は製造工程によって制御した（不純物、3.2.S.3.2 項を参照）。

更に、1 群雌雄各 10 匹からなる 3 群の Han Wistar ラットに、媒体又は AZD9291（2 ロットのうちの 1 つ）を 10 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、28 日間経口投与した。市販品の合成経路及び製造工程で製造された新規ロット（ロット番号 [redacted]）及び先に実施した 1 カ月間反復投与毒性試験（試験番号 3416AR）に使用した AZD9291（ロット番号 [redacted]）の 2 ロットを用いた。別に TK 試験群（1 群雌雄各 3 匹）を設けた。検査項目は、一般状態観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血漿生化学的検査、尿検査、尿生化学的検査、血漿中 AZD9291 濃度、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。2 ロットの AZD9291 の毒性プロファイルはほぼ同様で、新しいロットに含まれる不純物によると思われる新規毒性所見は認められなかった。

2.6.6.11 結論

AZD9292 の非臨床毒性プロファイルは本薬の薬理作用を大きく反映しており、他の EGFR TKI で報告されているもの [Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004、Gefitinib (Tradename Iressa) 2002、Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013及びLapatinib (Tradename Tykerb) 2007の FDA 新薬承認申請資料パッケージ] と概ね一致している。

AZD9291 をラット及びイヌに最長 3 カ月間、連日経口投与したときの主要な病理組織学的所見は野生型 EGFR 阻害作用に一致するものであり、所見としては用量に関連した萎縮性、炎症性及び／又は変性性の変化が皮膚、眼（角膜）、消化管（舌を含む）及び雌性生殖器（ラットのみ）の上皮に認められた。白血球数増加及び赤血球パラメータ減少がラット及びイヌにみられ、ラットの脾臓に観察された造血亢進は、これらの組織でみられた変性性及び炎症性変化により二次的に生じたものと考えられる。同様の所見は他の EGFR 阻害剤でもみられており、これらはクラス効果と考えられる。

用量制限毒性の所見は、体重減少を伴う摂餌量減少（ラット及びイヌ）並びに眼の症状及び眼科学的所見（イヌにおける角膜上皮潰瘍／びらん及び結膜発赤）であった。

病理組織学的変化が雄性生殖器（主にラット及びイヌの精巣にみられた精細管萎縮／変性及び／又は精子細胞停留。ラット 3 カ月間反復投与毒性試験ではこれに伴って雄受胎能に悪影響がみられた）、雄の乳腺（ラットにおける腺萎縮）及びハーダー腺（ラットにおける変性／再生）にみられたが、これらも本薬の薬理作用に関連している可能性がある。

ラット 3 カ月間反復投与毒性試験の肺において、泡沫状肺胞マクロファージ集簇の発現頻度増加がみられた。これらの所見は概ね軽微から軽度で他には肺の炎症性／変性性変化はみられなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。

胸腺及び骨髄の低細胞性が、ラットの 7 及び 14 日間反復投与毒性試験において忍容性がみられない用量又は忍容性が低い用量（40 mg/kg/日以上）で認められた。これらの所見の発現機序は不明であったが、その一部又は全部はストレスに関連して生じた可能性がある。

ラット及びイヌの 1 カ月間反復投与毒性試験で回復性を評価したところ、全ての所見（皮膚、眼、消化管及び雌雄の生殖器の病理組織学的所見を含む）において回復性がみられたが、角膜の変化の一部（ラットの角膜上皮萎縮及びイヌの角膜半透明化）の回復性は部分的であった。

AZD9291 は一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で遺伝毒性を示さなかった。

その薬理作用に基づいて予想されるように、AZD9291 を妊娠ラット又は授乳中のラットに投与したとき、胚の生存並びに生後初期の生存及び成長に重度の悪影響が認められた。

AZD9291 は、UV 光の存在下及び非存在下で実施した *in vitro* 光毒性試験において、光毒性を示すデータは認められなかった。

ラット及びイヌを用いた主要な毒性試験において、代謝物 AZ5104 及び AZ7550 への曝露が確認された。また、AZ5104 をラットに 1 カ月間経口投与したところ、AZD9291 と類似した毒性プロファイルが認められた。これらの試験は、代謝物についての十分な安全性評価を提供するものと考えられる。

ICHQ3A, 2006ガイドラインで求められている全ての不純物について適切に安全性を確認した。AZD9291 メシル酸塩の製造過程で生じる可能性のある変異原性不純物あるいはICHM7, 2014ガイドラインに示されているような分解産物を特定するための完璧な分析を実施した。変異原性あるいは変異原性を有する可能性のある不純物については、規格値又は製造工程によって制御した。更に、2 ロット（市販品の合成経路及び製造工程で製造された新規ロットと先に実施した 1 カ月間反復投与毒性試験（試験番号 3416AR）に使用したロット）の AZD9291 のラット 1 カ月間反復投与毒性試験における毒性プロファイルはほぼ同様で、新しいロットに含まれる不純物によると思われる新規毒性所見は認められなかった。

AZD9291 の非臨床毒性プロファイルは、予定の適応症において許容可能なものと考えられる。

2.6.6.12 参考文献

Afatinib (Tradename Gilotrif) 2013

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for afatinib (Gilotrif) NDA 201292. April 2013. Available from:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/201292Orig1s000PharmR.pdf.

Assarsson et al, 1995

Assarsson B, Nilsson I and Selstam G. Ovarian levels of epidermal growth factor receptor mRNA in the rat - a postovulatory decrease. Acta Physiol Scand 1995;154(2): 177-183.

Breider et al, 1996

Breider MA, Bleavins MR, Reindel, JF, Gough AW and de la Iglesia FA. Cellular hyperplasia in rats following continuous intravenous infusion of recombinant human epidermal growth factor. Vet Pathol 1996;33:184-194.

Brown et al, 2008

Brown AP. Dunstan RW, Courtney, CL, Criswell KA and Graziano MJ. Cutaneous Lesions in the Rat Following Administration of an Irreversible Inhibitor of erbB Receptors, Including the Epidermal Growth Factor Receptor. Toxicologic Pathology 2008; 36(3): 410-419.

Carpenter and Wahl, 1990

Carpenter G and Wahl MI. The epidermal growth factor family. In: Sporn MB, Roberts AB, editors. Handbook of Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and their Receptors. Berlin: Springer-Verlag; 1990 : p.69–171.

Chabot et al, 1986

Chabot J-G, St-Arnaud R, Walker P and Pelletier G. Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. Molec and Cell Endocrin 1986;44:99-108.

Chatman et al, 2009

Chatman, LA, Morton, D, O'Johnson, TO and Anway, SD. Strategy for risk management of drug-induced phospholipidosis. Toxicologic Pathology 2009; 37: 997-1005.

Collins et al, 1990

Collins JM, Grieshaber CK, Chabner BA. Pharmacologically Guided Phase I Clinical Trials based upon Preclinical Drug Development. Journal of the National Cancer Institute 1990;82 (16):1321-1326.

Eden et al., 2009

Eden ER, White IJ and Futter CE. Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. Biochem. Soc. Trans. 2009; 37: 173-177.

Erlotinib (Tradename Tarceva) 2004

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for erlotinib (Tarceva) NDA 21-743. November 2004. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-743_Tarceva_PharmR.PDF.

Everds et al, 2013

Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasey DM, Foley GL, Rosol TJ and Sellers T. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact and assessment. Toxicologic Pathology 2013; 41: 560-614

Gefitinib (Tradename Iressa) 2002

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for gefitinib (Iressa) NDA 21-399. August 2002. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-399_IRESSA_Pharmr_P1.pdf and http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-399_IRESSA_Pharmr_P2.pdf.

ICHM3, 2009

ICHM3(R2) Guidance on Nonclincal Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (June 2009).

ICHM7, 2014

ICHM7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk (June 2014).

ICHQ3A, 2006

ICHQ3A(R2) Impurities in New Drug Substances (October 2006)

ICHS9, 2009

ICHS9 Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals (October 2009)

Jackson-Fisher et al, 2004

Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Ramabhadran R, Morris JK, Lee K-F and Stern DF. ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. PNAS 2004; 101 (49): 17138-17143.

Jones and Stern, 1999

Jones FE and Stern DF. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. Oncogene 1999; 18: 3481-3490.

Kruse, 1994

Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. Eye 1994;8: 170-183.

Lapatinib (Tradename Tykerb) 2007

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for lapatinib (Tykerb) NDA 22-059. March 2007. Available from:
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P1.pdf,
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P2.pdf, and
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022059s000_PharmR_P3.pdf.

Liu et al, 1994

Liu A, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Menon M and Seethalakshmi L. Effects of sialoadenectomy and epidermal growth factor on testicular function of sexually mature male mice. The Journal of Urology 1994; 152: 554-561.

Miettinen et al, 1995

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z and Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. Nature 1995; 376: 337-341.

Murillas et al, 1995

Murillas R, Larcher F, Conti CJ, Santos M, Ullrich A and Jorcano JL. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. EMBO Journal 1995;14 (21): 5216-5223.

OECD, 2004

OECD Guideline for testing for chemicals: 432. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test (2004).

Pearse, 2006

Pearse, G. Histopathology of the thymus. Toxicologic Pathology 2006; 34 (5): 515-547.

Press et al, 1990

Press MF, Cordon-Cardo C and Slamon DJ. Expression of the HER2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene 1990; 5: 953-962.

Redfern et al, 2011

Redfern WS, Storey S, Tse K, Hussain Q, Maung, KP, Valentin J-P, Ahmed G, Bigley A, Heathcote D and McKay JS. Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: Effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 2011; 63: 102-114.

Reindel et al, 1996

Reindel JF, Pilcher GD, Gough AW, Haskins JR and de la Iglesia FA. Recombinant human epidermal growth factor induced structural changes in the digestive tract of cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Toxicologic Pathology 1996;24 (6): 669-680.

Reindel et al, 2001

Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP and de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. Toxicologic Pathology 2001; 29 (2): 159-173.

Schultz et al, 1992

Schultz G, Chegini N, Grant M, Khaw P and Mackay S. Effects of Growth Factors on

Corneal Wound Healing. Acta Ophthalmologica 1992; 70, Suppl.: 202:60-66

Sibilia and Wagner, 1995

Sibilia M and Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. Science 1995; 269: 234-238.

Threadgill et al, 1995

Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ and Magnuson T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. Science 1995; 269: 230-234.

Tseng, 1996

Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal stem cells. Molec Biol Reports 1996;23:47-58.

Vinter-Jensen, 1999

Vinter-Jensen L. Pharmacological effects of epidermal growth factor (EGF) with focus on the urinary and gastrointestinal tracts. APMIS 1999;107 (Suppl 93): 5-42.

Wald, 2005

Wald M. Epidermal growth factor and spermatogenesis. The Journal of Urology 2005;174: 2089-2090.

Watanabe et al, 1993

Watanabe H, Ohashi Y, Kinoshita S, Manabe R and Oshiden K. Distribution of epidermal growth factor in rat ocular and periocular tissues. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1993;231: 228-232.

Wieduwilt and Moasser, 2008

Wieduwilt MJ and Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 1566-1584.

Wiesen et al, 1999

Wiesen JF, Young P, Werb Z and Cunha GR. Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. Development 1999;126: 335-344.

Wong and Wright, 1999

Wong W-M and Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth, and adaptation. J Parenter Enteral Nutr 1999;23 (5) S83-S88.

Yan et al, 1998

Yan YC, Sun YP and Zhang ML. Testis epidermal growth factor and spermatogenesis. Archives of Andrology 1998;40: 133-146.

Yano et al, 2003

Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, Averbuch S and Wadsworth P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. Anticancer Research 2003;23: 3639-3650.

AstraZeneca

第 2 部　CTD の概要

一般名：オシメルチニブメシル酸塩

版番号：[redacted]

2.6.7 毒性試験概要表

タグリッソ®錠

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

目次　　頁

目次 2
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 8
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 10
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 14
2.6.7.5　単回投与毒性試験 15
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 16
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 21
2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験 42
2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験 49
2.6.7.10　がん原性試験 51
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 52
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 53
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 54
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 66
2.6.7.15　新生児を用いた試験 67
2.6.7.16　局所刺激性試験 68
2.6.7.17　その他の毒性試験 69

表目次

2.6.7.3.1 Comparison of Mouse, Rat, Dog and Human Exposure (AUC) Following Repeated Oral Administration of AZD9291 10
2.6.7.3.2 Comparison of Mouse, Rat, Dog and Human Exposure (C_{max}) Following Repeated Oral Administration of AZD9291 12
2.6.7.17 Mechanistic Studies 69
2.6.7.17　Metabolites 71
2.6.7.17 Phototoxicity 99

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number (Sponsor reference number)	Location in CTD
2.6.7.5 Single-dose toxicity 2.6.7.6/7 Repeat-dose toxicity	Not applicable[e]							
	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	2 days	100, 300, 1000	No	AstraZeneca, UK.	3544KR	4.2.3.2
	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	7 days	0, 50, 100, 200	No	AstraZeneca, UK.	3278DR	4.2.3.2
	Rat /Han Wistar	Oral (gavage)	14 days	0, 20, 40, 60	No	AstraZeneca, UK.	3310DR	4.2.3.2
	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	1 month + 1 month recovery	0, 4, 10, 20 (F), 40 (M)	Yes	AstraZeneca, UK.	3416AR	4.2.3.2
	Rat/ Han Wistar	Oral (gavage)	3 months	0, 1, 10, 20 (F), 40 (M)[b]	Yes	[redacted], UK.	526248 (3698PR)	4.2.3.2

