プララトレキサート

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.6　毒性試験の概要文

ムンディファーマ株式会社

目次

1　まとめ 6
2　単回投与毒性試験 8
2.1　ラット単回投与毒性試験 8
2.2　イヌ単回投与毒性試験 9
3　反復投与毒性試験 9
3.1　ラット 9
3.1.1　ラット 8 週間投与用量設定試験 9
3.1.2　ラット 14 週間投与用量設定試験 10
3.1.3　ラット 6 ヵ月間投与毒性試験 10
3.2　イヌ 12
3.2.1　イヌ 8 週間投与用量設定試験 12
3.2.2　イヌ 14 週間投与用量設定試験 13
3.2.3　イヌ 9 ヵ月間投与毒性試験 13
4　遺伝毒性 15
4.1　*In vitro* 15
4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験 15
4.1.2　細菌を用いる復帰突然変異試験（再試験） 15
4.1.3　CHO 細胞を用いる染色体異常試験 16
4.2　*In vivo* 16
4.2.1　*In vivo* マウス小核試験 16
4.2.2　*In vivo* ラット小核試験（再試験、用量設定試験） 16
5　がん原性試験 17
6　生殖発生毒性試験 17
6.1　受胎能及び初期胚発生試験 17
6.2　胚・胎児発生に関する試験 17
6.2.1　ラット用量設定試験 17

6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験 18
6.2.3　ウサギ用量設定試験 18
6.2.4　ウサギ胚・胎児発生に関する試験 19
6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 19
7　局所刺激性試験 19
8　その他の毒性試験 20
8.1　不純物に関する試験 20
8.1.1　不純物A*　のイヌ用量設定試験 20
8.1.2　不純物A*　のイヌ 6 週間投与試験 21
8.2　光毒性 22
9　考察及び結論 22
10　図表 23
11　参考文献 23

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

表目次

表 2.6.6- 1　プララトレキサートの毒性試験プログラム 8

表 2.6.6- 2　ラット 6 ヵ月間投与毒性試験で認められた死亡又は切迫屠殺例の所見 11

略号一覧

略号	日本語	英語
AUC	濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve
AUC_{inf}	時間 0 から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to infinity
AUC_{last}	時間 0 から濃度定量可能最終時点までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to the last quantifiable time point
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素	dihydrofolate reductase
DLT	用量制限毒性	dose limiting toxicity
ECG	心電図	electrocardiogram
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
MCH	平均赤血球ヘモグロビン量	mean corpuscular hemoglobin
MCV	平均赤血球容積	mean corpuscular volume
MEC	モル吸光度係数	molar extinction coefficient
MPCE	小核を有する多染性赤血球	micronucleated polychromatic erythrocytes
[redacted]	-	[redacted]
MTD	最大耐量	maximum tolerable dose
MTX	メトトレキサート	methotrexate
NOAEL	無毒性量	no-observed adverse effect level
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate-buffered saline
%PCE	全赤血球数に対する多染性赤血球数の比	percentage of polychromatic erythrocytes
PK	薬物動態	pharmacokinetic(s)
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫	peripheral T-cell lymphoma
RDW	赤血球粒度分布幅	red cell distribution width
SD	-	Sprague-Dawley
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics

1　まとめ

プララトレキサート（*N*-{4-[(2*RS*)-1-(2,4-diaminopteridin-6-yl)pent-4-yn-2-yl]benzoyl}-L-glutamic acid）は、葉酸代謝経路のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）活性を阻害する抗悪性腫瘍性の葉酸アナログである。プララトレキサートは炭素 10 位の立体化学（*RS* 配置）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物である。各ジアステレオマーを PDX-10a（*S*-ジアステレオマー）及び PDX-10b（*R*-ジアステレオマー）とした。

プララトレキサート注射剤（20 mg/mL）は、再発・難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）治療を目的として開発された。プララトレキサートは 30 mg/m^2 を週 1 回、3～5 分かけて 6 週連続静脈内投与した後 1 週休薬し、7 週間を 1 サイクルとして投与される。投薬に関連した有害事象の発現により、20 mg/m^2/週まで減量できる。

ラット及びイヌの探索的毒性試験を含むプララトレキサートの早期の研究開発は[redacted]（[redacted]）により実施された。その後、Allos Therapeutics 社が、臨床開発プログラムを実施するために、臨床使用予定の製剤を使用し、臨床使用での投与経路及び投与スケジュールを考慮した包括的な毒性試験プログラムを医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して、イヌ単回投与用量設定試験、ラット及びイヌでのそれぞれ 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間までの反復投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、ラット及びウサギでの胚・胎児発生毒性試験、ラットでの皮内及び静脈周囲投与による刺激性試験を実施した。さらに、主な分解生成物である　不純物A*　を用いたイヌ反復投与毒性試験を実施した（表 2.6.6- 1）。

ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験では 25 mg/kg（150 mg/m^2）までの投与で可逆的な体重減少及び赤血球パラメーターの低値が観察された。イヌ 9 ヵ月間反復投与毒性試験では、0.7 mg/kg（14 mg/m^2）までの投与で、消化管ストレス及び嘔吐による可逆的な体重減少並びに赤血球及び白血球パラメーターの低値が観察された。病理組織学的検査においては、ラットでは肝臓及び脾臓の造血亢進及び骨髄細胞減少が観察され、イヌではまれに陰窩上皮の拡張及び壊死を伴う小腸の絨毛融合及び胸腺萎縮が観察されたが、休薬後にこれらの所見は認められないか、又は軽減したことから、いずれの所見も可逆的であった。初回及び反復投与後のトキシコキネティクス（TK）試験では、プララトレキサートの血中濃度は分布相の迅速な低下に続く終末相の緩徐な低下の二相性の消失パターンを示した。また、蓄積性は認められなかった。

プララトレキサートは、先に実施した細菌を用いる復帰突然変異試験及びチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験（いずれも非 GLP）において、それぞれ 5000 µg/プレート及び 1 µg/mL 濃度まで代謝活性化の有無にかかわらず遺伝毒性を示さなかった。また、GLP 下に再試験として実施した細菌を用いる復帰突然変異試験においても同様な結果が得られた。*In vivo* 小核試験では、先に実施した 3 mg/kg/日（9 mg/m^2/日）までのプララトレキサートを 3 日間連日腹腔内投与したマウス試験（非 GLP）では、小核を有する多染性赤血球（MPCE）の発現頻度上昇を認めなかった。しかし、再試験として GLP 下で実施したラット用量設定試験では、200 mg/kg/日までのプララトレキサートを 2 日間連日静脈内投与した結果、試験実施施設の背

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

景値と比較して MPCE の発現頻度上昇が認められた。本所見は、他の葉酸アナログであるメトトレキサート（MTX）及びペメトレキセドの *in vivo* 小核試験の結果に類似した［1、2］。

ラット胚・胎児発生毒性試験では、プララトレキサートは 0.03 mg/kg/day（0.18 mg/m^2/day）までの投与で母動物毒性及び胚・胎児発生に影響を認めなかった。0.06 mg/kg/day（0.36 mg/m^2/day）の投与では母動物毒性が観察され、形態学的異常は観察されなかったが着床後胚損失率の上昇などの胎児毒性を認めた。ウサギ胚・胎児発生毒性試験では、プララトレキサートは 0.1 mg/kg/day（1.2 mg/m^2/day）までの投与で母動物及び胚・胎児毒性は認められなかった。1.0 mg/kg/day（12 mg/m^2/day）の投与では母動物毒性が観察され、形態学的異常は観察されなかったが着床後胚損失率の上昇などの胎児毒性を認めた。

Sprague-Dawley（SD）ラットへのプララトレキサート 40 mg/kg（240 mg/m^2）の静脈周囲投与では、投与部位に刺激性は観察されなかった。また、プララトレキサート 20 mg/kg（120 mg/m^2）の皮内投与では、軽微から軽度の刺激性を認めたのみであった。

不純物A*　のイヌ 6 週間反復投与毒性試験では、無毒性量（NOAEL）は 10 mg/kg（200 mg/m^2）であり、プララトレキサートの臨床推奨用量（30 mg/m^2）と比較して十分に高かった。

プララトレキサートは、波長 290～700 nm での光吸収性を検討した結果、明らかなピークを認め、MTX と同様、光毒性の可能性が示唆されたが、その作用は軽度であると推察された。

結論として、広範囲のプララトレキサート毒性試験では、葉酸アナログに共通する所見（消化管毒性及び血液毒性、遺伝毒性、胎児毒性並びに光毒性）が認められたが、プララトレキサート注射剤の PTCL 治療を対象とした臨床使用を妨げるような有害作用は認められなかった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

表 2.6.6- 1　プララトレキサートの毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適否	被験物質
単回投与毒性	静脈内	イヌ（ビーグル）	否	PDX
反復投与毒性				
8 週間	静脈内	ラット（SD）	否	PDX
		イヌ（ビーグル）	否	PDX
14 週間	静脈内	ラット（SD）	否	PDX
		イヌ（ビーグル）	否	PDX
6 ヵ月間	静脈内	ラット（SD）	適	PDX
9 ヵ月間	静脈内	イヌ（ビーグル）	適	PDX
遺伝毒性				
細菌を用いた復帰突然変異試験	*In vitro*	*S. typhimurium* 菌及び *E.coli* 菌	否	PDX
細菌を用いた復帰突然変異試験（再試験）	*In vitro*	*S. typhimurium* 菌	適	PDX
In vitro 染色体異常試験	*In vitro*	CHO 細胞	否	PDX
In vivo 小核試験	腹腔内	マウス（CD-1）	否	PDX
In vivo 小核試験（再試験、用量設定試験）	静脈内	ラット（SD）	適	PDX
生殖発生毒性試験				
胚・胎児発生試験	静脈内	ラット（SD）	適	PDX
	静脈内	ウサギ	適	PDX
局所刺激性試験				
	静脈周囲	ラット（SD）	否	PDX
	皮内	ラット（SD）	否	PDX
その他の毒性試験				
不純物に関する試験				
反復投与毒性試験				
3 週間	静脈内	イヌ（ビーグル）	否	不純物A*
6 週間	静脈内	イヌ（ビーグル）	適	不純物A*

CHO 細胞：チャイニーズハムスター卵巣細胞、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、PDX：プララトレキサート、SD：Sprague-Dawley、　不純物A*

2　単回投与毒性試験

2.1　ラット単回投与毒性試験

ラット単回投与毒性試験は実施していない。ラット 8 週間反復投与毒性試験（本項 3.1.1 章）では、75 mg/kg（450 mg/m^2）までの静脈内投与で、初回投与後 1 週間以内（2 回目投与前まで）に死亡又は切迫屠殺した動物はなかった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.2　イヌ単回投与毒性試験

（試験番号 PDX-T-05008-D、添付資料 4.2.3.1.1）

ビーグル犬（雌雄各 1 匹／群）に、0［リン酸緩衝生理食塩水（PBS）］、3、6 及び 9 mg/kg（60、120 及び 180 mg/m^2）のプララトレキサートを静脈内投与し、単回投与後の毒性を検討した。試験には分解生成物である　不純物A*　含量が増加したときの影響を検討するために強制劣化させたプララトレキサート 20 mg/mL 製剤を使用した。試験製剤の総不純物含量は 5.25%（　不純物A*　は 4.0%）であった。

試験第 3 日までに、投与量にかかわらず投薬群の全例に血性下痢が観察された。血性嘔吐も全投薬群で認められた。試験第 4～6 日に投薬群の全例が切迫屠殺又は死亡した。本試験に使用した試験製剤は不純物及び　不純物A*　含量が高かったが、　不純物A*　の毒性は弱く（本項 8.1 章）、消化管毒性は葉酸アナログの主要な用量制限毒性（DLT）の 1 つであることから、観察された所見はプララトレキサートによると考えられた。本所見は続くイヌ反復投与毒性試験でも確認された（本項 3.2 章）。本試験の概略の致死量は 3 mg/kg（60 mg/m^2）以下であった。

3　反復投与毒性試験

3.1　ラット

3.1.1　ラット 8 週間投与用量設定試験

（試験番号 PDX-T-05013-R、添付資料 4.2.3.2.1）

SD ラット（雌雄各 5 匹／群）にプララトレキサートを 4 週間サイクル（週 1 回を 3 週間投与し、その後 1 週間休薬）で 2 サイクル静脈内投与した。4 週間サイクルは初期の臨床試験投与スケジュールに合わせた。プララトレキサートは 0（PBS）、25、50 及び 75 mg/kg（0、150、300 及び 450 mg/m^2）の用量で静脈内投与した。生存動物は試験第 57 日に計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査並びに血液生化学的検査を実施した。試験には分解生成物である　不純物A*　含量を増加させるために強制劣化させたプララトレキサート 20 mg/mL 製剤を使用した（　不純物A*　含量：4.0%）。

対照群の雄 1 匹及び 50 mg/kg 群の雄 1 匹がそれぞれ試験第 29 及び 43 日に死亡し、50 mg/kg 群の雄 1 匹が瀕死状態により試験第 39 日に切迫屠殺された。50 mg/kg 群の雌 3 匹及び 75 mg/kg 群の雌 4 匹が試験第 12～50 日に死亡し、25 mg/kg 群の雌 1 匹を試験第 18 日に瀕死状態により切迫屠殺した。残る雌雄は計画屠殺時まで生存した。投薬に関連した所見として、下痢、円背位、被毛粗剛及び削痩が 50 mg/kg 群の雄で認められ、雌では 25、50 及び 75 mg/kg 群で円背位及び活動性低下が、50 及び 75 mg/kg 群で削痩が、75 mg/kg 群で被毛粗剛及び糞の減少が観察された。

雌雄いずれも絶対体重に投薬の影響は認められなかった。しかし、雌雄共に用量依存的な体重増加抑制が観察され、影響は雌で顕著であった。雄の摂餌量に影響はみられなかったが、50 mg/kg 群以上の雌で摂餌量の低値が観察された。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

血液学的検査及び血液生化学的検査では、25 及び 50 mg/kg 群の雌並びに 50 mg/kg 群以上の雄で赤血球パラメーターの変動が観察されたのみであった。これらの変動は軽微であり、生物学的及び毒性学的に重要でないと判断した。75 mg/kg 群の生存動物の雌 1 匹で軽度の代謝性アシドーシスが観察された。本試験では NOAEL は算出できなかった。

3.1.2　ラット 14 週間投与用量設定試験

（試験番号 PDX-T-07039-R、添付資料 4.2.3.2.2）

SD ラット（雌雄各 5 匹／群）にプララトレキサートを 7 週間サイクル（週 1 回、6 週間投与し、その後 1 週間休薬）で 2 サイクル静脈内投与した。7 週間サイクルは再発又は難治性 PTCL を対象とした主要な臨床試験に使用されている投与スケジュールに合わせた。プララトレキサートは 0（PBS）、5、10 及び 25 mg/kg（0、30、60 及び 150 mg/m^2）の用量で、試験第 1、8、15、22、29 及び 36 日（第 1 サイクル）並びに試験第 50、57、64、71、78 及び 85 日（第 2 サイクル）に静脈内投与した。生存動物は試験第 99 日に計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検並びに臓器重量測定を実施した。

投与期間中、5 mg/kg 群の雄 1 匹が試験第 83 日に死亡したが、剖検所見に異常はみられず、高用量群に死亡はみられなかったことから投薬に関連しないと判断した。25 mg/kg 群の雄 3 匹に被毛粗剛が、雄 1 匹及び雌 3 匹に削痩が観察された。試験期間中、25 mg/kg 群雌で体重の低値傾向が認められたが、摂餌量への影響はなかった。血液生化学的検査及び剖検に投薬に関連した所見は認められなかった。25 mg/kg 群雄で有意な精巣の絶対重量及び対脳重量比の低値が観察された。同群雄では有意な脾臓の対体重比の高値も認められた。脾臓の絶対及び相対重量の個体別値では 25 mg/kg 群雄の 5 匹中 2 匹で上昇していた。雌では脾臓の絶対及び相対重量への影響は観察されなかった。軽微な貧血を示す赤血球パラメーターの用量依存的な変動が観察されたが、その変動の大部分は 1 週間の休薬期間中に回復したことから、作用は一過性で投与中止により回復することが示唆された。本試験の NOAEL は算出できなかった。

3.1.3　ラット 6 ヵ月間投与毒性試験

（試験番号 PDX-T-07034-R、添付資料 4.2.3.2.3）

SD ラット（雌雄各 20 匹／群）に、プララトレキサートを 0（PBS）、5、10 及び 25 mg/kg（0、30、60 及び 150 mg/m^2）の用量で、7 週間を 1 サイクル（週 1 回、6 週連続投与した後、1 週休薬）とし、2 又は 4 サイクル静脈内投与した。さらに、対照群及び高用量群は、雌雄各 5 匹／群を追加して第 4 サイクル終了後 2 週間の休薬期間を設定し、回復性を検討した。サテライト群のラット（投薬群：雌雄各 9 匹／群）にも同様に投与し、TK 評価を実施した。主試験群では 2 サイクル終了後、試験第 92 日に各群雌雄各 10 匹を中間屠殺し、4 サイクル終了後、試験第 190 日に残りの生存動物を計画屠殺した。回復群動物は第 4 サイクルの最終投与（試験第 183 日）4 週間後、試験第 211 日に剖検した。生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、血液学

的検査、血液生化学的検査、凝固系検査、臓器重量測定、剖検並びに病理組織学的検査（対照群及び高用量群）を実施した。

試験期間中、対照群（雌雄各 1 匹）、10 mg/kg 群（TK 群雌 1 匹）、25 mg/kg（主試験群雄 1 匹及び TK 群雄 2 匹）で死亡又は切迫屠殺を認めた。これらの死亡は対照群でも認められ、実験手技による損傷に関連した所見又は孤発性の所見であり、いずれも投薬に関連しないと判断した（表 2.6.6- 2）。

表 2.6.6- 2　ラット 6 ヵ月間投与毒性試験で認められた死亡又は切迫屠殺例の所見

群	性別	死亡又は切迫屠殺日	所見
対照群	雄	試験第 151 日	死亡前の一般状態及び剖検所見に異常なし。
対照群	雌	試験第 176 日	尾部の擦り傷の悪化が認められ、傷の処置により、その後の静脈内投与ができなくなったため試験から除外。
10 mg/kg（TK 群）	雌	試験第 85 日	中等度の右後肢麻痺及び（胸部又は上部腰部の脊髄損傷に関連すると考えられる）軽度の衰弱により切迫屠殺。これらの所見は採血時の技術的ミスと考えられる。
25 mg/kg（主試験群）	雄	試験第 30 日	給餌ミスによる過度の体重減少により切迫屠殺。
25 mg/kg（TK 群）	雄	試験第 183 日	軽度の顔面浮腫、右後肢の中等度浮腫及び退色、円背位、蒼白、削痩、眼瞼下垂、被毛粗剛。
25 mg/kg（TK 群）	雄	試験第 139 日	死亡前の一般状態観察に異常なし。