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number (Sponsor reference number)	Location in CTD
	Dog / Beagle	Oral (gavage)	MTD phase: single ascending doses with at least 2 dose free days between each dose level. Repeat dose phase: 14 days	MTD phase: 10, 30, 100, 200, 400 Repeat dose phase:10, 20, 40, 60	No	AstraZeneca, UK.	1324DD	4.2.3.2
	Dog / Beagle	Oral (gavage)	1 month + 1 month recovery	0, 2, 6, 20/12[c]	Yes	AstraZeneca, UK.	1351AD	4.2.3.2
	Dog / Beagle	Oral (gavage)	3 months	1, 3, 10/6[d]	Yes	[redacted], UK.	526253 (1454PD)	4.2.3.2
2.6.7.8/9 Genotoxicity								
Bacterial reverse mutation assay	*S.typhimurium* and *E.Coli*	*In vitro*	-	0.3 - 333.3 µg/plate	Yes	[redacted], UK.	793061 (2948BV)	4.2.3.3.1
Mammalian cell gene mutation and chromosome aberration assay	L5178Y TK+/- Mouse Lymphoma cell line	*In vitro*	-	0.25 – 4 µg/mL (-S9); 1.25 – 6.5 µg/mL (+S9)	Yes	[redacted], UK.	793056 (2949MV)	4.2.3.3.1
Bone marrow micronucleus test	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	2 days	0, 30, 150 300	Yes	[redacted], UK.	793538 (3553QR)	4.2.3.3.2

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number (Sponsor reference number)	Location in CTD
2.6.7.10 Carcinogenicity	Not applicable[e]							
2.6.7.11-14 Reproductive & development toxicity								
Embryofetal development and pre- and post-natal development	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	Phase 1: GD2 to 20 Phase 2: GD6 to 16 Phase 3: GD6 to Day 6 of lactation	Phase1: 0, 20 Phase 2: 0, 1, 10, 20, 30 Phase 3 (Batch 1): 0, 1, 30 Phase 3 (Batch 2): 0, 1, 20	Yes	[redacted], [redacted], UK.	496800 (3710RR)	4.2.3.5.2
2.6.7.15 Studies in juvenile animals	Not applicable[e]							
2.6.7.16 Local tolerance	Not applicable[e]							
2.6.7.17 Other toxicity studies								
Electron microscopy examination of lungs from 3 month rat study	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	3 months	0, 20 (F), 40 (M)[d]	No	[redacted], [redacted], USA	EM-14.148 (3358KV)	4.2.3.7.3

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number (Sponsor reference number)	Location in CTD
1 month oral investigative toxicity study with the AZ5104 metabolite	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	MTD phase: 6 or 14 days Main test phase: 1 month	MTD phase: 50, 100 (6 days); 10, 20 (14 days) Main test phase: 0, 5, 10, 15	No	AstraZeneca, UK.	3500KR	4.2.3.7.5
2.6.7.17 Impurities								
Bacterial reverse mutation assay (不純物C＊)	*S.typhimurium* and *E.Coli*	*In vitro*	-	5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], UK.	8306010 (3398BV)	4.2.3.7.6
Bacterial reverse mutation assay (不純物A＊)	*S.typhimurium* and *E.Coli*	*In vitro*	-	5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], UK.	8303535 (3353BV)	4.2.3.7.6
Bacterial reverse mutation assay (不純物D＊)	*S.typhimurium* and *E.Coli*	*In vitro*	-	1.25-1250 µg/plate	Yes	[redacted], UK.	8303536 (3354BV)	4.2.3.7.6
Bacterial reverse mutation assay (不純物B＊)	*S.typhimurium* and *E.Coli*	*In vitro*	-	5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], UK.	8303534 (3352BV)	4.2.3.7.6
1 month rat study for impurity qualification[f]	Rat / Han Wistar	Oral (gavage)	1 month	0, 10	Yes	[redacted], UK.	528622 (3898DR)	4.2.3.7.6
2.6.7.17 Other toxicity studies								
In vitro 3T3 phototoxicity	Balb/c 3T3 fibroblasts	*In vitro*	-	0.04763 - 150.5 µg/mL	Yes	[redacted], UK.	8273754 (2950BV)	4.2.3.7.7

＊新薬承認情報提供時に置換えた

AZD9291 is referred to red to as AZ13552748 in some of the study reports.　The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550, respectively in the study reports.

M, male; F, female; GD, gestation day

[a] In the repeat dose toxicity studies, the highest No Observed Adverse-Effect Level (NOAEL) is underlined where identified, except for the 3 month rat study where the low dose was a No Observable Effect Level (NOEL).

[b] The high dose males received 40 mg/kg/day from Day 1 to 55, but were taken off-dose from Day 56 followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62 due to adverse clinical signs.

c The high dose group initially received 20 mg/kg/day, but were taken off-dose from Days 8 to 10 due to adverse clinical signs followed by a dose reduction to 12 mg/kg/day from Day 11.

[d] The high dose group initially received 10 mg/kg/day, but the dose was reduced to 6 mg/kg/day from Day 23 due to adverse clinical signs (individual dogs were taken off-dose for short periods between Days 9 and 25).

[e] Studies not required for the present indication.

[f] This study was conducted to mitigate any risk of unqualified impurities being present in the drug substance manufactured at the commercial site and at commercial scale, however, following full evaluation of AZD9291 mesylate batches manufactured at the commercial site this study was not required for impurity qualification purposes.

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number (Sponsor reference number)	Location in CTD
2 day repeat dose	Rat	Oral (gavage)	100, 300, 1000	No	3544KR	4.2.3.2
7 day repeat dose	Rat	Oral (gavage)	0, 50, 100, 200	No	3278DR	4.2.3.2
14 day repeat dose	Rat	Oral (gavage)	0, 20, 40, 60	No	3310DR	4.2.3.2
1 month repeat dose	Rat	Oral (gavage)	0, 4, 10, 20 (F), 40 (M)	Yes	3416AR	4.2.3.2
3 month repeat dose	Rat	Oral (gavage)	0, 1, 10, 20 (F), 40 (M)[a]	Yes	526248 (3698PR)	4.2.3.2
MTD and 14 day repeat dose	Dog	Oral (gavage)	MTD phase: 10, 30, 100, 200, 400 14 day phase: 10, 20, 40, 60	No	1324DD	4.2.3.2
1 month repeat dose	Dog	Oral (gavage)	0, 2, 6, 20/12[b]	Yes	1351AD	4.2.3.2
3 month repeat dose	Dog	Oral (gavage)	1, 3, 10/6[c]	Yes	526253 (1454PD)	4.2.3.2
Embryofetal development and pre- and post-natal development	Rat	Oral (gavage)	Phase 1: 0, 20 Phase 2: 0, 1, 10, 20, 30 Phase 3 (Batch 1): 0, 1, 30 Phase 3 (Batch 2): 0, 1, 20	Yes	496800 (3710RR)	4.2.3.5.2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number (Sponsor reference number)	Location in CTD
1 month oral investigative study with the AZ5104 metabolite	Rat	Oral (gavage)	MTD phase: 10, 20, 50, 100 Main test phase: 0, 5, 10, 15	No	3500KR	4.2.3.7.5
1 month rat study for impurity qualification[d]	Rat	Oral (gavage)	0, 10	Yes	528622 (3898DR)	4.2.3.7.6

[a] The high dose males received 40 mg/kg/day from Day 1 to 55, but were taken off-dose from Day 56 followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62 due to adverse clinical signs.

[b] The high dose group initially received 20 mg/kg/day, but were taken off-dose from Days 8 to 10 due to adverse clinical signs followed by a dose reduction to 12 mg/kg/day from Day 11.

[c] The high dose group initially received 10 mg/kg/day, but the dose was reduced to 6 mg/kg/day from Day 23 due to adverse clinical signs (individual dogs were taken off-dose for short periods between Days 9 and 25)

[d] This study was conducted to mitigate any risk of unqualified impurities being present in the drug substance manufactured at the commercial site and at commercial scale, however, following full evaluation of AZD9291 mesylate batches manufactured at the commercial site this study was not required for impurity qualification purposes.

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

2.6.7.3.1 Comparison of Mouse, Rat, Dog and Human Exposure (AUC) Following Repeated Oral Administration of AZD9291

Dose (mg/kg/day)	Plasma $AUC_{(0-24)}$ (nM.h)				
	Rat (male)	Rat (female)	Dog (male)	Dog (female)	Human[b]
1	254[f]	543[f]	704[i]	818[i]	
		1130[j]			
1.14[a]					12120
2			2610[h]	2720[h]	
3			2590[i]	1820[i]	
4	1660[e]	2470[e]			
6			8150[h]	6400[h]	
			6150[i]	4690[i]	
10	2500[e]	3410[e]	21200[g]	27300[g]	
	2810[f]	6190[f]			
		10200[j]			
12			12300[h]	12000[h]	
20	5230[d]	7650[d]		19900[g]	
		9980[e]			
	5880[f]	16200[f]			
		16600[j]			
30		21200[j]			
40	12200[d]	16400[d]	97100[g]		
	9530[e]				
50	19200[c]				
60	19400[d]		58100[g]		
100	50200[c]				
200	96600[c]				

AZD9291 is referred to as AZ13552748 in some of the study reports. The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550, respectively in the study reports.

In the repeat dose toxicity studies, the highest No Observed Adverse-Effect Level (NOAEL) is underlined where identified, except for the 3 month rat study where the low dose was a No Observable Effect Level (NOEL).
AZD9291 mesylate salt was used for studies 526248, 526253 and 496800. All other AZD9291 studies used the free base.
a Human therapeutic dose of 80 mg is equivalent to 1.14 mg/kg assuming a 70 kg subject.
[b] Human group mean steady state total plasma concentrations following administration of AZD9291 at 80 mg in capsules to NSCLC patients (preliminary data from AURA D5160C00001 (NCT01802632) based on 87 patients for AUC and 90 patients for C_{max} at data cut off on 1 August 2014; see Module 2.7.2 Summary of Clinical Pharmacology for final human exposure data).
[c] 3278DR - 7 day rat study (data for 50, 100 and 200 mg/kg/day is from Day 7, 5 and 4, respectively);
[d] 3310DR - 14 day rat study (data for females at 40 mg/kg/day is from Day 11);
[e] 3416AR - 1 month rat study;
[f] 526248 - 3 month rat study. Males dosed at 40 mg/kg/day from Days 1 to 55, then taken off dose from Day 56 followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62 to completion of dosing.
[g] 1324DD - 14 day dog study (data for males at 40 and 60 mg/kg/day are from Day 7);
[h] 1351AD - 1 month dog study. Males dosed at 20 mg/kg/day from Days 8 to 10, then dosed at 12 mg/kg/day from Day 11 to completion of dosing.
[i] 526253 - 3 month dog study. Males dosed at 10 mg/kg/day from Days 1 to 22, then dosed at 6 mg/kg/day from Day 23 to completion of dosing. Individual dogs were taken off dose for short periods between days 9 and 25.
[j] 496800 - rat embryofetal development and pre- and post-natal study (data from Phase 2 dams that were dosed from Day 6 to Day 16 of gestation; data is from Day 16 of gestation).
Note: AZD9291 plasma concentrations measured in samples from the 1 month rat and dog studies may have been lower than at blood sampling due to frozen stability issues (see Module 2.6.4 Pharmacokinetics Written Summary).

2.6.7.3.2 Comparison of Mouse, Rat, Dog and Human Exposure (C_{max}) Following Repeated Oral Administration of AZD9291

Dose (mg/kg/day)	Plasma C_{max} (nM)				
	Rat (male)	Rat (female)	Dog (male)	Dog (female)	Human[b]
1	24.3[f]	50.5[f]	64.3[i]	73.8[i]	
		86.7[j]			
1.14[a]					635
2			209[h]	250[h]	
3			217[i]	175[i]	
4	129[e]	200[e]			
6			855[h]	529[h]	
			459[i]	390[i]	
10	218[e]	329[e]	1580[g]	2620[g]	
	294[f]	472[f]			
		759[j]			
12			968[h]	1140[h]	
20	428[d]	476[d]		1330[g]	
		615[e]			
	408[f]	1020[f]			
		990[j]			
30		1430[j]			
40	678[d]	1020[d]	6050[g]		
	546[e]				
50	1090[c]				
60	1160[d]		3610[g]		

2.6.7.3.2 Comparison of Mouse, Rat, Dog and Human Exposure (C_{max}) Following Repeated Oral Administration of AZD9291

Dose (mg/kg/day)	Plasma C_{max} (nM)				
	Rat (male)	Rat (female)	Dog (male)	Dog (female)	Human[b]
100	2310[c]				
200	4830[c]				

AZD9291 is referred to as AZ13552748 in some of the study reports. The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550, respectively in the study reports.

In the repeat dose toxicity studies, the highest No Observed Adverse-Effect Level (NOAEL) is underlined where identified, except for the 3 month rat study where the low dose was a No Observable Effect Level (NOEL).

AZD9291 mesylate salt was used for studies 526248, 526253 and 496800. All other AZD9291 studies used the free base.

[a] Human therapeutic dose of 80 mg is equivalent to 1.14 mg/kg assuming a 70 kg subject.

[b] Human group mean steady state total plasma concentrations following administration of AZD9291 at 80 mg in capsules to NSCLC patients (preliminary data from AURA D5160C00001 (NCT01802632) based on 87 patients for AUC and 90 patients for C_{max} at data cut off on 1 August 2014; see Module 2.7.2 Summary of Clinical Pharmacology for final human exposure data).

[c] 3278DR - 7 day rat study (data for 50, 100 and 200 mg/kg/day is from Day 7, 5 and 4, respectively);

[d] 3310DR - 14 day rat study (data for females at 40 mg/kg/day is from Day 11);

[e] 3416AR - 1 month rat study;

[f] 526248 - 3 month rat study. Males dosed at 40 mg/kg/day from Days 1 to 55, then taken off dose from Day 56 followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62 to completion of dosing.

[g] 1324DD - 14 day dog study (data for males at 40 and 60 mg/kg/day are from Day 7);

[h] 1351AD - 1 month dog study. Males dosed at 20 mg/kg/day from Days 8 to 10, then dosed at 12 mg/kg/day from Day 11 to completion of dosing.

[i] 526253 - 3 month dog study. Males dosed at 10 mg/kg/day from Days 1 to 22, then dosed at 6 mg/kg/day from Day 23 to completion of dosing. Individual dogs were taken off dose for short periods between days 9 and 25.

[j] 496800 - rat embryofetal development and pre- and post-natal study (data from Phase 2 dams that were dosed from Day 6 to Day 16 of gestation; data is from Day 16 of gestation).

Note: AZD9291 plasma concentrations measured in samples from the 1 month rat and dog studies may have been lower than at blood sampling due to frozen stability issues (see Module 2.6.4 Pharmacokinetics Written Summary).