試験期間中、一般状態に異常はなく、血液生化学的検査及び眼科学的検査にも異常は認められなかった。25 mg/kg 群の雄で軽度の体重低値が観察され、この傾向は体重増加抑制及び摂餌量低下に関連した。

血液学的検査では、全投薬群の雌雄の中間評価及び最終評価時に赤血球パラメーターへの影響が認められた。用量依存的な赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値並びに用量依存的な平均赤血球容積（MCV）、網状赤血球数、赤血球粒度分布幅（RDW）及び平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）の高値が観察された。雄では赤血球の形態学的変化が観察された。全ての血液学的パラメーターの変動は休薬期間後に回復した。本所見は 25 mg/kg 群で最も顕著であり、雌より雄で明らかであった。また、25 mg/kg 群のいくつかのパラメーターでは中間評価時と比較して最終評価時でより大きな変動を認めたが、その他のパラメーター並びに 5 及び 10 mg/kg 群では中間評価時と最終評価時で顕著な違いは認められなかった。白血球数、好中球数、好酸球数及び単球数の低値は、プララトレキサートの直接作用というより、骨髄での赤血球増生の二次的所見で骨髄細胞産生の低下がみられたためと考えられた。凝固系検査では、最終評価時にプロトロンビン時間の延長が 10 及び 25 mg/kg 群で認められた。本所見はプララトレキサートにより肝臓からの凝固系タンパク質の遊離が低下したためと考えられた。回復群動物に凝固系パラメーターの異常はみられなかった。

臓器重量測定では、脾臓重量の高値が 10 mg/kg 群以上の雄及び 25 mg/kg 群雌で、また精巣重量の低値が 25 mg/kg 群雄で観察され投薬との関連が示唆された。回復群動物に脾臓重量の変動はみられなかったが、精巣重量は依然低値であった。

病理組織学的検査では、25 mg/kg 群の雌雄にプララトレキサート投与に関連した肝臓及び脾臓の造血亢進及び骨髄細胞減少が観察された。中間評価動物では、雄においてこれらの所見の頻度及び重症度がより高く、血液学的検査での赤血球パラメーターの変動と一致した。骨髄細胞減少は中間評価動物と比較して、最終評価動物で頻度が低かった。最終評価動物では、肝臓の造血亢進は雌雄に差を認めなかった。脾臓の造血亢進は対照群でも認められたが、雌雄共に対照群より投薬群で重症度が高かった。回復群動物ではこれらの所見の頻度及び重症度が低下したことから、これらの所見は可逆的であることが示された。

TK 評価では、各ジアステレオマーの血漿中濃度推移は分布相の迅速な低下に続く終末相の緩徐な低下の二相性の消失パターンを示した。両ジアステレオマーともに 5～25 mg/kg の投与量範囲では線形性が認められた。時間 0 から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{inf}）に性差はみられなかった（2.6.4.3.1.2.1 項及び 2.6.5.4A 項）。

以上の結果から、本試験での NOAEL は、5 mg/kg（30 mg/m^2）と判断された。5 mg/kg 投与時の AUC_{inf} は雌雄それぞれ 336901 ng/mL·min 及び 374826 ng/mL·min（試験第 183 日）であった。

3.2　イヌ

3.2.1　イヌ 8 週間投与用量設定試験

（試験番号 PDX-T-05015-D、添付資料 4.2.3.2.4）

ビーグル犬（雌雄各 1 匹／群）にプララトレキサートを 4 週間サイクル（週 1 回を 3 週間投与し、その後 1 週間休薬）で 2 サイクル静脈内投与した。試験には[redacted]の 1 ロット（ロット番号 010804、10 mg/mL）及び[redacted]社の 1 ロット（ロット番号 050I0304、20 mg/mL）の 2 種類の製剤を使用し両製剤の毒性を比較した。各群の動物には、プララトレキサートを 0（PBS）並びに[redacted]又は[redacted]社の各ロットについてそれぞれ 0.3、1 及び 3 mg/kg（6、20 及び 60 mg/m^2）の用量の 7 群に投与した。生存動物は試験第 57 日に計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

[redacted]ロットの 3 mg/kg 群雄 1 匹及び[redacted]社ロットの 3 mg/kg 群雌 1 匹を第 2 サイクルの 2 回目投与 5 日後（試験第 41 日）に活動性低下により切迫屠殺した。本所見は対照群及び低用量群に認められなかったことから、プララトレキサート投与に関連すると考えられた。残りの動物は計画屠殺時まで生存した。

いずれのロットでも全投薬群の雌雄で、嘔吐、糞の異常（軟便、粘性便及び下痢）並びに糞の変色といった複数の消化器症状が観察された。これらの消化器症状に関連して、1 mg/kg 群以上の雌雄で脱水が、3 mg/kg 群雌雄で削痩が観察された。全てのプララトレキサート投与動物で体重減

少又は体重増加の欠如が認められ、プララトレキサート投与後 2～3 日間の摂餌量低下に関連すると考えられた。

血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び病理組織学的検査に投薬に関連した影響は認められなかった。

本試験条件下では、いずれのロットでも 3 mg/kg 群で死亡が認められ、消化器症状が全投薬群で観察された。両ロットの毒性学的プロファイルに差はなかった。本試験では NOAEL は算出できなかった。

3.2.2　イヌ 14 週間投与用量設定試験

（試験番号 PDX-T-07035-D、添付資料 4.2.3.2.5）

ビーグル犬（雌雄各 2 匹／群）にプララトレキサートを 7 週間サイクル（週 1 回を 6 週間投与し、その後 1 週間休薬）で 2 サイクル静脈内投与した。プララトレキサートは、試験第 1、8、15、22、29 及び 36 日（第 1 サイクル）並びに試験第 50、57、64、71、78 及び 85 日（第 2 サイクル）に静脈内投与した。当初、0（PBS）、0.1、0.3 及び 1 mg/kg（0、2、6 及び 20 mg/m^2）の用量で投与を開始したが、高用量（1 mg/kg）群で試験第 24 日に雌 1 匹が、試験第 33 日に雌雄各 1 匹が死亡したため、第 2 サイクルから雌雄各 1 匹を追加し、これらの動物には用量を 0.7 mg/kg に下げて投与した。生存した雄 1 匹も試験第 22 日の投与から用量を 0.7 mg/kg に下げた。試験第 36 日には高用量群への投与を実施せず、試験第 64 日には高用量群の雌に投与しなかった。さらに高用量群の雌 1 匹には試験第 64～99 日にビタミン B_{12} 及び葉酸を補充した。生存動物は試験第 99 日に計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重測定、摂餌量測定（定性的）、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量測定及び剖検を実施した。

1 mg/kg 投与は、重度の毒性を引き起こし、早期死亡を認めた。0.7 mg/kg 投与は忍容されたが、一般状態観察、体重、臓器重量、血液学的検査、血液生化学的検査及び剖検で毒性症状を認めた。プララトレキサート投与に関連した嘔吐、軟便、下痢及び削痩が用量依存的に観察された。1 mg/kg 投与により投薬に関連した体重及び摂餌量の低値が試験第 8 日から観察された。臨床検査では投薬に関連した網状赤血球数の高値及び消化器への影響の二次的所見として電解質の低値が観察された。剖検では投薬に関連した胸腺の小型化が認められ、胸腺重量の低値が観察された。

下痢が散見された以外、0.3 mg/kg 群以下では毒性所見を認めなかったことから、NOAEL は 0.3 mg/kg（6 mg/m^2）と判断した。ビタミン B_{12} 及び葉酸の補充は高用量群の残る雌 1 匹に対して有益であった。

3.2.3　イヌ 9 ヵ月間投与毒性試験

（試験番号 PDX-T-07054-D、添付資料 4.2.3.2.6）

ビーグル犬（対照群及び高用量群：雌雄各 12 匹／群、低及び中用量群：雌雄各 10 匹／群）にプララトレキサートを 0（PBS）、0.1、0.3 及び 0.7 mg/kg（0、2、6 及び 14 mg/m^2）の用量で、7 週間を 1 サイクル（週 1 回、6 週連続投与した後、1 週休薬）とし、2 又は 6 サイクル静脈内投与

した。0.7 mg/kg 群に試験第 11 日に死亡が認められたため、試験第 15 日に雄 1 匹を追加した。また、0.7 mg/kg 群に、死亡及び切迫屠殺、体重減少並びに食欲低下が認められたために、試験第 4 週から 0.7 mg/kg 群の全動物にビタミン B_{12}（0.5 mg/匹/週）及び葉酸（5 mg/匹/日）を補充した。プララトレキサート及び他の葉酸アナログの臨床試験では、口内炎の発現頻度及び重症度を低減させるために、ビタミン B_{12} 及び葉酸がそれぞれ筋肉内及び経口投与されている。第 2 サイクル終了後、試験第 87 日に各群雌雄各 5 匹（0.7 mg/kg 群雌は早期死亡例により 3 匹）を中間屠殺し、第 6 サイクル終了後、試験第 283 日に各群雌雄各 5 匹（0.7 mg/kg 群雄は早期死亡例により 4 匹）を計画屠殺した。回復群動物は第 6 サイクルの最終投与 4 週間後、試験第 309 日に対照群の雌雄各 2 匹、0.7 mg/kg 群の雄 2 匹及び雌 1 匹を計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重測定、摂餌量測定（定性的）、TK 測定、眼科学的検査、心電図（ECG）検査、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査、臓器重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