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Batch number	Purity (%)[e]	Specified impurities (% w/w)				Study number	Type of study
Proposed specifications:						-	-
[redacted][a, d]						3416AR	1 month rat
						1351AD	1 month dog
						528622	1 month rat (batch comparison)
[redacted][b, d]						526248	3 month rat
						526253	3 month dog
						496800	Rat embryofetal development and pre- and post-natal development
[redacted][a, d]						528622	1 month rat (batch comparison)
[redacted][b]						793061	Bacterial mutation test
						793056	Mouse lymphoma assay
						793538	Rat bone marrow micronucleus test
						8273754	*In vitro* phototoxicity

Table includes batches used in the pivotal GLP toxicology, genetic toxicology and reproductive toxicity studies.
AZD9291 is also known as AZ13552748.

[a] AZD9291 free base
[b] AZD9291 mesylate salt
[c] Analytical method employed at the time of analysis was unable to resolve [redacted].
[d] Levels of specified impurities presented have been generated using the methodology presented in the CMC documents (see Module 3, S.4.2 Analytical Procedures). Purity and impurity levels may therefore differ to those stated in the original study plans and study reports for the toxicology studies.
[e] Purity calculated as 100% minus total impurities (where total impurities = organic impurities + solvents + water + sulphated ash), organic solvents and water.

ND none detected; % w/w, % weight/weight; N/A, not applicable.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

該当なし

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Han Wistar	Oral, gavage (formulated in water containing 0.5% w/v HPMC and methane sulphonic acid)	2 days (followed by an observation period of up to 6 days).	100, 300, 1000	1M (100 and 1000 mg/kg) 3M (300 mg/kg)	Not identified.	1000 mg/kg not tolerated due to adverse clinical signs. 100 and 300 mg/kg were tolerated with weight loss at both doses, and clinical signs at 300 mg/kg. Macroscopic findings present in the gastrointestinal tract at ≥300mg/kg/day, but no histopathological was examination conducted.	Astra Zeneca, UK	3544KR
Rat / Han Wistar	Oral, gavage (Suspension containing 0.5% w/v hydroxypropyl methylcellulose /0.1% w/v Polysorbate 80 in water)	Up to 7 days	0, 50 100 200	3M	Not identified.	100 and 200 mg/kg/day not tolerated due to weight loss, reduced food consumption and clinical signs. 50 mg/kg/day was tolerated, but with weight loss, reduced food consumption and clinical signs. Haematology (mainly decreases in reticulocytes, white blood cells and lymphocytes, and increases in neutrophils) and plasma chemistry (mainly decreases in triglycerides, sodium and total protein, and increases in phosphate and potassium) changes seen at all doses. Compound-related histopathological findings present in the thymus (decreased lymphocytes and/or single cell lymphocyte necrosis), sternum (decreased bone marrow cellularity), forestomach (inflammatory cell infiltration and erosion/ulceration accompanied by increases in stomach weights and macroscopic observations of	Astra Zeneca, UK	3278DR

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
						crateriform depressions in some animals) and duodenum (inflammatory cell infiltration) at ≥100 mg/kg/day. Histopathological findings in the thymus and crateriform depressions in the stomach were also present at 50 mg/kg/day. Finding in the liver (reduced glycogen associated with decreases in liver weights) at ≥100 mg/kg/day was considered secondary to reduced food consumption.		
Rat / Han Wistar	Oral, gavage (Suspension containing 0.5% w/v hydroxypropyl methylcellulose in water)	Up to 14 days	0, 20 40 60	4M + 4F	Not identified.	40 and 60 mg/kg/day not tolerated by females due to weight loss, reduced food consumption and adverse clinical signs. Males tolerated doses up to 60 mg/kg/day, but with adverse clinical signs (60 mg/kg/day), reduced body weight gain/weight loss (40/60 mg/kg/day) and reduced food consumption (≥40 mg/kg/day). Females at 20 mg/kg/day showed slight reductions in food consumption. Minor reductions in visual acuity noted at ≥40 mg/kg/day. Reduction in fecal pellet production in males at 60 mg/kg on Day 3. Haematology changes seen at all doses (mainly decreases in reticulocytes and increases in neutrophils, monocytes and lymphocytes). Plasma chemistry changes seen at ≥40 mg/kg/day (mainly decreases in ALP, triglycerides, total protein, albumin, globulin, calcium, cholesterol, phosphate and glucose, and increases in urea and	Astra Zeneca, UK	3310DR

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
						creatinine). Decreases in urine total protein noted in males at all doses. Compound-related histopathological findings present in the eye (corneal epithelial atrophy), thymus (hypocellularity and lymphocytolysis; reduced organ weights), bone marrow (hypocellularity) and small intestine (villous/epithelial atrophy, epithelial degeneration/necrosis/inflammation) at ≥40 mg/kg/day. Finding in the eye also present at 20 mg/kg/day in females. Finding in the liver (reduced glycogen) at ≥40 mg/kg/day in females considered secondary to reduced food consumption. Decrease in liver and spleen weights in males at 60 mg/kg/day.		
Dog / Beagle	Oral, gavage (water containing 0.5% w/v hydroxypropyl methylcellulose)	MTD phase:[b] single ascending doses with at least 2 days washout between doses followed by a 5 day repeat dose phase.	MTD phase: 10 30 100 200 400 100 for 5 days Repeat dose phase: 10	1M + 1F	Not established.	MTD phase: Single doses up to 400 mg/kg were tolerated with clinical signs (mainly emesis at ≥100 mg/kg with the male showing multiple incidences of emesis at 400 mg/kg), weight loss (≥200 mg/kg) and reductions in food consumption (≥10 mg/kg). 100 mg/kg/day was tolerated for 5 days with clinical signs, weight loss and reduced food consumption/ inappetance The main haematology changes comprised decreases in red cell counts, haemoglobin and haematocrit, and increases in white cell counts. The main plasma chemistry changes were increases in cholesterol, triglycerides and ALP,	Astra Zeneca, UK	1324DD

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
		Repeat dose phase: Up to 14 days	20 40 60			and decreases in potassium and sodium. Tissues from these animals were not subject to a histopathological examination. Repeat dose phase: Doses of ≥ 20 mg/kg/day in males and ≥40 mg/kg/day in females not tolerated due to adverse clinical signs, weight loss and reduced food consumption/inappetance. Doses of 10 mg/kg/day in the male and up to 20 mg/kg/day in females were tolerated with clinical signs, weight loss and reduced food consumption (20 mg/kg). The female dosed at 20 mg/kg/day also showed corneal translucency (with evidence of epithelial erosion) at ophthalmology examination. Some increases in blood pressure noted at ≥20 mg/kg/day, but may be related to poor condition. Haematology (mainly decreases in platelets accompanied by macrothrombocytes on peripheral blood smears, and red cell parameters and increases in neutrophils, monocytes and large unstained cells) and plasma chemistry changes (mainly increases in triglycerides, total protein, globulin, phosphate and ALP and decreases in sodium and creatinine) mainly seen at ≥20 mg/kg/day, but increases in cholesterol also		

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
						present at 10 mg/kg/day. Compound-related histopathological changes in the eyes (corneal epithelial atrophy with occasional ulceration/erosion), skin (epithelial degeneration) and tongue (epithelial atrophy, erosion and/or ulceration) at ≥10 mg/kg/day and also in the intestine (inflammatory cell infiltration and/or epithelial degeneration) at ≥20 mg/kg/day.		

M, male; F, female
[a] No Observed Adverse Effect Level.
[b] The dogs were observed for 10 days after the final dose was administered.

All non pivotal repeat dose toxicology studies were non-GLP.
AZD9291 is also referred to as AZ13552748 in some of the study reports.
The metabolites AZ5104 and AZ7550 are referred to as AZ13575104 and AZ13597550, respectively, in the study reports.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity	**Report Title: AZD9291: One Month Oral Toxicity Study with Assessment of Recovery in the Rat**	**Test Article: AZD9291**
Species / Strain: Rat / Han Wistar	**Duration of dosing: 28 days**	**Study number: 3416AR**
Initial age: Approximately 10 weeks	**Duration of post-dose: 28 days**	**GLP compliance: Yes**
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration: Oral, gavage**	**Testing Facility: AstraZeneca, UK**
Special features: None.		**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v hydroxypropyl methylcellulose.

No observed adverse-effect level: Not established.

Conclusion: Oral administration of AZD9291 to rats at doses of 4, 10 and 40/20 mg/kg/day (male/female respectively) was tolerated for one month. Compound-related histopathological changes were present in the eye, skin/muzzle, tongue, testes, epididymides, uterus, ovaries and mesenteric lymph nodes (males only) at 40/20 mg/kg/day. The findings in the tongue (female only), testes, uterus and ovaries were present at 10 mg/kg/day and the finding in the eyes was present at 4 and 10 mg/kg/day. A NOEL was not identified. These findings were not present following the 4 week recovery period (except for minimal corneal epithelial atrophy in one female) indicating reversibility.

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		4		10		M:40 F:20	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Toxicokinetics[a]:								
AZD9291:								
$AUC_{(0-24)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	1660	2470	2500	3410	9530	9980
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	129	200	218	329	546	615
AZ7550 (metabolite):								
$AUC_{(0-24)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	NC	NC	343	278	1340	554
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	14.2	11.2	25.9	22.2	70.9	31.0
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[b]	(g)							
Day 29	375	236	+0.3	+0.8	+3.7	-0.8	-7.2	-4.7
Body Weight Gain (%)[b]	(g)							
Day 1 to 29	+68	+31	-4.4	-3.2	+7.4	-13	-47	-23
Food Consumption (%)[b]	(g/animal/day)							
Day 1 to 8	24	18	+4	-6	+4	-6*	-21	-17**
Clinical Observations[c]	-	-	-	-	-	-	+	+

Daily Dose (mg/kg)		0 (vehicle)		4		10		M:40 F:20	
Number of Animals Main Recovery		M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Haematology[d]									
Haemoglobin	g/dL	15.2	14.2	14.8	14.2	14.5***	14.1	14.1***	13.9
Mean Cell Haemoglobin	pg	17.9	18.3	17.8	18.0	17.3*	18.0	17.2*	17.9
Haematocrit	L/L	0.47	0.44	0.46	0.44	0.45***	0.44	0.44***	0.44
White Blood Cell Count	10^9/L	6.95	4.70	7.25	5.34	7.56	5.96**	10.09***	5.84*
Neutrophils	10^9/L	0.94	0.62	0.88	0.62	1.03	0.88*	2.38***	1.13**
Lymphocytes	10^9/L	5.67	3.80	6.03	4.39	6.11	4.76	7.14*	4.39
Monocytes	10^9/L	0.14	0.13	0.15	0.17	0.18	0.16	0.34***	0.18*
Plasma Chemistry[d]									
Triglycerides	mmol/L	2.18	1.71	1.52	1.84	1.91	1.92	1.44*	1.72
Cholesterol	mmol/L	2.0	1.9	2.0	1.9	1.8	1.8	1.5**	1.6
Total Protein	g/L	66	76	65	72	65	74	62**	71*
Albumin	g/L	43	50	42	48	41*	49	40***	46**
Globulin	g/L	23	25	24	24	23	25	22*	24
Organ Weights (%)[b]									
Epididymides									
(absolute)		1.24 g		-10.0		-4.37		-14.91*	
(relative to body weight)		0.3296 %		-10.16		-6.84		-7.69	
Liver									
(absolute)		14.10 g	9.16 g	-7.87	-4.30	-1.71	-0.43	-14.61*	-6.29
(relative to body weight)		3.75 %	3.83 %	-7.91	-4.90	-6.45	+0.85	-7.69	-1.41
Thymus									
(absolute)		0.4483 g	0.3548 g	-5.69	-9.10	-1.96	-6.60	-31.88**	-18.69**
(relative to body weight)		0.1187 %	0.1489 %	-4.68	-9.60	-4.39	-5.80	-26.37**	-14.65*
Prostate									

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		4		10		M:40 F:20	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
(absolute)	0.4268 g		-15.67		-15.60		-39.64**	
(relative to body weigh)	0.1153 %		-17.14		-18.72		-36.07**	
Gross Pathology								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Mesenteric Lymph Node								
Discoloured								
Dark reddish	0	0	0	0	0	0	1	0
Patchy red	0	0	0	0	0	0	3	0
Reddish	0	0	0	0	0	0	4	1
Muzzle - Scab	0	0	0	0	0	0	1	0
Histopathology								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Eyes								
Corneal epithelial atrophy								
Grade 1	0	0	8	6	9	4	0	0
Grade 2	0	0	2	4	1	6	7	8
Grade 3	0	0	0	0	0	0	3	2
Skin - Muzzle								
Focal/Follicular Inflammatory Cell Infiltration								
Grade 1	0	0	0	0	0	0	1	2
Grade 2	0	0	0	0	0	0	2	2
Follicular Dysplasia								
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	1

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		4		10		M:40 F:20	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Erosion/Ulceration								
Grade 2	0	0	0	0	0	0	0	1
Skin/Subcutis								
Follicular Dysplasia								
Grade 1	0	0	0	0	0	0	0	2
Focal/Follicular Inflammatory Cell Infiltration								
Grade 1	0	0	0	0	0	0	1	1
Grade 2	0	0	0	0	0	0	1	0
Tongue								
Epithelial Atrophy								
Grade 1	0	0	0	0	0	8	10	10
Mesenteric Lymph Node								
Sinus Erythrocytes with Erythrophagocytosis								
Grade 1	0	0	0	0	0	0	1	0
Grade 2	0	0	0	0	0	0	8	1
Grade 3	0	0	0	0	0	0	1	0
Testes								
Spermatid Retention								
Grade 1	0		0		3		4	
Grade 2	0		0		0		1	
Tubular Degeneration								
Grade 1	0		0		0		2	
Grade 2	0		0		0		3	
Grade 3	0		0		0		1	

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		4		10		M:40 F:20	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Epididymides								
Reduced Sperm								
Grade 1	0		0		0		2	
Grade 2	0		0		0		1	
Grade 3	0		1		0		0	
Cellular Debris in Lumena								
Grade 1	0		0		0		2	
Grade 2	0		0		0		1	
Grade 3	0		1		0		0	
Uterus								
Anoestrus/Low Epithelium		0		0		4		10
Ovaries								
Corpora Luteal – Degeneration / Inflammatory cell infiltration		0		0		4		10
Post-dose Evaluation:								
Noteworthy Findings:								
Histopathology								
Number Evaluated	5	5					5	5
Eyes								
Corneal epithelial atrophy Grade 1	0	0					0	1

The metabolite AZ7550 was referred to as AZ13597550 in the study report.
- No noteworthy findings. NC, not calculated. BLQ, below lower limit of quantification
Grading for histopathology: Grade 1 = minimal; Grade 2 = mild or slight; Grade 3 = moderate

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.　Body weight and food consumption were analysed using Williams' test, clinical pathology data were analysed by Shirley's test and organ weight data were analysed by Dunn's test or Dunnett's test (main test animals).　Statistical analysis was not conducted on the body weight gain data.