生死及び一般状態では、0.7 mg/kg 群雌 1 匹が試験第 19 日に死亡し、同群の雄 1 匹を試験第 11 日、雌 1 匹を試験第 19 日に切迫屠殺した。これらの動物はビタミン B_{12} 及び葉酸を補充されていなかった。さらに、0.7 mg/kg 群雄 1 匹が試験第 88 日に切迫屠殺された。0.3mg/kg 群以上で消化器障害に関連した一般症状（軟便、下痢、嘔吐など）が認められた。

眼科学的検査及び ECG に異常はみられなかった。

体重及び摂餌量では、0.3 mg/kg 群以上で体重の低値及び体重増加抑制が認められ、摂餌量が低下した。また、0.7 mg/kg 群では削痩も認められた。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、リンパ数及び好塩基球数の低値が全投薬群で認められ、血小板数の軽度高値が 0.7 mg/kg 群雌雄で観察された。血液生化学的検査値の変動は、個体間のばらつき又は摂餌量低下の結果によるものであり、毒性学的に重要でないと考えられた。

臓器重量測定では、副腎、心臓、肝臓及び脾臓に統計学的に有意な臓器重量の変化が認められた。しかし、絶対重量及び相対重量の変化が一致せず、用量依存性もみられなかったことから、変動は生物学的に重要でないと判断した。

中間評価動物の剖検（試験第 87 日）では、投薬に関連する所見として限局的な消化管（小腸、大腸及び直腸）の変色及び腸間膜リンパ節の赤色化が雌雄で観察され、雌で投与部位の赤色化が観察された。これらの所見は全投薬群で観察された。最終評価動物の剖検（試験第 283 日）では、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸の暗色化又は赤色化が、投薬群とともに対照群にも観察された。

ビタミン B_{12} 及び葉酸補充開始前の死亡及び切迫屠殺動物の病理組織学的検査では、大腿骨及び胸骨骨髄での骨髄細胞減少、胸腺萎縮、顎下唾液腺の腺房萎縮及び消化管壊死が観察された。試験第 88 日に切迫屠殺された 0.7 mg/kg 群の雄 1 匹で観察された所見は消化管粘膜固有層のうっ血に限られた。中間評価動物では、0.3 mg/kg 群以上で剖検所見に一致した小腸の上皮及び陰窩部壊死が観察された。最終評価動物では、0.3 mg/kg 群以上で、剖検所見に一致して、まれに陰窩上皮の拡張及び壊死を伴う小腸の絨毛融合が観察され、0.7 mg/kg 群雌 5 匹中 3 匹で胸腺萎縮が観察された。回復群動物の剖検（試験第 309 日）及び病理組織学的検査に投薬に関連した所見は認められなかった。

TK 評価では、各ジアステレオマーの血漿中濃度推移は分布相の迅速な低下に続く終末相の緩徐な低下の二相性の消失パターンを示した。0.1～0.7 mg/kg の投与量範囲で、初回投与後、試験第 85 日及び試験第 281 日のいずれにおいても、両ジアステレオマーの薬物動態（PK）に線形性がみられた。両ジアステレオマーの PK パラメーターに性差は認められず、蓄積性もなかった（2.6.4.3.1.2.2 項及び 2.6.5.4B 項）。

以上のとおり、プララトレキサート投与初期に認められた重度の有害作用はビタミン B_{12} 及び葉酸の補充により低減した。第 6 サイクル投与後に観察された投薬に関連した所見は、4 週間の休薬期間後回復した。本試験条件下での NOAEL は 0.1 mg/kg（2 mg/m^2）、最大耐量（MTD）は 0.7 mg/kg（14 mg/m^2）と判断した。0.1 mg/kg 投与時の AUC_{inf} は雌雄それぞれ 14755 ng/mL·min 及び 20963 ng/mL·min（試験第 281 日）であった。

4　遺伝毒性

4.1　*In vitro*

4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

（試験番号 PDX-T-06021-I、添付資料 4.2.3.3.1.1）

Salmonella typhimurium 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び *Escherichia coli* 株 WP2 *uvrA* を用いて 100、500、1000、3000 及び 5000 µg/プレートのプララトレキサート濃度で、ラット肝ホモジネート分画（S9mix）存在下又は非存在下、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した（非 GLP）。プララトレキサートは、全ての細菌株で S9mix の存在下及び非存在下のいずれにおいても 5000 µg/プレートの濃度まで復帰変異コロニー数を有意に増加させなかった。陽性対照及び溶媒対照（PBS）の結果は本試験の基準に適合していた。以上のとおり、本試験条件下ではプララトレキサートは変異原性を示さなかった。

4.1.2　細菌を用いる復帰突然変異試験（再試験）

（試験番号 8360855、添付資料 4.2.3.3.1.3）

Salmonella typhimurium 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA102）を用いて 5、16、50、160、500、1600 及び 5000 µg/プレートのプララトレキサート濃度で、S9mix 存在下又は非存在下、再試験を GLP 下に実施した。プララトレキサートは、全ての細菌株でラット肝ホモジネート分画（S9mix）の存在下及び非存在下のいずれにおいても 5000 µg/プレートの濃度まで復帰変異コロニー数を有意に増加させなかった。陽性対照及び溶媒対照（PBS）の結果は本試験の基準に適合していた。以上のとおり、本試験条件下ではプララトレキサートは変異原性を示さなかった。

4.1.3　CHO 細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号 PDX-T-06022-H、添付資料 4.2.3.3.1.2）

CHO 細胞を用いて、S9mix 存在下又は非存在下、プララトレキサートの染色体異常誘発性を検討した。プララトレキサートは PBS で調製した。プララトレキサートの毒性を検討するために、用量設定試験を実施した（非 GLP）。探索試験は S9mix 存在下では 0.25、0.5、1.0 及び 2.5 µg/mL、S9mix 非存在下では 0.125、0.25、0.5 及び 1.0 µg/mL の濃度で実施した。各条件下において適切な陰性対照及び陽性対照を用いた。試験は duplicate で実施し、細胞をプララトレキサートと 3 時間培養し、処理開始 18 時間（約 1.5 正常細胞周期）後に染色体標本を作製した。細胞毒性の結果に基づき、S9mix 存在下及び非存在下のいずれについても 0.25、0.5、1.0 µg/mL の濃度について各標本の 100 個の分裂中期細胞の染色体異常を評価した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度でもプララトレキサートは溶媒（PBS）対照と比較して統計学的に有意な染色体異常を有する細胞数の上昇を認めなかった。確認試験では、細胞を濃度 0.00078、0.00156、0.00313、0.00625、0.0125 及び 0.025 µg/mL のプララトレキサートと duplicate で 18 時間培養し、処理開始 18 時間（約 1.5 正常細胞周期）後に染色体標本を作製した。細胞毒性の結果から 0.00313、0.00625 及び 0.0125 µg/mL の濃度について各標本の 100 個の分裂中期細胞の染色体異常を評価した。その結果、いずれの濃度でもプララトレキサートは溶媒（PBS）対照と比較して統計学的に有意な染色体異常を有する細胞数の上昇を認めなかった。いずれの試験でも陰性対照及び及び陽性対照の結果は本試験の基準に適合していた。以上のとおり、本試験条件下ではプララトレキサートは染色体異常誘発性を示さなかった。

4.2　*In vivo*

4.2.1　*In vivo* マウス小核試験

（試験番号 PDX-T-06023-M、添付資料 4.2.3.3.2.1）

雌雄 CD-1 マウス（雌雄各 5 匹／群）にプララトレキサートを 1 日 1 回 3 日間連日腹腔内投与し、小核試験を実施した（非 GLP）。用量設定試験の結果に基づき、投与量は 0.5、1.0、2.0 及び 3.0 mg/kg/日（1.5、3.0、6.0 及び 9.0 mg/m^2/日）とした。適切な陰性対照（PBS）及び陽性対照（80 mg/kg のシクロフォスファミドを単回経口投与）を用いた。投与 24 時間後に骨髄標本を作製し、全赤血球数に対する多染性赤血球数の比（%PCE）及び MPCE を評価した。プララトレキサートは、溶媒対照群と比較して MPCE に有意な上昇を認めなかった。陽性対照は適切な反応を示した。

以上のとおり、プララトレキサートは本試験条件下で小核試験の結果は陰性であった。

4.2.2　*In vivo* ラット小核試験（再試験、用量設定試験）

（試験番号 8362119、添付資料 4.2.3.3.2.2）

雌雄 SD ラット（雌雄各 3 匹／群）にプララトレキサートを 1 日 1 回 2 日間連日静脈内投与し、小核試験の用量設定試験を GLP 下に実施した。ラット 8 週間投与用量設定試験（本項 3.1.1 章）

において、プララトレキサートの週 1 回投与は、75 mg/kg まで忍容性良好であったことから、開始時投与量を 20 mg/kg/日とし、高用量 100 及び 200 mg/kg/日を追加した。20 mg/kg/日群の全例で投与 1 日目の投与後 0.5 時間に活動性低下が観察された以外、一般症状に異常はみられず、体重測定では、200 mg/kg/日群の雌に軽度の体重減少が観察されたのみであった。初回投与 48 時間後に骨髄標本を作製し、%PCE 及び MPCE を評価した。プララトレキサートは、200 mg/kg/日群において、試験実施施設の背景値と比較して%PCE の低値を示し、骨髄毒性が示唆された。また、全群において、試験実施施設の背景値と比較して、MPCE が高値を示した。

以上のとおり、200 mg/kg/日の 2 日間静脈内投与は MTD に近い用量であり、全群で MPCE の出現頻度上昇が示唆された。

5　がん原性試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、がん原性試験は実施しなかった。

6　生殖発生毒性試験

6.1　受胎能及び初期胚発生試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、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。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　ラット用量設定試験

（試験番号 PDX-T-07048-R、添付資料 4.2.3.5.2.1）

SD 妊娠ラット（8 匹／群）にプララトレキサートを妊娠 7～20 日まで連日静脈内投与し、用量設定試験を実施した。プララトレキサートは 0（PBS）、0.03、0.1、0.3 及び 2 mg/kg/日（0.18、0.6、1.8 及び 12 mg/m^2/日）の用量で投与した。サテライト群の動物（投薬群のみ；9 匹／群）にも TK 評価のために妊娠 7～13 日まで連日静脈内投与し、妊娠 13 日の血漿中濃度測定後妊娠 14 日に屠殺した。母動物は妊娠 22 日に剖検し、子宮内検査及び胎児の外観を評価した。2 mg/kg/日群の母動物 2 匹は鼻及び腟からの出血、円背位、活動性低下、蒼白及び眼瞼下垂が観察されたため、妊娠 20 日に切迫屠殺した。0.1 mg/kg/日群以上の母動物に体重増加抑制及び摂餌量低下がみられた。0.1 mg/kg/日群以上の胎児の生存に影響が認められた。以上の結果から、母動物の一般毒性及び生殖能に関する NOAEL は 0.03 mg/kg/日と判断した。胎児の外観及び胎児体重に投薬の影響は認められなかったが、0.1 mg/kg/日群以上の生存胎児は各群同腹児あたり 1 匹以下であり、胎児毒性に関する NOAEL は算出できなかった。0.03 mg/kg/日群の母動物の妊娠 13 日の C_{max} 及び時間 0 から

濃度定量可能最終時点までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）はそれぞれ 6.63 ng/mL 及び 4.42 ng·h/mL であった。

以上の結果より、ラット胚・胎児発生毒性試験のプララトレキサートの投与量には 0.01、0.03 及び 0.06 mg/kg/日を選択した。

6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験

（試験番号 PDX-T-07050-R、添付資料 4.2.3.5.2.2）

SD 妊娠ラット（25 匹／群）にプララトレキサートを 0（PBS）、0.01、0.03 及び 0.06 mg/kg/日（0.06、0.18 及び 0.36 mg/m^2/日）の用量で妊娠 7～20 日まで連日静脈内投与し、胚・胎児発生に関する試験を実施した。母動物は死亡及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。母動物は妊娠 22 日に剖検し、子宮内検査及び胎児検査（胎児の生存、外観、内臓、骨格評価）を実施した。

プララトレキサート投与による母動物死亡は認められず、一般状態観察及び剖検に影響はみられなかった。0.06 mg/kg/日群の母動物に有意な体重の低値、体重増加抑制及び摂餌量低下が観察された。また、同群で有意な胚・胎児死亡及び着床後胚損失率の高値並びに妊娠子宮重量の低値が観察され、有意な胎児体重（同腹児あたり、胎児あたり並びに雌雄別同腹児あたり）の低値が認められた。しかし、胎児の形態学的変化（外観、内臓及び骨格）は観察されなかった。0.01 及び 0.03 mg/kg/日群では影響は認められなかった。0.06 mg/kg/日群で母動物体重並びに胎児の生存及び体重に有害作用が認められたことから、母動物毒性並びに胚・胎児の死亡及び成長に対する NOAEL はいずれも 0.03 mg/kg/日（0.18 mg/m^2/日）と判断した。本試験で催奇形性は認められなかった。

6.2.3　ウサギ用量設定試験

（試験番号 PDX-T-07047-B、添付資料 4.2.3.5.2.3）

New Zealand White 妊娠ウサギ（8 匹／群）にプララトレキサートを妊娠 8～21 日まで連日静脈内投与し、用量設定試験を実施した。プララトレキサートは 0（PBS）、0.03、1、3 及び 10 mg/kg/日（0.36、12、36 及び 120 mg/m^2/日）の用量で投与した。母動物は死亡及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施し、妊娠 14～15 日に TK 評価のために血漿中濃度を測定した。母動物は妊娠 30 日に剖検し、子宮内検査及び胎児検査を実施した。1 mg/kg/日群以上の母動物に赤色／黄褐色の腟からの排出物が観察され、早期吸収胚数、総吸収胚数、着床後胚損失数、着床後胚損失率、妊娠子宮重量を除いた補正体重変化量の増加並びに妊娠子宮重量の低下が認められた。プララトレキサートは 1 mg/kg/日群以上の胎児の生存に有害な作用を認めた。したがって、母動物の一般毒性及び生殖能に関する NOAEL は 0.03 mg/kg/日（0.36 mg/m^2/日）と判断した。1 mg/kg/日群での生存胎児数の減少により、同腹児体重の有意な低値が観察された。0.03 及び 1 mg/kg/日群の胎児体重及び外観検査で投薬の影響は認められなかった。しかし、3 及び 10 mg/kg/日群では生存胎児を認めなかった。したがって、本試験の胎児の NOAEL は 0.03 mg/kg/日（0.36 mg/m^2/日）と判断

した。0.03 mg/kg/日群の母動物の妊娠 14 日の C_{max} 及び AUC_{last} はそれぞれ 471 ng/mL 及び 387 ng·h/mL であった。

以上の結果より、ウサギ胚・胎児発生毒性試験のプララトレキサートの投与量には 0.03、0.1 及び 1 mg/kg/日を選択した。

6.2.4　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

（試験番号 PDX-T-07051-B、添付資料 4.2.3.5.2.4）

New Zealand White 妊娠ウサギ（20 匹／群）に 0（PBS）、0.03、0.1 及び 1 mg/kg/日（0.36、1.2 及び 12 mg/m^2/日）のプララトレキサートを妊娠 8～21 日に連日静脈内投与し、胚・胎児に関する試験を実施した。母動物は死亡及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。母動物は妊娠 30 日に剖検し、子宮内検査及び胎児検査（胎児の生存、外観、内臓、骨格評価）を実施した。1 mg/kg/日群では妊娠後期（妊娠 18～25 日）に腟からの赤色排出物が観察された。また、同群の 3 匹は流産を認めたため、切迫屠殺した。母動物の剖検に異常所見は観察されず、体重に有意な差は認められなかった。1 mg/kg/日群では対照群と比較して、胎児死亡数及び着床後胚損失率の増加が認められ、妊娠子宮重量が低下し、妊娠子宮重量を除いた補正体重変化量が増加した。1 mg/kg/日群では同腹児あたりの生存胎児数及び生存胎児体重の有意な低下が認められた。0.03 及び 0.1 mg/kg/日群に投薬の影響は認められなかった。胎児の形態学的検査（外観、内臓及び骨格）に投薬の影響は認められなかった。母動物の一般毒性並びに胚・胎児の死亡及び成長に関する NOAEL は 0.1 mg/kg/日（1.2 mg/m^2/日）であった。

6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

プララトレキサートは重篤かつ生命を脅かすがんの患者の治療を目的としているため、出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験は実施しなかった。

7　局所刺激性試験

（試験番号 PDX-T-04003-R、添付資料 4.2.3.6.1）

SD ラット（雌雄各 5 匹／群）にプララトレキサートを伏在静脈周囲に 0（PBS）及び 40 mg/kg（240 mg/m^2）の用量で単回急速投与し、刺激性を検討した。投与容量は 2 mL/kg、観察期間は 8 日間とした。プララトレキサート 40 mg/kg の静脈周囲投与は、観察期間中、全身毒性を認めず、投与部位の局所刺激性も認められなかった。

また、SD ラット（雌雄各 5 匹／群）にプララトレキサートを皮内に 0（PBS）及び 20 mg/kg（120 mg/m^2）の用量で単回急速投与し、刺激性を検討した。投与容量は 1 mL/kg、観察期間は 8 日間とした。プララトレキサートの皮内投与は、観察期間中、全身毒性は認めなかったが、投与 4 日後の雌雄ラットで投与部位皮膚に軽微な浮腫及び軽微から軽度の紅斑を認めた。観察期間終了後（投与 8 日後）の病理組織学的検査で投薬に関連した所見は観察されなかった。以上のとお

り、本試験条件下でのプララトレキサートの単回皮内投与は SD ラットに軽微から軽度の刺激性を引き起こした。

静脈内投与による独立した刺激性試験は実施していないが、ラット及びイヌにおけるそれぞれ 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間までの反復投与毒性試験において、投与部位に異常所見は認められていない（本項 3.1.3 及び 3.2.3 章）。