[a] Day 28 group mean data shown. Additional satellite animals were used for the toxicokinetic assessment (3/sex/group).　AUC values marked NC were not calculated due to limited data being available to define $AUC_{(0\text{-}24)}$ for all animals.

[b] Group mean data from the end of the dosing period is presented unless otherwise stated.　For controls, group means are shown and for compound-treated groups percent differences from controls are shown.　Body weight and food consumption data is for Groups 1 to 4.　Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[c] Piloerection (all males and 1 female), scabbing around the muzzle and staining around the eyes (1 male).

[d] Group mean data from the end of the dosing.

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity	**Report Title: AZD9291: Three Month Oral (Gavage) Toxicity Study in the Rat**	**Test Article: AZD9291**
Species / Strain: Rat / Han Wistar	**Duration of dosing:** up to 92 days.	**Study number:** 526248
Initial age: Main study: approximately 8-10 weeks at start of dosing. Additional females included for male fertility arm: approximately 13 weeks at start of mating.	**Duration of post-dose:** None.	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted]20[redacted].	**Method of administration:** Oral, by gavage.	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special features: Included an assessment of male fertility.	**Day of C Section:** Day 14-16 of gestation	**Vehicle / Formulation:** MilliQ water pH adjusted with methane sulfonic acid (final pH3 to 3.5)

No observed adverse-effect level: 1 mg/kg/day

Conclusion: Oral administration of AZD9291 to male rats at 40 mg/kg/day was not well tolerated and the animals were taken off-dose from Day 56 due to adverse clinical signs, body weight loss and reduced food consumption, followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62. Doses of 1, 10 and 20 mg/kg/day were well tolerated in both sexes for up to 3 months with clinical signs at 10 mg/kg/day and above. Compound-related histopathological changes were present in the skin, cornea, oesophagus, tongue, testes, uterus, vagina, Harderian gland, lung and spleen at 10 mg/kg/day and above, and in the stomach, male mammary gland and mesenteric lymph nodes at 40/20 (males) and 20 mg/kg/day (females). There was evidence of an effect on male fertility at 40/20 mg/kg/day. The low dose of 1 mg/kg/day was a no observable effect level (NOEL).

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		10		40/20[a]	20
Number of Animals Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Toxicokinetics [b]:								
AZD9291:								
$AUC_{(0-t)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	254	543	2810	6190	5880	16200
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	24.3	50.5	294	472	408	1020
AZ7550 (metabolite):								
$AUC_{(0-t)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	17.3	14.5	460	371	870	909
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	2.80	2.38	38.0	21.5	52.5	50.2
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[c]	(g)							
Day 57	412.1	244.9	-1.7	-1.1	-1.8	-0.3	-17.6***	-0.2
Body Weight Gain (%)[c]	(g)							
Day 1-92	+155.2	+63.8	-4.5	-0.9	-10.6	+3.8	-35*	-1.3
Food Consumption (%)[c]	(g/animal/day)							
Day 50-57	23.8	17.7	-2	-1	-2	-4	-22**	+1
Clinical Observations[d]	-	-	-	-	+	+	+++	++
Haematology[e]								
White blood cells ($x10^9$/L)	4.86	4.08	5.62	4.28	6.12	4.17	10.45***	8.24**
Neutrophils ($x10^9$/L)	0.98	0.55	1.11	0.73	1.39	0.95	4.51***	3.78***
Lymphocytes ($x10^9$/L)	3.62	3.31	4.18	3.30	4.40	2.99	5.34*	3.97
Monocytes ($x10^9$/L)	0.10	0.07	0.10	0.10	0.12	0.08	0.29**	0.24***
Basophils ($x10^9$/L)	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.08**	0.05**
Fibrinogen (mg/dL)	241	160	253	169	242	168	308**	246**
Plasma Chemistry[e]								
Albumin (g/L)	44	51	45	50	44	48	39*	43***
Globulin (g/L)	22	19	22	16	23	22	27**	23
Albumin/globulin ratio	2.0	2.8	2.1	3.0	1.9	2.2	1.5**	1.9**

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		10		40/20[a]	20
Number of Animals Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Urine Analysis[e]								
Volume (mL)	6.2	5.4	4.1	4.0	5.1	4.4	3.6	2.6
Specific gravity	1.008	1.008	1.012	1.008	1.013	1.011	1.021**	1.018***
Urine Chemistry[e]								
Protein/creatinine ratio	47.04	35.76	68.78	22.07*	57.26	27.32	92.69	97.42
NAG/creatinine ratio	1.9	1.7	1.8	1.9	1.7	2.3*	2.0	2.6**
Presence of blood[f]	1	1	0	0	0	0	4	4
Organ Weights (%)[g]								
Epididymides	1.333 g		-2.626		-10.13		-15.454**	
Prostate	0.483 g		-2.277		-14.29		-32.30**	
Uterus		0.829 g		-7.479		-39.57**		-33.78*
Gross Pathology								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Lymph Node mesenteric								
Discolouration, Dark	0	0	1	0	0	0	5	3
Skin								
Dry/flaky	0	0	0	0	0	2	8	6
Scab	0	0	0	0	0	1	1	5
Histopathology								
Number examined (unless otherwise specified)	10	10	10	10	10	10	10	10
Eye (cornea)								
Atrophy: epithelial								
Minimal	0	0	0	0	4	6	8	10
Eyelid								
Inflammation follicular/perifollicular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	3
Mild	0	0	0	0	0	0	2	2

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		10		40/20[a]	20
Number of Animals Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Gland, Harderian								
Degeneration/regeneration/single cell necrosis								
Minimal	0	0	0	0	2	2	4	1
Mild	0	0	0	0	0	1	1	5
Infiltration, lymphocytic								
Minimal	0	1	0	0	0	2	2	0
Mild	0	1	0	0	0	1	0	6
Gland, Mammary	(8)		(7)		(9)		(5)	
Atrophy								
Mild	0	0	0	0	0	0	5	0
Lung								
Macrophage aggregation, alveolar								
Minimal	3	1	3	1	6	3	5	3
Mild	0	0	0	0	2	0	3	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric								
Erythrophagocytosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	0	0	2	2
Oesophagus								
Atrophy: epithelial								
Minimal	0	0	0	0	7	4	8	10
Skin								
Inflammation follicular/perifollicular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	7	1
Mild	0	0	0	0	0	0	3	6

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		10		40/20[a]	20
Number of Animals Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Skin, abnormal site[h]	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)	(6)	(9)
Inflammation follicular/perifollicular								
Minimal					0	0	2	2
Mild					0	2	3	7
Moderate					0	0	0	2
Skin, muzzle								
Inflammation follicular/perifollicular								
Minimal	0	0	0	0	0	1	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	3	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	2
Marked	0	0	0	0	0	1	0	0
Spleen								
Increased hematopoiesis								
Minimal	0	0	0	0	0	2	5	3
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Stomach								
Atrophy: epithelial								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
Ulceration; non glandular								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Testis								
Spermatid retention								
Minimal	0		0		5		5	
Tongue								
Atrophy: epithelial								
Minimal	0	0	0	0	2	3	7	5

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		10		40/20[a]	20
Number of Animals Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Uterus								
Epithelial thinning								
Minimal		0		0		5		5
Vagina								
Epithelial thinning								
Minimal		0		0		5		6
Reproductive Phase[i]								
Number of males mated	10		10		10		10	
Number of undosed females mated		10		10		10		10
No of pregnant females		9		9		10		9
Mean number of corpora lutea		13.1		13.3		12.8		10.1
Mean number of implants		13.0		13.3		12.8		8.8
Mean number of live implants		12.4		12.9		12.3		8.4
Mean number of early embryonic deaths		0.6		0.4		0.5		0.3
Mean % pre-implantation loss		1		0		0		13
Mean of % post implantation loss		4		4		4		4

The metabolite AZ7550 was referred to as AZ13597550 in the study report.
- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked. BLQ, below lower limit of quantification

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Body weight, food consumption, absolute organ weights and organ weights as a percentage of terminal body weight were analysed using a parametric ANOVA. Pairwise comparisons were made using Dunnett's test or Student's t-test. Pairwise comparisons were made only if the overall F-test was significant. Haematology, coagulation, plasma chemistry and selected urinalysis data were analysed a Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. Pairwise comparisons were made using Dunn's test or a Wilcoxon Rank-Sum test. Pairwise comparisons were made only if the overall chi-squared test was significant.

[a] The males from the high dose group received 40 mg/kg/day from Days 1 to 55, but due to adverse clinical signs, body weight loss and reductions in food consumption these animals were taken off-dose on Day 56 followed by a dose reduction to 20 mg/kg/day from Day 62 until the completion of dosing.

[b] Day 91 group mean data shown. Additional satellite animals were used for the toxicokinetic assessment (3/sex/group). AZ13575104 not calculated since the incurred samples reproducibility failed to meet the acceptance criteria

[c] Group mean data from the end of the dosing period is presented unless otherwise stated. For controls, group means are shown and for compound-treated groups percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[d] Main clinical signs observed in males at 40 mg/kg/day were ploughing, skin flaking, scabbing and/or reddening, decreased activity, hunched posture, soft/liquid faeces, pilorection and abnormal gait. Following the dose reduction to 20 mg/kg/day, dry and ungroomed fur and skin flaking were observed. At 20 mg/kg/day in females, signs included ploughing, skin flaking and scabbing, dry and ungroomed fur, hunched posture and abnormal gait. At 10 mg/kg/day, skin flaking and scabbing were observed.

[e] Group mean data from the end of the dosing period is presented.
[f] Presence of blood in urine measured in the following scale: Negative, 1+ (0.03-0.06 mg/dL), 2+ (0.10-0.2 mg/dL), 3+ (0.5 mg/dL), 4+ (1.0 mg/dL or greater).
[g] For uterus weights, both absolute and relative weights showed statistically significant decreases compared to controls at 10 and 20 mg/kg/day. Absolute organ weights are presented.
[h] More than one abnormal skin site was sampled for some animals.
[i] For the male fertility assessments, each male rat from the main test groups was paired 1:1 with an undosed female (10 female per group).

2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity	**Report Title: AZD9291: One Month Oral Toxicity Study with Assessment of Recovery in the Dog**	**Test Article: AZD9291**
Species / Strain: Dog / Beagle	**Duration of dosing:** 28 days	**Study number:** 1351AD
Initial age: Approximately 17 to 21 months at start of dosing.	**Duration of post-dose:** 28 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral, gavage	**Testing Facility:** AstraZeneca, UK
Special features: None.	**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v hydroxypropyl methylcellulose.	

No observed adverse-effect level: Not established.

Conclusion: Oral administration of AZD9291 to dogs at 20 mg/kg/day was not tolerated and the animals were taken off-dose from Days 8 to 10, primarily due to corneal epithelial erosion/ulceration detected by ophthalmology, but also due to reduced food consumption, body weight loss and clinical signs. These changes generally showed evidence of recovery following reduction of the dose level to 12 mg/kg/day from Day 11. Doses of 2 and 6 mg/kg/day were well tolerated with minor clinical signs, and small reductions in food consumption and body weight loss. Histopathological changes were present in the eye, duodenum, ileum, tongue and skin at 20/12 mg/kg/day. The findings in the eye and tongue were also present at 6 mg/kg/day. There were findings in the testes and epididymides at 2 and 6 mg/kg/day, but not at 20/12 mg/kg/day. A NOEL was not identified. There were no histopathological findings present in any of the targets organs following 4 weeks off-dose indicating reversibility.

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		2		6		20/12[a]	
Number of Animals								
Main	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Recovery							M: 3	F: 3
Toxicokinetics [b]:								
AZD9291:								
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	2610	2720	8150	6400	12300	12000
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	209	250	855	529	968	1140
AZ7550 (metabolite):								
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	430	445	1870	945	2340	2560
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	29.9	37.1	154	75.5	176	222
AZ5104 (metabolite):								
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	198	234	574	506	656	636
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	11.1	11.4	33.1	29.1	38.6	40.6
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[c, d]	(kg)							
Day 8	13.5	11.7	-7.2	-4.8	-2.2	-6	-8.7	-4
Day 29	13.1	11.8	-5.8	-6.8	0	-5.1	-5.3	-5.7
Body Weight Gain (kg)[d]								
Day 1 to 8	-0.1	-0.1	-0.2	-0.3	-0.5	-0.4	-0.5	-0.5
Day 1 to 29	-0.4	0	-0.3	-0.5	-0.6	-0.2	-0.4	-0.6
Food Consumption (%)[c, d]	(g/animal/day)							
Week 1	315	282	-16	-14	+2	-17	+2	-30
Week 2	316	302	-9	-15	+3	-15	-2	-37
Clinical Observations[e]	-	-	+	+	+	+	+++	+++
Ophthalmoscopy								
Corneal translucency (number of animals affected) [f]	-	-	-	-	-	-	5	3
Haematology[g]								
Fibrinogen g/L	1.7	1.7	1.6	1.9	2.5	2.1	2.8	2.2
Plasma Chemistry[g]								

Daily Dose (mg/kg)		0 (vehicle)		2		6		20/12[a]	
Number of Animals									
Main		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Recovery								M: 3	F: 3
Cholesterol	g/L	4.7	5.8	10.8	9.3	12.4	10.8	8.7	11.1
Albumin	mmol/L	33	35	32	35	31	33	29	32
Histopathology									
Number examined		3	3	3	3	3	3	3	3
Duodenum:									
Atrophy									
Grade 2		0	0	0	0	0	0	1	2
Epididymides:									
Round cells present									
Grade 2		0		1		1		0	
Eyes:									
Corneal atrophy									
Grade 2		0	0	0	0	0	1	3	2
Grade 3		0	0	0	0	0	0	0	1
Ileum:									
Inflammatory Cell Infiltrates / Inflammation									
Grade 2									
		0	0	0	0	0	0	0	1
Skin/Subcutis:									
Epidermal atrophy									
Grade 2		0	0	0	0	0	0	3	3
Testes:									
Seminiferous Tubular Atrophy									
Grade 2		0		1		2		0	
Tongue:									
Epidermal atrophy									
Grade 2		0	0	0	0	1	2	3	3
Post-dose Evaluation:									

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)	2	6	20/12[a]
Number of Animals Main Recovery	M: 3 F: 3	M: 3 F: 3	M: 3 F: 3	M: 3 F: 3 M: 3 F: 3
Number Evaluated				3 3
Noteworthy Findings				
Ophthalmoscopy				
Corneal translucency (number of animals affected)				1 1

The metabolites AZ7550 and AZ5104 were referred to as AZ13597550 and AZ13575104, respectively, in the study reports.
- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked. BLQ, below lower limit of quantification
Grading for histopathology: Grade 1 = minimal; Grade 2 = mild or slight; Grade 3 = moderate
Statistical analysis was not performed for the data included in this table.

[a] The dose of 20 mg/kg/day was not tolerated (principally due to the eye-related ophthalmology findings and ocular clinical signs) and animals were taken off-dose from Days 8 to 10. Dosing recommenced at 12 mg/kg/day from Day 11.

[b] Day 28 group mean data shown.

[c] For controls group means are shown and for compound-treated groups percent differences from controls are shown.

[d] Data presented is for main study animals from Groups 1 to 4.

[e] The main clinical signs present at 20/12 mg/kg/day were eye-related observations (reddened conjunctiva, lachrymation, eyes shut or half shut), discoloured gums or tongue, salivation, slight ataxia (1/6 males) and subdued behaviour (1/6 males). There was a low incidence of altered faeces (soft, fluid, containing mucus or red colour) at all doses and emesis at 6 mg/kg/day and above.

[f] In some dogs dosed at 20/12 mg/kg/day corneal translucency was accompanied by areas within the lesion that stained positive with fluorscein dye suggesting corneal epithelial ulceration or erosion from Day 7/8, but this finding had resolved by the end of the dosing period.

[g] Group mean data from the end of the dosing period is presented.

2.6.7.7D Repeat-Dose Toxicity

Report Title: AZD9291: Three Month Oral (Gavage) Toxicity Study in the Dog

Test Article: AZD9291

Species / Strain: Dog / Beagle

Duration of dosing: Up to 92 days

Study number: 526253

Initial age: At least 24 months at start of dosing.

Duration of post-dose: None.

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral, gavage

Testing Facility: [redacted], UK

Special features: None.

Vehicle / Formulation: MilliQ water pH adjusted with methane sulfonic acid (final pH3 to 3.5)

No observed adverse-effect level: 3 mg/kg/day

Conclusion: In conclusion, oral administration of AZD9291 to dogs at 10 mg/kg/day was not tolerated due to ocular clinical signs, which resulted in individual animals being taken off dose for short periods between Days 9 and 25, and a dose reduction to 6 mg/kg/day for all animals from Day 23. These signs recovered and 6 mg/kg/day was well tolerated for the remainder of the dosing period with minor clinical signs. Doses of 1 and 3 mg/kg/day were well tolerated for 3 months with transient ocular clinical signs seen in two males at 3 mg/kg/day. Compound-related histopathological changes were present in the eyes, testes and epididymides for animals dosed at 10/6 mg/kg/day. The no observable adverse effect level (NOAEL) for this study was 3 mg/kg/day as the eye findings were transient in nature.

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		3		10/6[a]	
Number of Animals Main	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M:4	F: 4
Toxicokinetics [b]:								
AZD9291:								
$AUC_{(0-t)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	704	818	2590	1820	6150	4690
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	64.3	73.8	217	175	459	390
AZ7550 (metabolite):								
$AUC_{(0-24h)}$ (nmol.h/L)	BLQ	BLQ	70.1	97.8	309	399	615	542
C_{max} (nmol/L)	BLQ	BLQ	11.1	10.6	23.1	32.8	41.2	40.8
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[c]	(kg)							
Day 8	12.5	10.9	+2.4	-7.3	-0.8	-7.3	-4.0	-10.1
Body Weight Gain (kg)								
Day 1-8	0	-0.1	+0.2	+0.3	-0.1	+0.1	-0.4	-0.2
Food Consumption (%)[c]	(g/animal/day)							
Day 12	233 g	239 g	+29*	-9	+29*	-5	+24	-62**
Clinical Observations[d]	-	-	-	-	+	-	+++	+++
Ophthalmoscopy								
Corneal translucency (number of animals affected) [f]	-	-	-	-	-	-	3	3
Corneal opacities (number of animals affected)	-	-	-	-	-	-	3	-
Haematology[e]								
Neutrophils ($x10^9$/L)	8.20	6.23	6.43	5.75	6.73	6.46	12.44	5.70
Fibrinogen (mg/dL)	228	166	232	213	265	237	479	316**
Plasma Chemistry[e]								
Albumin (g/L)	39	40	37	37	38	38	35*	36*
Calcium (mmol/L)	2.70	2.71	2.59	2.60	2.56	2.60	2.50	2.56*
Cholesterol (mmol/L)	4.7	5.1	4.3	6.1	5.0	6.8	5.3	6.3
Albumin/globulin ratio	1.7	2.0	1.8	1.8	1.8	1.9	1.4	1.6**

Daily Dose (mg/kg)	0 (vehicle)		1		3		10/6[a]	
Number of Animals Main	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M:4	F: 4
Histopathology								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Eye (cornea)								
Epithelial atrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	3
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Testis								
Atrophy								
Minimal	0		0		0		1	
Mild	0		0		0		1	
Epididymis								
Decreased cellularity, sperm								
Minimal	0		0		0		1	
Moderate	0				0		1	

The metabolite AZ7550 was referred to as AZ13597550 in the study report.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked . BLQ, below lower limit of quantification

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Body weight and food consumption were analysed using a parametric ANOVA. Pairwise comparisons were made using Dunnett's test or Student's t-test. Pairwise comparisons were made only if the overall F-test was significant. Haematology, coagulation and plasma chemistry data were analysed using a Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. Pairwise comparisons were made using Dunn's test or a Wilcoxon Rank-Sum test. Pairwise comparisons were made only if the overall chi-squared test was significant.

[a] The dose of 10 mg/kg/day not tolerated due to ocular clinical signs and ophthalmology findings. This resulted in individual dogs being taken off-dose for short periods between Days 9 and 25 and a dose reduction to 6 mg/kg/day for all high dose animals from Day 23.

[b] Day 91 group mean data shown. AZ13575104 was not calculated since the incurred samples reproducibility failed to meet the acceptance criteria.

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

[d] The main clinical signs present at 10/6 mg/kg/day were eye-related observations (reddened conjunctiva, discharge, eyes shut or half shut) and occasional incidences of altered faeces (soft, fluid or containing mucus), salivation and emesis. At 3 mg/kg/day, there were transient observations of reddened conjunctiva and discharge (2/4 males).

[e] Group mean data from the end of the dosing period is presented.

[f] In some dogs dosed at 10/6 mg/kg/day corneal translucency was accompanied by areas within the lesion that stained positive with fluorescein dye suggesting corneal epithelial ulceration or erosion between Days 12 and 23.

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8A Genotoxicity: *in vitro*

Report Title: AZD9291: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 100, TA 1537 and TA 98 and *Escherichia coli* WP2*uvrA* (pKM101)

Test Article: AZD9291

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.

Strains: *S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100 and *E.coli* WP2*uvrA*(pKM101)

Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 10%

Vehicles: **For Test Article:** Dimethylsulphoxide (DMSO)

Number of independent assays: 1

Number of replicate cultures: 3

Number of cells analysed/culture: Not applicable

For positive controls: DMSO (9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, 2-aminoanthracene) and Water (sodium azide, potassium dichromate)

Study number: 793061

GLP compliance: Yes

Testing Facility: [redacted], UK

Treatment: Plate incorporation for 72 hours in the presence and absence of S9.

Date of treatment: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: The test item showed evidence of cytotoxicity to the bacteria. For each strain and under each condition, the minimum dose showing evidence of cytotoxicity ranged from 100 to 333.3 µg per plate. The maximum dose level scored for revertant colonies was 333.3 µg per plate, for all strains under both conditions.

Genotoxic effects: none.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA* (pKM101)
Without activation	DMSO	-	14.7 (10.0)	13.7 (1.2)	25.3 (5.8)	94.0 (1.7)	119.3 (19.3)
	AZD9291 Mesylate	0.3	16.3 (5.5)	16.7 (1.5)	34.7 (5.5)	85.3 (2.1)	123.7 (18.5)
	Salt	1	13.3 (1.5)	18.7 (2.3)	28.7 (3.1)	95.7 (3.8)	135.7 (6.4)
		3.3	15.3 (8.0)	20.0 (3.0)	32.7 (6.5)	99.3 (12.7)	129.0 (12.1)
		10	21.7 (3.2)	8.3 (2.1)	24.7 (2.3)	110.7 (10.8)	137.3 (15.5)
		33.3	12.7 (8.0)	16.3 (4.2)	32.0 (8.7)	104.0 (8.9)	122.0 (3.6)
		100	16.0 (5.6) [ST]	16.7 (1.2) [ST]	31.7 (4.0) [ST]	111.3 (9.0) [ST]	140.3 (12.0)
		333.3	14.0 (3.5) [TL]	6.7 (2.9) [VT]	18.7 (2.1) [TL]	24.3 (3.5) [VT]	94.7 (15.5) [TL]
	Sodium Azide	1	80.0 (16.5)			339.3 (13.4)	
	9-Aminoacridine	80		1387.7 (254.1)			
	2-Nitrofluorene	1			224.3 (31.9)		
	Potassium dichromate	25					780.0 (26.9)

[ST] - Slightly Thin Lawn.
[TL] - Thin Lawn.
[VT] - Very Thin lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA* (pKM101)
With activation	DMSO	-	16.0 (2.6)	15.3 (2.9)	39.0 (6.2)	111.3 (0.6)	212.3 (3.8)
	AZD9291 Mesylate	0.3	18.0 (7.8)	18.7 (1.5)	33.0 (4.6)	117.0 (14.1)	249.3 (20.3)
	Salt	1	13.0 (2.6)	19.0 (2.6)	38.0 (9.5)	99.0 (7.8)	227.3 (15.9)
		3.3	14.7 (8.1)	17.0 (4.6)	43.0 (5.0)	97.0 (1.7)	226.3 (14.7)
		10	12.3 (5.0)	18.7 (2.1)	35.3 (2.3)	95.3 (16.3)	235.0 (22.1)
		33.3	15.7 (9.0)	20.3 (4.9)	55.3 (3.2)	104.0 (11.1)	232.7 (19.5)
		100	13.7 (8.0)	21.0 (2.0)	47.3 (8.0)	106.3 (7.5)	234.3 (18.5)
		333.3	13.3 (6.4) [ST]	14.3 (2.5) [ST]	40.0 (14.7) [ST]	91.7 (17.6) [TL]	199.3 (10.7) [ST]
	2-Aminoanthracene	2	187.0 (19.1)	147.0 (15.4)	1056.0 (71.9)	2222.0 (88.7)	
		20					2134.0 (28.0)

[ST] - Slightly Thin Lawn.
[TL] - Thin lawn.

2.6.7.8B Genotoxicity: *in vitro*	**Report Title: AZD9291: Genetic Toxicity Evaluation using the Mouse Lymphoma Cell Thymidine Kinase Locus Assay**	**Test Article: AZD9291**
Test for induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.	**Number of independent assays:** 4 (-S9/3 hours exposure, -S9/24 hours exposure, +S9/3 hours exposure (2 assays)	**Study number:** 793056
Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	**Number of replicate cultures:** 4 solvent control, 2 test concentrations	**GLP compliance:** Yes
Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 2%	**Number of cells analysed/culture:** 6 x 10^6	**Testing Facility:** [redacted], UK
Vehicles: **For Test Article:** DMSO	**For positive controls:** DMSO (3-MC); Water (MMS)	
Treatment: 3 and 24 hours exposure in the absence of S9 and 3 hours exposure in the presence of S9.		**Date of treatment:** [redacted] 20[redacted] (Assays 1-3) [redacted] 20[redacted] (Assay 4)

Cytotoxic effects: In the absence of S9, relative total growth was 15% and 17% at 5 μmol/L following 3 and 24 hours exposure, respectively. In the presence of S9, relative total growth was 15% and 14% at 10 μmol/L in assays 2 and 4, respectively.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µmol/L)	Assay 1 + 2: 3-hour exposure			
			Relative Total Growth (%)	Mutant fraction ($x10^{-6}$)	**IMF (Induced Mutant Fraction x 10-6)**	Ratio of Small to Large Colonies
Without activation	DMSO	100 µL added	100	109	N/A	1.19
	AZD9291	1	105	84	-	1.24
		2	107	105	-	1.11
		3	69	97	-	1.29
		4	33	99	-	1.35
		5	15	144	35	1.93
		6, 7, 8	NPT	NPT	-	-
	MMS	10 µg/mL	53	920	810	2.83
With activation	DMSO	100 µL added	100	110	N/A	1.29
	AZD9291	2.5	NPS	NPS	-	-
		4.0	90	103	-	1.30
		5.5	57	142	32	0.87
		7.0	38	204	94	2.26
		8.5	24	271	161	1.04
		10.0	15	195	85	2.20
		11.5, 13.0	NPT	NPT	-	-
	3-MC	2.5 µg/mL	27	2122	2012	1.45
		10 µg/mL	10	2491	2380	1.71