8　その他の毒性試験

8.1　不純物に関する試験

プララトレキサートの主な分解生成物である　不純物A*　の毒性を検討するために、精製した　不純物A*　を用いたイヌでの反復投与毒性試験を実施した。

8.1.1　不純物A*　のイヌ用量設定試験

（試験番号 PDX-T-08063-D、添付資料 4.2.3.7.6.1）

ビーグル犬（雌雄各 2 匹／群）に　不純物A*　を 0（注射用生理食塩液）、0.1、1、3 及び 10 mg/kg（2、20、60 及び 200 mg/m^2）の用量で週 1 回 3 週間、緩徐に静脈内投与した。試験第 22 日に全例を計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重及び摂餌量測定、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査及び尿検査）、臓器重量測定並びに剖検を実施した。

3 及び 10 mg/kg 群の雌雄で投与後数分以内に餌あるいは白色又は黄色泡沫物の嘔吐が認められた。その後、全例で速やかにこれらの急性所見は消失し、体重及び摂餌量に影響が認められなかったことから、有害所見とはみなさなかった。10 mg/kg 投与まで死亡は認められず、体重、摂餌量、臨床検査値、臓器重量及び剖検所見に投薬の影響は観察されなかった。したがって、本試験の NOAEL は 10 mg/kg（200 mg/m^2）と判断した。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

8.1.2　不純物A*　のイヌ 6 週間投与試験

（試験番号 PDX-T-08064-D、添付資料 4.2.3.7.6.2）

ビーグル犬（対照群及び高用量群：雌雄各 6 匹／群、低及び中用量群：雌雄各 4 匹／群）に不純物A*を 0（注射用生理食塩液）、3、10 及び 30 mg/kg（0、60、200 及び 600 mg/m^2）の用量で、週 1 回 6 週間、緩徐に静脈内投与した。試験第 43 日に各群雌雄各 4 匹を計画屠殺した。回復群動物は対照群及び高用量群の各群雌雄各 2 匹を 2 週間の休薬期間後、試験第 57 日に計画屠殺した。生死及び一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、TK 測定、眼科学的検査、ECG 検査、血液学的検査、血液生化学的検査、凝固系検査、尿検査、臓器重量測定、剖検並びに病理組織学的検査を実施した。

試験期間中、死亡は観察されなかった。全投薬群で急性の一般症状が観察された。投与後数分以内に、流涎を伴うか又は伴わない嘔吐が雌雄動物で認められ、3 mg/kg 群では 1～10 分後、30 mg/kg 群では 4 時間後まで持続した。概して、本所見は雄より雌で頻度及び重症度が低かった。30 mg/kg 群雄 1 匹に、流涎及び嘔吐に加え、運動失調、毛細血管再充満時間の延長、歯肉の蒼白化及び呼吸困難が観察され、同群の他の動物と比較して重症であった。その後の投与では、当該動物の本所見の重症度は低下した。30 mg/kg 群の他の雄 1 匹に第 5 及び 6 回目投与後に嗜眠が観察され、反応性の欠失がみられたが、過度の流涎以外にその他の異常は認められなかった。

30 mg/kg 群雄で腎臓の対体重比の高値が認められ、雄 1 匹に腎臓の両側性肥大が観察された。腎臓重量の絶対値及び対脳重量比に有意な影響はみられなかった。本所見に関連して、病理組織学的検査では、30 mg/kg 群雄全例で腎皮質に軽微～軽度の多巣性皮質尿細管拡張及び慢性炎症が観察され、4 匹中 3 匹で腎皮質尿細管に軽微～軽度の多巣性鉱質沈着が認められた。これらの所見は投薬の影響と考えられた。これら腎臓の所見は 30 mg/kg 群の雌並びに低及び中用量群では認められず、血液生化学的検査値及び尿検査値に関連する変動はなかった。回復群動物では腎皮質の慢性炎症が 30 mg/kg 群の雄 1 匹（軽微）及び同群の雌 1 匹（軽度）で観察されたが、尿細管拡張及び鉱質沈着は観察されなかったことから、部分的な回復性が示唆された。遅発性の毒性は観察されなかった。

TK 評価では、雌雄ともに、不純物A*の PK にはほぼ用量比例性が認められ、反復投与による蓄積は認められなかった。

以上の結果から、30 mg/kg 群で運動失調、嗜眠及び反応性の欠失並びに腎臓への影響が観察されたことから、NOAEL は 10 mg/kg（200 mg/m^2）と判断した。10 mg/kg 投与時の AUC_{inf} は雌雄それぞれ 2367 μg·min/mL 及び 2986 μg·min/mL（試験第 1 日）であった。NOAEL である 10 mg/kg（200 mg/m^2）は、臨床での最大投与量（プララトレキサート 30 mg/m^2 投与時、不純物A*含量が最大[redacted]%であったとき、[redacted] mg/m^2）からみて十分に高用量である。したがって、不純物A*の規格値はプララトレキサートの臨床投与量からみて十分な安全性が保証されている。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

8.2　光毒性

プララトレキサートの波長 290～700 nm での光吸収性を検討した結果、372 nm（酢酸アンモニウム溶液条件下）及び 338 nm（塩酸溶液条件下）で明らかなピークを認め、モル吸光係数（MEC）はそれぞれ 8118 及び 11939 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ であった。医薬品の光安全性評価ガイドライン［薬食審査発 0521 第 1 号］に従うと MEC が 1000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ を超える化合物は非臨床光安全性試験の実施が推奨されている。

また、類似薬である MTX の添付文書には、その他の副作用として光線過敏症の発現が記載されている。

このことから、プララトレキサートについても、MTX と同様、光毒性を示す可能性が示唆される。しかしながら、以下に示す本剤の特性から判断し、その程度は軽度であると推測され、新たに本剤の非臨床光毒性試験実施の必要はないと判断し、実施していない。

1. プララトレキサート注射剤は 250 W/m^2 の光線での 21.8 時間曝露下において含量低下がみられ、光の影響を受けることが確認された（2.3.P.8.1 項）。
2. *In vitro* 代謝試験において安定で、代謝物は同定されなかった。
3. プララトレキサートは肝細胞、肝ミクロソーム、S9 画分及び遺伝子組換え肝酵素を用いた試験系で安定であり、また、これらの代謝試験において代謝物は確認されなかった（2.6.4.5.1 項）。
4. 組織内分布試験で皮膚への移行は投与 1 時間後に投与量の 0.52%以下及び眼への移行は 0.002%と少なく、その消失は早かった（2.6.4.4.1 項）。
5. ラット 6 ヵ月、及びイヌ 9 ヵ月間反復投与毒性試験において、皮膚及び眼に異常所見は認められなかった（本項 3.1.3 及び 3.2.3 章）。
6. プララトレキサートの臨床試験では、皮膚及び眼での光毒性に関連した重篤な有害事象は報告されていない。

9　考察及び結論

ラット及びイヌにおける反復投与毒性試験は、臨床使用予定の製剤を使用し、PTCL に対する臨床開発での投与経路及び投与スケジュールに準じて実施した。これらの試験で認められた DLT は他の葉酸アナログで報告されたのと同様に可逆性の消化管毒性及び血液毒性であった。同様の DLT がプララトレキサートの臨床プログラムでも認められている。プララトレキサートは *in vitro* 遺伝毒性試験で遺伝毒性を示さなかったが、*in vivo* ラット小核試験（用量設定試験）では、他の葉酸アナログと同様［1、2］、MPCE の発現頻度上昇が認められ、葉酸アナログに共通する遺伝毒性特性を有するものと考えられた。プララトレキサートはラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験において胎児毒性（胚・胎児死亡及び着床後胚損失率の高値）を認めたことから、プララトレキサートは妊婦に投与したとき、胎児に有害作用を引き起こす可能性がある。プララトレキサートに催奇形性はなかった。ラット及びイヌ反復投与毒性試験において、投与部位に異常所見は認められていない。分解生成物である　　不純物A*　　を用いたイヌ反復投与

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

毒性試験では、　　不純物A*　　の規格値はプララトレキサートの臨床投与量からみて十分な安全性が保証されていることが示された。プララトレキサートは、MTX と同様、光毒性の可能性が示唆されたが、その作用は軽度であると推察された。

以上のとおり、広範囲のプララトレキサート毒性試験では、葉酸アナログに共通する所見（消化管毒性及び血液毒性、遺伝毒性、胎児毒性並びに光毒性）が認められたが、プララトレキサート注射剤の PTCL 治療を対象とした臨床使用を妨げるような有害作用は認められなかった。

10　図表

図表は文中に挿入した。

11　参考文献

1. Pfizer. Methotrexate Solution for injection. Material Safety Data Sheet. PZ00135. 2012 (4.3.11)
2. Lilly. ALIMTA. Safety Data Sheet: 2010 (4.3.12)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

プララトレキサート

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.7　毒性試験概要表

ムンディファーマ株式会社

目次

2.6.7 毒性試験の概要表 4
2.6.7.1 毒性試験一覧表： 一覧表 4
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 7
2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧表 8
2.6.7.4 毒性試験： 使用したロット 9
2.6.7.5 単回投与毒性試験 10
2.6.7.6 反復投与毒性試験 重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7 反復投与毒性試験 13
2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験 13
2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験 19
2.6.7.8 遺伝毒性試験： *In Vitro* 24
2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 24
2.6.7.8.2 細菌を用いる復帰突然変異試験（再試験） 26
2.6.7.8.3 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験 28
2.6.7.9 遺伝毒性：*In Vivo* 30
2.6.7.9.1 マウス小核試験 30
2.6.7.9.2 ラット小核試験（再試験、用量設定試験） 31
2.6.7.10 がん原性試験： 重要な試験以外の試験 32
2.6.7.11 がん原性試験 32
2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 33
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験 35
2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 36
2.6.7.14.1 ラット胚・胎児発生に関する試験 36
2.6.7.14.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 38
2.6.7.15 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 40