IMF = Mutant fraction of treatment minus mutant fraction of vehicle control group
N/A = Not Applicable
NPS = Not Plated – Surplus
NPT = Not Plated – Toxic
- = IMF $\leq$ 0

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µmol/L)	Assay 3: 24-hour exposure			
			Relative Total Growth (%0	Mutant fraction ($x10^{-6}$)	**IMF (Induced Mutant Fraction x 10-6)**	Ratio of Small to Large Colonies
Without activation	DMSO	200 µL added	100	105	N/A	1.21
	AZD9291	0.5	NPS	NPS	-	-
		1.0	91	112	7	0.74
		2.0	77	109	4	1.25
		3.0	54	123	18	1.26
		4.0	37	169	64	0.78
		5.0	17	194	89	2.16
		6.0, 7.0	NPT	NPT	-	-
	MMS	5 µg/mL	49	1931	1825	1.47

IMF = Mutant fraction of treatment minus mutant fraction of vehicle control group
NPS = Not Plated - Surplus
N/A = Not Applicable .
NPT = Not Plated – Toxic
- = IMF $\leq$ 0.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µmol/L)	Assay 4 : 3-hour exposure			
			Relative Total Growth (%0	Mutant fraction ($x10^{-6}$)	**IMF (Induced Mutant Fraction x 10-6)**	Ratio of Small to Large Colonies
With activation	DMSO	100 µL added	100	139	-	1.63
	AZD9291	2.5	NPS	NPS	-	-
		4.0	64	163	24	1.69
		5.5	42	190	51	2.10
		7.0	46	114	-	1.32
		8.5	27	178	39	2.10
		10.0	14	234	95	1.56
		11.5, 13.0	NPT	NPT	-	-
	3-MC	2.5 µg/mL	28	2267	2128	1.38
		10 µg/mL	9	2414	2275	4.64

IMF = Mutant fraction of treatment minus mutant fraction of vehicle control group
NPS = Not Plated - Surplus
NPT = Not Plated – Toxic
- = IMF $\leq$ 0

2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9 Genotoxicity: *in vivo*	**Report Title: AZD9291: Genetic Toxicity Evaluation Using the Rat Micronucleus Test After Two Oral Doses**	**Test Article: AZD9291**
Test for induction of: Bone-marrow micronuclei (MN)	**Treatment schedule:** Two single doses 24 hours apart	**Study number:** 793538
Species / Strain: Rat/ Han Wistar	**Sampling time:** 24 hours after second dose	**GLP compliance:** Yes
Age: 10 Weeks at dosing	**Method of administration:** Oral, by gavage	**Testing Facility:** [redacted], UK
Cells evaluated: Immature erythrocytes (IEs)	**Vehicle / Formulation:** 0.5% hydroxypropylmethylcellulose E4M (3500-5600 cps)	**Date of dosing:** [redacted] 20[redacted]

Number of cells analysed/animal: 2000 IE
Special features: None.
Toxic/cytotoxic effects: None.
Genotoxic effects: None.
Evidence of exposure: Exposure not measured in this study, but AZD9291 was tested up to the maximum tolerated dose of 300 mg/kg/day.

Test Article	Dose mg/kg	Number of Animals	Mean % IE	Mean MN per 2000 IE 2000 IE counted
Vehicle	0	7M	59.8	2.0
AZD9291	30	7M	58.6	2.4
	150	7M	55.4	2.4
	300	7M	58.4	1.7
Cyclophosphamide	20	7M	52.1	55.7***

MN, micronucleated immature erythrocytes; IE, immature erythrocytes.

Statistically significant increase, Fisher's Exact Test *** P<0.001

2.6.7.10　がん原性試験

該当なし

2.6.7.11　　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

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

該当なし

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13 Reproduction and development toxicity - Effects on embryo-fetal development	**Report Title: AZD9291: Oral (Gavage) Investigative Dose Range Finding Embryofetal Development and Pre and Post Natal Study in the Rat**	**Test Article:AZD9291**
Design similar to ICH 4.1.1, 4.1.2 and 4.1.3	**Duration of dosing:** Phase 1: Day 2 to 20 gestation Phase 2: Day 6 to 16 gestation Phase 3: Day 6 gestation to at least Day 6 lactation	**Study number:** 496800
Species / Strain: Rat / Wistar Crl: WI(Han)	**Day of mating:** Day 0 **Day of littering:** Day 0 of lactation	**GLP compliance:** Yes
Initial age: 9 to 12 weeks at start of dosing	**Day of C-section:** Phase 1: Day 20 gestation Phase 2: Day 21 gestation Phase 3: Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	**Vehicle / Formulation:** MilliQ water adjusted to pH 3 to 3.5 with 0.12M methane sulfonic acid or 0.1N NaOH.

Special features: Study included additional phases to assess the effects of administration of AZD9291 during early pregnancy (Phase 1) and during lactation (Phase 3). In addition to dams, exposure to AZD9291, AZ7550 and AZ5104 was measured in fetuses (Day 20 of gestation – Phase 1) and pups (Day 6 of lactation – Phase 3).

No Observed Adverse-Effect Level:	**F_0 Females:**	Phase 1: Not established Phase 2: 10 mg/kg/day Phase 3: 1 mg/kg/day
	F_1 Litters:	Phase 2: 10 mg/kg/day Phase 3: 1 mg/kg/day

Conclusion: Once daily oral administration of AZD9291 at 20 mg/kg/day and above was associated with reductions in maternal body weight gain and food consumption, clinical observations and epithelial atrophy of the cornea and tongue. Increased post implantation loss was evident in dams dosed at 20 mg/kg/day from Day 2 (prior to implantation) until Day 20 of gestation. When administered during organogenesis (Day 6 to 16 of gestation), AZD9291 was associated with reduced fetal weights at 20 mg/kg/day and above, but there were no adverse effects on embryofetal survival. Administration of doses of 20 mg/kg/day and above from Day 6 of gestation to at least Day 6 of lactation was associated with a dose-related increase in total litter loss (100% at 30 mg/kg/day) and reduced mean pup weights. There were no compound related external or visceral abnormalities in fetuses or pups from dams at dose levels up to and including 30 mg/kg/day. Administration of 1 mg/kg/day AZD9291 during gestation and early lactation did not adversely affect maternal or reproductive endpoints and was considered to be the no observed adverse effect level (NOAEL) in this study.

Phase 1 (Dosing from GD2 to GD20) Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	20
No of Dams:	6	6
Number pregnant	6	6
Number died or sacrificed moribund	0	0
Number with total resorption of litter	0	0
Clinical observation	-	-
Necropsy observations	-	-
Gestation body weight (%)[a]	(g)	
Day 20	317	-11.4
Gestation body weight gain (%)[a]	(g)	
Day 2 to 20	103	-32.0
Gestation food consumption (%)[a]	(g/animal/day)	
Day 17	27	-26
Day 2 to 20	22	-13
Mean number of corpora lutea	13.5	12.7
Mean number of implantations	12.2	12.2
Mean % pre-implantation loss	9.5	3.7
Mean total gravid uterus weight	59	41

Phase 1 (Dosing from GD2 to GD20) Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	20
Litters:		
Mean Plasma concentrations (nmol/L)[b]		
AZD9291		
+2 hrs	BLQ	280
AZ7550 (metabolite)		
+2 hrs	BLQ	1.98
Number of litters evaluated	6	6
Number of live fetuses	61	44
Number of resorptions	12	29
Number of litters with dead fetuses	0	0
Mean % post-implantation loss	15	40
Maternal Histopathology[c]		
Number examined	6	6
Eye		
Atrophy, epithelial, cornea		
Minimal	0	3
Mild	0	1
Tongue		
Atrophy, epithelial		
Minimal	0	5

AZ7550 is referred to as AZ13597550 in the study report.

- No noteworthy findings; GD, gestation day. BLQ, below lower limit of quantification

Statistical analysis was not conducted. Assessments of intergroup effects were made by inspection of the individual and group mean data.

[a] For controls, group means are shown, for AZD9291-treated groups, percent differences from controls are shown.

[b] Fetuses at Day 20 of gestation were bled at termination, approximately 2 hrs post dose of the dam. Blood was pooled into 1 sample per litter. AZD9291 and AZ7550 metabolite were BLQ in samples taken from control fetuses.

[c] Eye and tongue were the only tissues subjected to histopathological examination.

Phase 2 (Dosing from GD6 to GD16) Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	1	10	20	30
No of Dams:	6	6	6	6	6
Toxicokinetics (Day 16)[a]**:**					
AZD9291					
$AUC_{(0-t)}$ (nmol.h/L)	BLQ	1130	10200	16600	21200
C_{max} (nmol/L**)**	BLQ	86.7	759	990	1430
AZ7550 (metabolite)					
$AUC_{(0-t)}$ (nmol.h/L)	BLQ	31.1	380	756	1020
C_{max} (nmol/L)	BLQ	2.61	25.1	43.7	58.9
Number pregnant	6	6	6	6	6
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0
Number with total resorption of litter	0	0	0	0	0
Clinical observation[b]	-	-	-	+	+
Necropsy observations	-	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%)[c]	(g)				
Day 6 to 16	45	+8.9	-17.8	-35.6	-71.1
Day 16 to 21	32	+31.3	+12.5	-34.4	-43.8
Gestation food consumption (%)[c]	(g/animal/day)				
Day 6 to 16	21.2	+6.7	-2.7	-9.4	-21.2
Day 19	24.7	+10.1	-8.5	-30.8	-52.6
Mean number of corpora lutea	11.8	12.8	12.0	12.5	12.7
Mean number of implantations	11.0	12.2	11.3	12.2	12.5
Mean % pre-implantation loss	7.6	5.0	5.8	3.2	1.5

Phase 2 (Dosing from GD6 to GD16) Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	1	10	20	30
Litters:					
Number of litters evaluated	6	6	6	6	6
Number of live fetuses	62	70	68	72	72
Number of resorptions	4	3	0	1	3
Number of litters with dead fetuses	0	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	5.6	4.0	0.0	1.2	3.0
Mean fetal body weight (litter) (g)	4.90	4.98	4.86	4.40	4.07
Fetal sex ratios (% Males)	47	47	51	50	42
Fetal abnormalities: Majors					
Number of fetuses (litters)	-	2 (1)	-	1 (1)	-
Anencephaly, absent lower jaw. Bilateral eyelids absent, bilateral pinna malpositioned. Mouth opening absent, small tongue, single median nostril. Small fetus	-	1 (1)	-	-	-
Lower jaw shortened mouth present as small opening. High arched palate, tongue markedly reduced (in size)	-	-	-	1 (1)	-
Thoracic situs inversus. Left and right single lung lobe present, accessory lung lobe present	-	1(1)	-	-	-

AZ7550 is referred to as AZ13597550 in the study report.

- No noteworthy findings; + Mild; GD, gestation day. BLQ, below lower limit of quantification
Statistical analysis was not conducted. Assessments of intergroup effects were made by inspection of the individual and group mean data.

[a] AZD9291 and AZ7550 metabolite were BLQ in samples taken from control animals.

[b] Clinical observations included piloerection, excess salivation and soft faeces.

[c] For controls, group means are shown, for AZD9291-treated groups, percent differences from controls are shown.

Phase 3 batch 1 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	1	30
Dams:	6	6	6
Mean Plasma concentrations (nmol/L**)** (Day 6 lactation)[a]			
AZD9291			
+2 hrs	BLQ	40.3	940
+24 hrs	BLQ	2.62	390
AZ7550 (metabolite)			
+2 hrs	BLQ	1.35	56.2
+24 hrs	BLQ	BLQ	41.4
Number pregnant	6	6	6
Number died or sacrificed moribund[b]	0	0	1
Number with total resorption of litter	0	0	0
Mean gestation length (days)	21.8	21.8	21.8
Number producing a live litter	6	6	3
Clinical observation[c]	-	-	++
Necropsy observations	-	-	-
Body weight gain (%)[d]	(g)		
Day 6 to 16 gestation	46	-2.2	-45.7
Day 1 to 7 lactation	39	-20.5	[e]
Gestation food consumption (%)[d]	(g/animal/day)		
Day 18	22.7	-5.3	-41.0
Day 6 to 20	20.0	-1.7	-25.1
Mean number of implantations	11.3	11.3	
Mean number of pups born	10.7	10.5	
Litters/Pups:			

Phase 3 batch 1 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg)	0 (Control)		1		30
Mean Plasma concentrations (nmol/L) (Day 6/7 lactation)[a,f]					
AZD9291					
+2 hrs	BLQ		BLQ		NE
+24 hrs	BLQ		BLQ		NE
AZ7550 (metabolite)					
+2 hrs	BLQ		BLQ		NE
+24 hrs	BLQ		BLQ		NE
Mean birth index (%)	96		93		71
Mean live birth index (%)	95		92		48
Mean viability index (%)	45		67		0
Number of litters lost at birth	0		0		2
Number of litters lost by Day 4 of lactation	3		2		3
Number of litters evaluated	3		4		0[e]
Number of pups examined	27		42		0
Mean of litter mean pup weight (g):	(M)	(F)	(M)	(F)	
Day 1	5.1	4.7	5.3	5.1	
Day 4	7.4	7.3	7.1	7.0	
Day 6	9.9	9.9	9.1	9.0	
Pup sex ratios Day 1 of lactation (% Males)	61		52		
Pup abnormalities:					
Gross	-		-		
Visceral	-		-		
Maternal Histopathology[g]					
Number examined	6		6		5

Phase 3 batch 1 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	1	30
Eye			
Atrophy, epithelial, cornea			
Minimal	0	0	2
Mild	0	0	2
Moderate	0	0	1
Oedema, cornea			
moderate	0	0	1
Vacuolation, endothelial			
mild	0	0	1
Tongue			
Atrophy, epithelial			
Minimal	0	0	5

AZ7550 is referred to as AZ13597550 in the study report.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; GD, gestation day. BLQ, below lower limit of quantification. NE, not evaluated
M = male, F = female

Statistical analysis was not conducted. Assessments of intergroup effects were made by inspection of the individual and group mean data.

[a] AZD9291 and AZ7550 metabolite were BLQ in samples taken from control dams and pups.

[b] Female 57 (30 mg/kg/day) killed Day 23 of gestation due to adverse clinical observations including subdued, thin, hunched body, laboured respiration, skin cold to touch, pale discoloured skin, encrusted lids in both eyes and eyes partially closed. Necropsy: small and large intestines contained yellow watery fluid. Microscopically: mild epithelial atrophy of the cornea in the eye and of the tongue (eye and tongue were the only tissues examined microscopically).

[c] Clinical observations included piloerection, thin and body hunched from Day 21 of gestation onwards.

[d] For controls, group means are shown, for AZD9291-treated groups, percent differences from controls are shown.

[e] Pups from 30 mg/kg/day group were dead by Day 4 lactation.

[f] Half of the pups in 1 mg/kg/day group were killed at approx 2 hrs post-dose and the other half at 24 hrs post-dose. All females in 30 mg/kg/day incurred a total litter loss therefore blood samples were not taken from this group.

[g] Eye and tongue were the only tissues subjected to histopathological examination.

Phase 3 batch 2 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1	20
Dams:	6	6	6
Mean Plasma concentrations (nmol/L) (Day 6 lactation)[a]			
AZD9291			
+2 hrs	NE	NE	1040
+24 hrs	NE	NE	221
AZ7550 metabolite			
+2 hrs	NE	NE	30.1
+24 hrs	NE	NE	15.0
Number pregnant	6	6	6
Number died or sacrificed moribund[b]	0	0	1
Mean gestation length (days)	21.8	21.5	22.3
Number producing a live litter	6	6	6
Clinical observations	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-
Gestation body weight gain (%)[c]	(g)		
Day 6-21	101	-5.9	-23.8
Gestation food consumption (%)[c]	(g/animal/day)		
Day 21	25.5	-1.96	-33.7
Lactation food consumption (%)[c]	(g/animal/day)		
Day 6	53.5	-1.5	-29.3
Mean number of implantations	10.7	10.6	12.3
Mean number of pups born	10.5	10.4	12.3
Litters/Pups:			

Phase 3 batch 2 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg/day)	0 (Control)		1		20	
Mean Plasma concentrations (nmol/L**)** (Day 6 lactation)[a,d]						
AZD9291						
+2 hrs	NE		NE		18.3	
+24 hrs	NE		NE		18.4	
AZ7550 (metabolite)						
+2 hrs	NE		NE		3.56	
+24 hrs	NE		NE		4.58	
Mean birth index (%)	98		95		99	
Mean live birth index (%)	99		87		100	
Mean viability index (%)	99		83		65	
Number of litters lost day 4 of lactation	0		1		2	
Number of litters evaluated	6		5		4	
Number of pups examined	61		52		48	
Mean of litter mean pup weight (g)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)
Day 1	6.9	6.7	6.6	6.1	5.5	5.3
Day 4	10.6	10.4	9.9	9.4	7.2	6.3
Day 7	15.8	15.6	15.2	14.6	8.9	8.8
Pup sex ratios Day 1 of lactation (% Males)	49		58		49	
Pup abnormalities:						
Gross	-		-		-	
Visceral	-		-		-	
Maternal Histopathology[e]						
Number examined	6		6		5	

Phase 3 batch 2 (Dosing from GD6 to Day 6 of lactation) Daily dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1	20
Eye			
Atrophy, epithelial, cornea			
Minimal	0	0	3
Mild	0	0	2
Tongue			
Atrophy, epithelial			
Minimal	0	0	5
Ulcer, focal with inflammation			
Moderate	0	0	1

AZ7550 is referred to as AZ13597550 in the study report.

- No noteworthy findings; GD, gestation day. NE, not evaluated

Statistical analysis was not conducted. Assessments of intergroup effects were made by inspection of the individual and group mean data.

[a] Only dams and pups in 20 mg/kg/group were subjected to toxicokinetic blood sampling.

[b] Female 74 (20 mg/kg/day) was killed Day 4 of lactation due to adverse clinical observations such as fast and irregular respiration, subdued behaviour, body weight loss and reduced food consumption. Necropsy: pale discolouration of the spleen, liver and lung, a small thymus, enlargement of all the intestines by thickening of the intestinal wall, with abnormal dark contents in the caecum, colon and rectum. Microscopically: epithelial atrophy in the cornea in the eye and in the tongue (eye and tongue were the only tissues examined microscopically).

[c] For controls, group means are shown, for AZD9291-treated groups, percent differences from controls are shown.

[d] First half of the litter were bled at approximately 2 hrs post dose of the dam and the remaining half of the litter bled at 24 hrs post dose of the dam.

[e] Eye and tongue were the only tissues subjected to histopathological examination.

2.6.7.14　　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

該当なし

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当なし

2.6.7.16　局所刺激性試験

該当なし

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17 Mechanistic Studies

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number (Sponsor reference number)
Electron microscopy on lungs from AZD9291 3 month rat study[a]	Oral (gavage)	3 months	0 (control), 40/20 mg/kg/day males, 20 mg/kg/day females	Control: 2M + 2F 40/20 mg/kg/ day: 3M 20 mg/kg/day: 5F	There was a compound-related increase in the number of alveolar macrophages. Macrophages had increased amounts of cytoplasm, characterised by numerous secondary lysosomes engaged in various stages of digestion, but since increased lysosomal activity was also evident in a control animal this was considered to represent a compound-related increase in normal lysosomal activity. Morphologically, lysosomal contents consisted of membrane remnant material (definitive whorls, dense stacks or rims that were considered to be consistent with early phospholipidosis in AZD9291-treated females) or clusters of electron lucent circular structures within an electron dense matrix that showed variable forms both within and between lysosomes. These features were present in both control and AZD9291-treated animals, but were more prominent in compound-treated animals.	[redacted], USA.	EM-14.148 (3358KV)

Study EM-14.148 is not GLP-compliant.

M, males; F, females

[a] Lung tissues used for this study were from the AZD9291 3 month rat study (study number 526248)

2.6.7.17 Metabolites

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Han Wistar	Oral, gavage (1% Pluronic F127)	MTD: up to 14 days Main: 28 days Recovery: 28 days + 1 month	MTD: 10, 20, 50, 100 Main: 0, 5, 10, 15 Recovery: 15	MTD: 3F Main: 8F Recovery: 4F	MTD: 50 and 100 mg/kg were not tolerated (animals killed on Day 6 and 4, respectively) due to weight loss, reduced food consumption and adverse clinical signs (including piloerection, altered faeces consistency and uro-/ano-genital staining). 10 and 20 mg/kg/day were tolerated for 14 days with small reductions in food consumption at both doses, and clinical signs (including skin lesions and uro-/ano-genital staining) and slight body weight loss at 20 mg/kg/day. Changes in haematology (mainly decreases in red cell parameters and increases in white blood cells, neutrophils, monocytes, reticulocytes and platelets) and plasma chemistry at all doses (mainly increases in creatinine and decreases in triglycerides, albumin and sodium). Main: Two animals dosed at 15 mg/kg/day killed prematurely (Days 8 and 16) due to weight loss and adverse clinical signs including altered faeces, piloerection and uro-/ano-genital staining. Remaining animals at 15 mg/kg/day showed clinical signs (including skin lesions, muzzle staining, piloerection and hair loss), and reductions in body weight gain and food consumption. 5 and 10 mg/kg/day were tolerated with clinical signs (10 mg/kg/day). Slight increase in the incidence of a horizontal band of granular appearance of the cornea at all doses, but of uncertain relationship to AZ13575104. Effects on haematology at all doses (mainly decreases in	AstraZeneca, UK	3500KR

2.6.7.17 Metabolites

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
					red cell parameters and increases in white blood cells, neutrophils, monocytes, lymphocytes, reticulocytes and platelets) and plasma chemistry at ≥10 mg/kg/day (mainly increases in globulin and creatinine and decreases in albumin). Increases in AST, GLDH and/or bile acids in individual animals at all doses, but of uncertain relationship to AZ13575104. The main histopathological findings were seen in the eye (corneal epithelial atrophy), skin (inflammatory cell infiltration and/or follicular/epithelial cell degeneration/ erosion/ ulceration) and mesenteric lymph nodes (increased sinus erythrocytes) at 15 mg/kg/day. One animal dosed at 15 mg/kg also showed minimal inflammatory cell infiltration in the adrenal glands. Two females killed prematurely showed additional findings seen in the liver (reduced glycogen), adrenal gland (cortical degeneration/necrosis), forestomach (inflammation and oedema), intestine (villous blunting and/or inflammatory cell infiltration) and pancreas (single cell necrosis). The findings in the eye and skin were also present at 5 and 10 mg/kg/day. Recovery: All findings were reversible, but residual inflammatory cell infiltration was seen in the skin and adrenal glands, and the rats developed abnormal stunted whiskers during the recovery period.		

Study 3500KR is not GLP-compliant

2.6.7.17 Impurities: *In Vitro*

Report Title: 不純物B＊：Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test *in Salmonella typhimurium* TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101)

Test Article: 不純物B＊

Test for Induction of: Reverse Mutations in bacterial cells

No. of Independent Assays: 1

Study No.: 8303534

Strains: *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (pKM101)

No. of Replicates: 5 (vehicle), 3 (test article and positive control)

GLP Compliance: Yes
Test Facility: [redacted], England

Metabolizing System: Aroclor-1254 induced rat liver S-9

No. Cells/Analysed/Culture: Not applicable

Vehicles: **For Test Article:** Dimethyl Sulphoxide (DMSO)

For Positive Controls: DMSO (2NF, AAC, AAN, B[a]P, NQO), Water (NaN_3)

Treatment: Plate incorporation for ~72 hours in the absence and presence of metabolic activation.

Date of Treatment: [redacted] 20[redacted] – [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity was observed at 16 µg/plate [0.08596 µmol/plate], 500 µg/plate [2.686 µmol/plate] and/or 1600 µg/plate [8.596 µmol/plate] and/or 5000 µg/plate [26.86 µmol/plate] in strains TA98, TA100, TA1535 and TA1537 in the absence and presence of S-9. No evidence of toxicity was observed in strain WP2 uvrA (pKM101).

Genotoxic Effects: 不純物B＊ showed increases in the number of revertants that were considered as evidence of mutagenic activity in strains TA98, TA100, TA1535 and TA1537. This study was considered therefore to have provided clear evidence of 不純物B＊ mutagenic activity in this assay system in these strains. In the same test system 不純物B＊ was not mutagenic in one strain of Escherichia coli (WP2 uvrA pKM101) in the absence or presence of S-9.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物B＊**: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物B＊

			Experiment 1				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
	DMSO		24±7	122±12	19±3	6±2	201±8
Without	不純物B＊	5 [0.02686]	24±5	122±11	31±2	6±2	227±26
Activation		16 [0.08596]	37±19	U	31±5	8±2	204±40
		50 [0.2686]	41±5	145±14	61±4	12±3	236±14
		160 [0.8596]	79±33	U	92±9	13±4	233±22
		500 [2.686]	342±71	247±17	157±21	31±5 S	164±77
		1600 [8.596]	416±76 S	U	282±46 S	62±28 S	194±10
		5000 [26.86]	330±94 S	120±25 S	69±6 S	53±4 S	155±14
	2-Nitrofluorene (2NF)	5	1212±458	NT	NT	NT	NT
	Sodium azide (NaN_3)	2	NT	793±69	678±28	NT	NT
	9-Aminoacridine (AAC)	50	NT	NT	NT	458±270	NT
	4-nitroquinoline 1-oxide (NQO)	2.0	NT	NT	NT	NT	1359±119

＊新薬承認情報提供時に置換えた

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

NT:　Not tested

U:　No data obtained

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title:** 不純物B＊**: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物B＊

			Experiment 1				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
	DMSO	0	32±3	140±18	20±4	16±2	217±15
With	不純物B＊	5 [0.02686]	37±21	409±20	29±2	16±2	280±7
Activation		16 [0.08596]	70±22	538±66	31±4	21±3 [V]	253±31
		50 [0.2686]	134±15	618±61	60±8	25±4	279±6
		160 [0.8596]	138±25	591±142	102±12	70±5	276±15
		500 [2.686]	239±124	695±39	154±28	69±6	257±20
		1600 [8.596]	321±49 [S]	536±201 [S]	271±60 [S]	54±9 [S]	235±26
		5000 [26.86]	179±45 [S]	167±67 [S]	51±11 [S]	31±4 [V]	182±15
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	10	281±20	NT	NT	NT	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	5	NT	1514±343	293±14	185±16	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	10	NT	NT	NT	NT	847±88

＊新薬承認情報提供時に置換えた

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

V:　Very thin background bacterial lawn

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title:** 不純物B＊**: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物B＊

			Experiment 2
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**
			TA100
	DMSO		127±25
Without	不純物B＊	5 [0.02686]	129±20 [MB]
Activation		16 [0.08596]	160±10
		50 [0.2686]	164±20
		160 [0.8596]	203±15
		500 [2.686]	251±18
		1600 [8.596]	416±7 [S]
		5000 [26.86]	[TI]
	Sodium azide (NaN_3)	2	547±61

＊新薬承認情報提供時に置換えた

B:　Bubbles or Split in agar

I:　Intensely coloured agar

M:　Plate counted manually

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物A＊

Test for Induction of: Reverse Mutations in bacterial cells

Strains: Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)

No. of Independent Assays: 3

No. of Replicates: 5 (vehicle), 3 (test article and positive control)

Study No.: 8303535

GLP Compliance: Yes

Test Facility: [redacted], England

Metabolizing System: Aroclor-1254 induced rat liver S-9

No. Cells/Analysed/Culture: Not applicable

Vehicles: For Test Article: Dimethyl Sulphoxide (DMSO)

For Positive Controls: DMSO (2NF, AAC, AAN, B[a]P, NQO), Water (NaN3)

Treatment: Plate incorporation for ~72 hours in the absence and presence of metabolic activation

Date of Treatment: [redacted] – [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity was observed at 160, 500 or 1600 µg/plate [0.3591, 1.122 or 3.591 µmol/plate] and above in all strains in the absence and presence of S-9.

Genotoxic Effects: 不純物A＊ **showed increases in the number of revertants that were considered evidence of mutagenic activity in one strain of Salmonella typhimurium (TA1537) in the absence and presence of S9. This study was considered therefore to have provided clear evidence of** 不純物A＊ **mutagenic activity in this assay system in this strain. In the same test system,** 不純物A＊ **was not mutagenic in three strains of Salmonella typhimurium (TA98, TA100 and TA1535) or in one strain of Escherichia coli (WP2 uvrA pKM101) in the absence or presence of S-9 under the conditions of this study.**

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title:** 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物A＊

Experiment 1

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate) [μmol/plate]	Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA* pKM101
Without Activation	DMSO	0	23±8	112±12	19±6	8±4	197±8
	不純物A＊	5 [0.01122]	25±11	125±31	19±5	13±5	190±13 M B
		16 [0.03591]	20±5	114±5	24±9	18±4	U
		50 [0.1122]	20±1	119±1	25±10	72±12	195±5
		160 [0.3591]	26±11 S	115±3 S	12±5 S	193±29 S	U
		500 [1.122]	21±2 S	59±10 V	10±1 V	79±66 V	209±19
		1600 [3.591]	14±1 V	T	T	T	T
		5000 [11.22]	T	T	T	T	T
	2-Nitrofluorene (2NF)	5	938±149	NT	NT	NT	NT
	Sodium azide (NaN_3)	2	NT	768±105	679±21	NT	NT
	9-Aminoacridine (AAC)	50	NT	NT	NT	397±45	NT
	4-nitroquinoline 1-oxide (NQO)	2	NT	NT	NT	NT	1169±40

＊新薬承認情報提供時に置換えた

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

V:　Very thin background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

B:　Bubbles or Split in agar

M:　Plate counted manually

U:　No data obtained

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities: In Vitro　**Report Title:** 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**　**Test Article:** 不純物A＊

			Experiment 1				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr A* pKM101**
	DMSO	0	39±12	135±10	20±7	20±1	212±21
With	不純物A＊	5 [0.01122]	39±4	102±9	16±3	21±3	229±16
Activation		16 [0.03591]	47±9	108±17 M B	21±10	22±7	186±60
		50 [0.1122]	39±8	118±6	21±5	49±9	207±16
		160 [0.3591]	41±3	121±20	23±7 S	193±64	173±67
		500 [1.122]	32±9 S	28±7 V	16±4 V	75±6 V	190±9
		1600 [3.591]	T	T	T	T	32±2 V
		5000 [11.22]	T	T	T	T	T
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	10	322±27	NT	NT	NT	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	5	NT	1607±65	298±4	140±12	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	10	NT	NT	NT	NT	817±40

＊新薬承認情報提供時に置換えた

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

V:　Very thin background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

B:　Bubbles or Split in agar

M:　Plate counted manually

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title:** 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物A＊

			Experiment 2
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**
			WP2 *uvrA* pKM101
	DMSO	0	232±17
Without	不純物A＊	5 [0.01122]	211±23
Activation		16 [0.03591]	211±19
		50 [0.1122]	209±21
		160 [0.3591]	139±115
		500 [1.122]	199±50 U
		1600 [3.591]	T
		5000 [11.22]	T
	4-nitroquinoline 1-oxide (NQO)	2	892±75

T: Toxic, no revertant colonies

U: No data obtained

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物A＊

			Experiment 3
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**
			TA1537
	DMSO	0	5±2
Without	不純物A＊	5 [0.01122]	10±5 M B
Activation		16 [0.03591]	10±4
		50 [0.1122]	16±6 M B
		160 [0.3591]	39±10
		500 [1.122]	22±8 S
		1600 [3.591]	T
		5000 [11.22]	T
	AAC	50	246±37

B: Bubbles or Split in agar

M: Plate counted manually

S: Slight thinning of the background bacterial lawn

T: Toxic, no revertant colonies

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物A＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物A＊

			Experiment 3
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**
			TA1537
	DMSO	0	15±3
With	不純物A＊	5 [0.01122]	24±11
Activation		16 [0.03591]	14±2
		50 [0.1122]	19±3
		160 [0.3591]	33±8
		500 [1.122]	28±5 S
		1600 [3.591]	6±2 V M
		5000 [11.22]	T
	AAN	5	120±23

M: Plate counted manually

S: Slight thinning of the background bacterial lawn

T: Toxic, no revertant colonies

V: Very thin background bacterial lawn

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物D＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物D＊

Test for Induction of: Reverse Mutations in bacterial cells

Strains: Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)

No. of Independent Assays: 1

No. of Replicates: 5 (vehicle), 5 (untreated), 3 (test article and positive control)

Study No.: 8303536

GLP Compliance: Yes

Test Facility: [redacted], England

Metabolizing System: Aroclor-1254 induced rat liver S-9

No. Cells/Analysed/Culture: Not applicable

Vehicles: For Test Article: Acetonitrile:Water:Acetic acid (67:23:10, v/v/v)

For Positive Controls: DMSO (2NF, AAC, AAN, B[a]P, NQO), Water (NaN3)

Treatment: Plate incorporation for ~72 hours in the absence and presence of metabolic activation.

Date of Treatment: [redacted]

Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity ranging from a diminution of the background bacterial lawn, with or without a concurrent reduction in revertant numbers, to a complete killing of the test bacteria was observed at 125 µg/plate [0.2332 µmol/plate] and /or 400 µg/plate [0.7462 µmol/plate] and above in all strains in the absence and presence of S-9.

Genotoxic Effects: None. No evidence of mutagenic activity in all strains tested under the conditions of the assay

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title:** 不純物D＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物D＊

			Mutation Experiment				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
	Acetonitrile: purified water: acetic acid^	0	18±6	122±9	24±4	8±2	161±9
	Untreated*	0	22±6	232±19	170±16	9±4	214±16
Without	不純物D＊	1.25 [0.002332]	22±3	113±8	27±2	10±6 [U]	155±64
Activation		4 [0.007462]	19±2	121±5	27±8	8±3	188±18
		12.5 [0.02332]	16±4	114±17	25±1	6±3	124±32
		40 [0.07462]	22±1	113±9	33±7	8±3	296±63
		125 [0.2332]	20±9 [S]	48±12 [S]	27±8 [S]	7±2 [V]	181±9
		400 [0.7462]	[T]	[T]	[T]	[T]	28±3 [S]
		1250 [2.332]	[T]	[T]	[T]	[T]	[T]
	2-Nitrofluorene (2NF)	5	1322±22	NT	NT	NT	NT
	Sodium azide (NaN_3)	2	NT	830±34	714±37	NT	NT
	9-Aminoacridine (AAC)	50	NT	NT	NT	209±108	NT
	4-nitroquinoline 1-oxide (NQO)	2.0	NT	NT	NT	NT	1149±51

＊新薬承認情報提供時に置換えた

^　Acetonitrile, purified water and acetic acid (67:23:10 v/v/v)

*　Untreated bacterial cells

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

U:　No data obtained for one individual replicate

V:　Very thin background bacterial lawn

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities: In Vitro

Report Title: 不純物D＊ **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test Article: 不純物D＊

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate) [µmol/plate]	Mutation Experiment: Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uv rA* (pKM101)**
	Acetonitrile: purified water: acetic acid^	0	34±10	122±18	21±2	14±5	178±24
	Untreated*		29±4	121±10	31±11	19±4	276±18
With	不純物D＊	1.25 [0.002332]	36±8	107±15	23±3	23±2	203±23
Activation		4 [0.007462]	30±4	89±14	21±7	18±5	186±32
		12.5 [0.02332]	33±7	109±13	26±10	21±8	201±13
		40 [0.07462]	36±8	96±8	28±3	21±2	162±26
		125 [0.2332]	42±8	102±22 S	36±9	15±6 S T	219±25
		400 [0.7462]	12±6 V	T	T	T	89±6 S
		1250 [2.332]	T	T	T	T	T
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	10	356±46	NT	NT	NT	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	5	NT	1598±78	312±21	186±17	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	10	NT	NT	NT	NT	792±21

＊新薬承認情報提供時に置換えた

^　Acetonitrile, purified water and acetic acid (67:23:10 v/v/v)

*　Untreated bacterial cells

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

U:　No data obtained

V:　Very thin background bacterial lawn

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities: In Vitro　**Report Title: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA pKM101**　**Test Article:** 不純物C＊

Test for Induction of: Reverse Mutations in bacterial cells
Strains: Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)
No. of Independent Assays: 1
No. of Replicates: 5 (vehicle), 3 (test article and positive control)
Study No.: 8306010
GLP Compliance: Yes
Test Facility: [redacted], England
Metabolizing System: Aroclor-1254 induced rat liver S-9
No. Cells/Analysed/Culture: Not applicable
Vehicles: For Test Article: Dimethylformamaide (DMF)
For Positive Controls: DMSO (2NF, AAC, AAN, B[a]P), Water (NaN3, MMC)
Treatment: Plate incorporation for ~72 hours in the absence and presence of metabolic activation.
Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity was observed at 160 or 500 µg/plate [0.3365 or 1.051 µmol/plate] and above in all strains.
Genotoxic Effects: None.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物C＊

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate) [μmol/plate]	Mutation Experiment: Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr A* pKM101**
	DMF	0	18±3	106±11	16±5	11±1	231±17
Without	不純物C＊	5 [0.01051]	23±1	97±12	14±7	7±5	220±5
Activation	不純物C＊	16 [0.03365]	8±4 [S]	86±8	16±2	12±1	193±28
	不純物C＊	50 [0.1051]	18±2	72±19	17±9	15±2	193±13
	不純物C＊	160 [0.3365]	11±3	14±5 [S]	8±3 [S]	7±4 [S]	192±7
	不純物C＊	500 [1.051]	8±6 [S]	7±3 [V]	1±1 [S]	[T]	170±12 [S]
	不純物C＊	1600 [3.365]	[T]	[T]	[T]	[T]	124±6 [S]
	不純物C＊	5000 [10.51]	[P T]	[P T]	[P T]	[P T]	[P T]
	2-Nitrofluorene (2NF)	5	709±147	NT	NT	NT	NT
	Sodium azide (NaN_3)	2	NT	541±19	544±24	NT	NT
	9-Aminoacridine (AAC)	50	NT	NT	NT	383±42	NT
	4-nitroquinoline 1-oxide (NQO)	2.0	NT	NT	NT	NT	1015±97

＊新薬承認情報提供時に置換えた

P:　Precipitation of the test article observed

S:　Slight thinning of background bacterial lawn

T:　Toxic, no revertant colonies

V:　Very thin background bacterial lawn

NT:　Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities: In Vitro **Report Title: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA100, TA1537 and TA98 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)** **Test Article:** 不純物C＊

			Mutation Experiment				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate) [µmol/plate]**	**Revertants/Plate (Mean±Standard Deviation)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* pKM101**
	DMF	0	31±9	116±11	17±8 [M B]	16±4	225±39
With	不純物C＊	5 [0.01051]	32±6	119±18	19±6	19±2 [M B]	271±15
Activation	不純物C＊	16 [0.03365]	26±9	86±26	17±6	16±6	231±21
	不純物C＊	50 [0.1051]	32±3	96±11	18±1	21±6	259±21
	不純物C＊	160 [0.3365]	27±7	31±7 [S]	14±4	15±3 [S]	249±5
	不純物C＊	500 [1.051]	18±4 [S]	6±1 [V]	4±3 [S]	[T]	217±19 [S]
	不純物C＊	1600 [3.365]	[T]	[T]	[T]	[T]	160±23 [S]
	不純物C＊	5000 [10.51]	[P T]	[P T]	[P T]	[T P]	24±3 [P V]
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	10	435±34	NT	NT	NT	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	5	NT	1493±50	326±31	207±6	NT
	2-Aminoanthracene (AAN)	20	NT	NT	NT	NT	558±52

＊新薬承認情報提供時に置換えた

B: Bubbles or splits in the agar

M: Plate counted manually

P: Precipitation of the test article observed

S: Slight thinning of background bacterial lawn

T: Toxic, no revertant colonies

V: Very thin background bacterial lawn

NT: Not tested

Means are generated from unrounded values exported directly from data capture software and so may vary from those presented to 1 dp in the study report.

2.6.7.17 Impurities

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number (Sponsor reference number)
Rat /Han Wistar	Oral (by gavage)	1 month	0 (control), 10 (AZD9291 Batch 1 or Batch 2[a])	Main test: 10M + 10F TK satellite: 3M + 3F	Administration of each batch of AZD9291 at a dose level of 10 mg/kg/day was well tolerated for 1 month. Compound-related histopathological findings were present in the male mammary gland (glandular atrophy), prostate gland (atrophy and decreased secretion with each batch; decreases in prostate gland weights for rats given Batch 2 only), seminal vesicles (atrophy and decreased secretion), uterus (atrophy and decreases in organ weights) and vagina (epithelial thinning) in rats administered each batch of AZD9291. The incidence and severity of the histopathological findings were comparable for each batch of AZD9291. The toxicology profile of the two batches of AZD9291 was considered to be comparable.	[redacted], U.K.	528622 (3898DR)

Study 528622 is a GLP compliant study. The vehicle used for this study was O.5% HPMC in Milli-Q water.

[a] Two batches of AZD9291 free base were tested in this study: Batch 1 was the new batch of AZD9291 free base (batch number [redacted]) produced using the commercial synthetic route and manufacturing process. This was compared with the batch of AZD9291 free base (Batch 2, batch number [redacted]) that was evaluated in the previous 1 month rat toxicology study (AstraZeneca Study Number 3416AR).

TK, toxicokinetics.

2.6.7.17 Phototoxicity

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (µg/mL)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Balb/c 3T3 mouse fibroblast cells	*In vitro* Evaluation of phototoxicity using the Neutral Red Uptake Assay	Not applicable	0.04763 to 150.5	Not applicable	Treatment with AZD9291 resulted in a comparable decrease in cell survival in the absence (IC_{50} of 10.3 µg/mL) and presence (IC_{50} of 8.3 µg/mL) of UV-A light. It was therefore concluded that AZD9291 was not phototoxic in this *in vitro* test system when tested up to the limit of solubility and stability in the primary vehicle (DMSO).	[redacted], UK	8273754

Study 8273754 is a GLP compliant study