2.6.7.16　新生児を用いた試験 40

2.6.7.17　局所刺激性試験 40

2.6.7.18　その他の毒性試験 41

2.6.7　毒性試験の概要表

2.6.7.1　毒性試験一覧表：　一覧表

Test Article: Pralatrexate

Type of Study Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity							
Dog / Beagle	IV	NA	0, 3, 6, 9	No	[redacted] USA	PDX-T-05008-D	4.2.3.1.1
Repeated-Dose Toxicity							
Rat / Sprague-Dawley	IV	8 weeks	0, 25, 50, 75	No	[redacted] USA	PDX-T-05013-R	4.2.3.2.1
Rat / Sprague-Dawley	IV	14 weeks	0, 5, 10, 25	No	[redacted] USA	PDX-T-07039-R	4.2.3.2.2
Rat / Sprague-Dawley	IV	6 months	0, 5, 10, 25	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07034-R	4.2.3.2.3
Dog / Beagle	IV	8 weeks	0, 0.3, 1, 3	No	[redacted] USA	PDX-T-05015-D	4.2.3.2.4
Dog / Beagle	IV	14 weeks	0, 0.1, 0.3, 1 (0.7)[d]	No	[redacted] USA	PDX-T-07035-D	4.2.3.2.5
Dog / Beagle	IV	9 months	0, 0.1, 0.3, 0.7	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07054-D	4.2.3.2.6
Genotoxicity							
Ames/bacteria	NA	NA	NA	No	[redacted] USA	PDX-T-06021-I	4.2.3.3.1.1
Chromosome Aberration/CHO cells	NA	NA	NA	No	[redacted] USA	PDX-T-06022-H	4.2.3.3.1.2
Ames/bacteria	NA	NA	NA	Yes	[redacted] England	8360855	4.2.3.3.1.3

2.6.7.1 毒性試験一覧表：　一覧表（続き）

Test Article: Pralatrexate

Type of Study Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study Number	Location
In Vivo Micronucleus assay/CD-1 mouse	IP	3 days	0, 0.5, 1, 2, 3	No	[redacted] USA	PDX-T-06023-M	4.2.3.3.2.1
In Vivo Micronucleus assay/ Sprague-Dawley rat (DRF)	IV	2 days	20, 100, 200	Yes	[redacted] England	8362119	4.2.3.3.2.2
Embryofetal Developmental Toxicity							
Rat / Sprague-Dawley	IV	2 weeks	0, 0.03, 0.1, 0.3, 2	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07048-R	4.2.3.5.2.1
Rat / Sprague-Dawley	IV	2 weeks	0, 0.01, 0.03, 0.06	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07050-R	4.2.3.5.2.2
Rabbit / New Zealand White	IV	2 weeks	0, 0.03, 1, 3, 10	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07047-B	4.2.3.5.2.3
Rabbit / New Zealand White	IV	2 weeks	0, 0.03, 0.1, 1	Yes	[redacted] USA	PDX-T-07051-B	4.2.3.5.2.4
Local Tolerance							
Rat / Sprague-Dawley	Perivascular and Intradermal	NA	0, 20 and 40	No	[redacted] USA	PDX-T-04003-R	4.2.3.6.1

2.6.7.1 毒性試験一覧表： 一覧表（続き）

Test Article: Pralatrexate

Type of Study Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	GLP[b]	Testing Facility	Study Number	Location
Other Toxicity: Impurities							
Dog / Beagle	IV	3 weeks	0, 0.1, 1, 3, <u>10</u>	No	[redacted] USA	PDX-T-08063-D	4.2.3.7.6.1
Dog / Beagle	IV	6 weeks	0, 3, <u>10</u>, 30	Yes	[redacted] USA	PDX-T-08064-D	4.2.3.7.6.2

[a] Unless otherwise specified. For Repeated-Dose Toxicity, the highest No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined.
[b] An entry of "Yes" indicates that the study was performed in compliance with GLP.
[c] [redacted]
[d] After one male and both females died, one male and one female were added to the high dose group in cycle 2, and the dose was reduced to 0.7 mg/kg for all animals in the high dose group. The female dosed at 0.7 mg/kg was given vitamin B_{12} and folic acid supplementation.

DRF = Dose range finding, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, NA = not applicable, CHO = Chinese hamster ovary, IP = intraperitoneal

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Pralatrexate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose (mg/kg)	GLP[a]	Study Number	Location
28-week repeated dose toxicity study	Sprague-Dawley rat	IV	0, 5, 10, 25	Yes	PDX-T-07034-R	4.2.3.2.3
9-month repeated dose toxicity study	Beagle dog	IV	0, 0.1, 0.3, 0.7	Yes	PDX-T-07054-D	4.2.3.2.6
Dose range-finding study for effects on embryofetal development	Sprague-Dawley rat	IV	0, 0.03, 0.1, 0.3, 2	Yes	PDX-T-07048-R	4.2.3.5.2.1
Dose range-finding study for effects on embryofetal development	New Zealand White rabbit	IV	0, 0.03, 1, 3, 10	Yes	PDX-T-07047-B	4.2.3.5.2.3

[a] An entry of "Yes" indicates that the study was performed in compliance with GLP.
GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: Pralatrexate

Species (Cycle/Dose)	SD rat (C1D1)	SD rat (C2D6)	Beagle dog (C1D1)	Beagle dog (C6D6)	Human (C1D1)	Human (C1D6 or C2D6)
Method of administration[a]	IV bolus	IV bolus	IV bolus	IV bolus	IV bolus	IV bolus
No. and Gender per Group	3M/3F	3M/3F	5M/5F	5M/5F	7M/3F	5M/1F
	Steady State AUC_{inf} (ng·min/mL) [dose in mg/kg]					
low dose	292,162 [5]	270,127 [5]	16,239 [0.1]	17,859 [0.1]	NA	NA
intermediate dose	445,392 [10]	505,920 [10]	43,357 [0.3]	44,240 [0.3]	NA	NA
high dose	1,243,801 [25]	1,339,082 [25]	93,812 [0.7]	80,369 [0.7]	267,854 [0.81][b]	211,555 [0.81][b]

[a] TK and PK data from studies in which dose administration was on a 7-week cycle with a cycle consisting of 6 weekly doses followed by 1 dose-free week. TK data from rat study (PDX-T-07034-R) and dog study (PDX-T-07054-D), and PK data from human Phase 2 clinical study (PDX-008, Section 2.7.2.X).

[b] Human dose of 30 mg/m^2 converted to mg/kg using the conversion factor (*km*) of 37 kg/m^2 as per FDA guidelines.

AUC_{inf} values highlighted in bold are for the maximum tolerated dose in each species dosed on a 7-week cycle.

AUC_{inf} = area under the concentration time curve from time 0 to infinity, SD = Sprague-Dawley, C = cycle, D = dose, IV = intravenous, M = male, F = female, NA = not applicable, TK = toxicokinetics, PK = pharmacokinetic

2.6.7.4 毒性試験： 使用したロット

Drug Product Batch No.	Purity (%)	Specified Degradation Product Impurity A* (%, w/w)	Study Number	Type of Study
Proposed Specification:	[redacted]	Release: [redacted] Shelf-life: [redacted]	NA	NA
340I1103	97.9	[redacted]	PDX-T-04003-R	Local tolerance study in rats
050I0304	100.1	[redacted]	PDX-T-05015-D	8-week IV dose range-finding toxicity study in dogs
010804	98.3	[redacted]	PDX-T-05015-D	8-week IV dose range-finding toxicity study in dogs
101I0504	93.8	[redacted]	PDX-T-05008-D	Single IV dose toxicity study in dogs
			PDX-T-05013-R	8-week IV dose range-finding toxicity study in rats
005I0105	98.5	[redacted]	PDX-T-06021-I	Ames test in bacteria (genotoxicity study)
			PDX-T-06022-H	Chromosomal aberration study in CHO cells (genotoxicity study)
			PDX-T-06023-M	In vivo micronucleus assay in mice (genotoxicity study)
061I0206	98.9	[redacted]	PDX-T-07039-R	14-week IV dose range-finding toxicity study in rats
			PDX-T-07035-D	14-week IV dose range-finding toxicity study in dogs
132I0606	100.0	[redacted]	PDX-T-07034-R	6-month IV pivotal toxicity study in rats
			PDX-T-07054-D	9-month IV pivotal toxicity study in dogs
			PDX-T-07048-R	IV dose range-finding embryofoetal development study in rats
			PDX-T-07050-R	IV pivotal embryofoetal development study in rats
			PDX-T-07047-B	IV dose range-finding embryofoetal development study in rabbits
			PDX-T-07051-B	IV pivotal embryofoetal development study in rabbits
1331500	99.7	[redacted]	8360855	Ames test in bacteria (genotoxicity study)
			8362119	In vivo micronucleus assay in rats (genotoxicity study)

No. = number, [redacted] NA = not applicable, NMT = not more than, IV = intravenous, CHO = Chinese hamster ovary

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Pralatrexate

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number (Location)
Dog / Beagle	IV bolus (PBS/Solution)	0, 3, 6, 9	1M/1F	NA	≤ 3 mg/kg	All dogs that received pralatrexate, regardless of dose, developed bloody diarrhea. Bloody vomiting was also observed at all dose levels. All pralatrexate-treated dogs became moribund and were euthanized or died between study day 4 and 6.	PDX-T-05008-D[a] (4.2.3.1.1)

[a] Due to forced degradation, the pralatrexate used in this study contained 5.25% impurities (4% Impurity A*). However, the toxicities observed were likely due to pralatrexate as gastrointestinal toxicity is a common dose-limiting toxicity observed with antifolates.

IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, M = male, F = female, NA = not applicable

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.6 反復投与毒性試験　　重要な試験以外の試験

Test Article: Pralatrexate

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	No. and Gender per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (Location)
Rat / Sprague-Dawley	IV bolus (PBS/Solution)	8 weeks[a]	0, 25, 50, 75	5M/5F	NA	Mortality: Males; 1/5 (control), 2/5 (50 mg/kg), and Females; 1/5 (25 mg/kg), 3/5 (50 mg/kg), and 4/5 (75 mg/kg). Pralatrexate-related effects in males included diarrhea, hunched posture, rough haircoat, and thin appearance at 50 mg/kg. In females, clinical signs of toxicity included thin appearance at 50 and 75 mg/kg, hunched posture and languidness at 25, 50, and 75 mg/kg, and rough haircoat and few feces at 75 mg/kg. Changes in erythrocyte parameters were observed at doses ≥ 25 mg/kg.	PDX-T-05013-R (4.2.3.2.1)
Rat / Sprague-Dawley	IV bolus (PBS/Solution)	14 weeks[b]	0, 5, 10, 25	5M/5F	NA	Rough hair coat in 3 males at 25 mg/kg and thin body appearance in 1 male and 3 females at 25 mg/kg were observed. No adverse effects were noted in mortality, food consumption, clinical chemistry parameters, or gross pathology. A trend toward lower absolute body weight was noted in the 25 mg/kg females but there was no corresponding effect on food consumption. A significant decrease in testes weight was noted in the 25 mg/kg males. A significant increase in spleen-to-body weight ratio was noted in two of the five 25 mg/kg males. Dose-related changes in erythroid parameters consistent with minimal anemia were observed, but most erythroid parameters returned to normal after the 1-week dose-free period, suggesting that the effect was transient and reversible with cessation of treatment.	PDX-T-07039-R (4.2.3.2.2)

2.6.7.6 反復投与毒性試験　　重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Pralatrexate

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)	No. and Gender per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study Number (Location)
Dog / Beagle	IV bolus (PBS/Solution)	8 weeks[a]	0, 0.3, 1, 3	2M/2F[c]	NA	Mortality: 1 male and 1 female in the 3 mg/kg group. Pralatrexate caused multiple GI effects, including emesis and abnormal feces at all doses and in both genders. In both genders these GI effects were associated with dehydration at doses ≥ 1 mg/kg and thin appearance at 3 mg/kg. Weight loss and/or lack of weight gain were apparent in all pralatrexate-treated animals. There were no effects on clinical pathology and pathology parameters.	PDX-T-05015-D (4.2.3.2.4)
Dog / Beagle	IV bolus (PBS/Solution)	14 weeks[b]	0, 0.1, 0.3, 1 (0.7)[d]	2M/2F	0.3 mg/kg (6 mg/m^2)	Mortality: 1 male and 2 females in the 1 mg/kg group. Weekly administration of pralatrexate at 1 mg/kg caused severe toxicity resulting in early terminations. Although tolerated by the animals, a nominal dose of 0.7 mg/kg also resulted in signs of toxicity. Pralatrexate-related and dose-proportional signs of toxicity at this dose included emesis, soft feces, diarrhea, and thin appearance. Pralatrexate-related decreases in body weight and food consumption were noted in doses of 1 mg/kg. Pralatrexate-related changes in clinical pathology parameters included an increase in absolute reticulocyte count and lowered electrolytes, which was secondary to various signs of gastrointestinal disturbance noted. Pralatrexate-related necropsy findings included reduction in thymic size and weight.	PDX-T-07035-D (4.2.3.2.5)

[a] Pralatrexate was dosed for two four-week cycles (a cycle consisted of 3 weekly doses followed by 1 dose-free week).
[b] Pralatrexate was dosed for two 7-week cycles (a cycle consisted of 6 weekly doses followed by 1 dose-free week).
[c] One animal per gender for each of two pralatrexate drug product lots (one lot prepared by [redacted], one lot prepared by [redacted]).
[d] After one male and both females died, one male and one female were added to the high dose group in cycle 2, and the dose was reduced to 0.7 mg/kg for all animals in the high dose group. The female dosed at 0.7 mg/kg was given vitamin B_{12} and folic acid supplementation.

No. = number, NOAEL = no-observed-adverse-effect level, IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, M = male, F = female, NA = not applicable, [redacted] GI = gastrointestinal

2.6.7.7 反復投与毒性試験

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Six-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Sprague-Dawley Rats with a Two-Week Recovery Interval

Study No.: PDX-T-07034-R

Species / Strain: Rat / Sprague-Dawley

Duration of Dosing: 4 seven-week cycles (cycle = 6 weekly doses followed by a dose-free week)

Location: 4.2.3.2.3

Initial Age: 6 - 8 weeks

Duration of Postdose: 4 weeks after the final dose in the last cycle

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 8/9 August, 2006

Method of Administration: IV bolus

Vehicle / Formulation: PBS / Solution

Special Features: Interim Necropsy was performed after 2 seven-week cycles

No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:	M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
Toxicokinetics: AUC_{inf} (ng·min/mL) [b]								
Cycle 1/Dose 1 (SD 1)	NA	NA	259,124	325,199	513,851	376,933	1,520,013	967,589
Cycle 2/Dose 6 (SD 85)	NA	NA	267,982	272,271	448,173	563,666	1,379,844	1,298,319
Cycle 4/Dose 6 (SD 183)	NA	NA	374,826	336,901	972,909	710,055	2,519,166	2,020,656

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07034-R

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:	M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
Noteworthy Findings[c]								
Died or sacrificed moribund	1	1	0	0	0	1[d]	3[d]	0
Body weight (g)								
Week 1	324.9	228.3	325.8	227.6	321.9	224.5	321.2	233.4
Week 7	525.2	299.0	526.7	299.1	505.4	280.3	496.9	302.7
Week 13	584.2	311.0	565.4	323.0	551.1	302.6	554.5	317.9
Week 20	650.6	358.0	660.6	353.0	609.4	333.0	579.6*	345.0
Week 27	676.8	367.3	702.4	367.8	643.5	361.9	630.5	373.7
Food consumption (g/day)								
Week 1	30.2	21.3	29.6	20.7	29.3	20.0	28.4*	21.5
Week 7	30.1	21.9	29.6	20.7	29.0	20.1	28.4	22.7
Week 13	31.3	19.8	26.5*	19.5	26.4*	19.7	26.0*	17.7
Week 20	29.1	20.5	26.5	19.9	26.5	20.4	27.2	19.3
Week 27	31.9	21.3	31.1	21.1	28.6*	22.9	29.8	21.9
Clinical observation	No treatment-related findings							

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07034-R

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:	M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
Hematology: [e]								
(SD 92)								
WBC (10^3/µL)	13.38	7.90	12.07	8.11	11.39	8.57	9.23	6.09
ABNEUT (10^3/µL)	2.41	1.08	2.52	1.08	1.88	1.68	1.36	0.55
(SD 190)								
WBC (10^3/µL)	12.78	6.57	12.33	6.04	10.00	6.17	6.77*	4.63
RBC (10^6/µL)	8.86	8.16	7.86*	7.01*	7.80*	7.28*	6.66*	6.41*
HGB (g/dL)	15.63	15.29	14.13*	13.82	13.94*	14.01	13.13*	13.03*
HCT (%)	46.75	44.83	42.89*	40.48*	42.21*	41.71	41.27*	39.19*
MCV (fL)	52.83	54.93	54.58	57.79*	54.23	57.39*	62.16*	61.30*
MCH (pg)	17.65	18.74	17.96	19.70*	17.90	19.28	19.77*	20.36*
PLT (10^3/µL)	1194	1081	1246	835	1142	757*	972	842
MPV (fL)	7.20	6.47	7.35	8.88	7.50	7.60	8.37*	7.81*
ABNEUT (10^3/µL)	3.54	1.23	2.32	1.37	1.93	1.13	0.69*	0.67*
ABLYMP (10^3/µL)	8.46	4.90	9.39	4.31	7.67	4.76	5.73*	3.74

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07034-R

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):		0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:		M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
ABMONO (10^3/μL)		0.45	0.29	0.36	0.24	0.21*	0.18	0.15*	0.13*
ABEOS (10^3/μL)		0.22	0.11	0.14	0.09	0.11	0.07	0.10	0.04*
ABSRET (10^9/L)		237.2	164.3	345.4	227.9	395.1*	257.0*	834.7*	544.5*
RDW (%)		14.96	11.68	19.17*	14.97*	20.00*	14.76*	21.87*	17.24*
Serum chemistry		No treatment-related findings							
Ophthalmology		No treatment-related findings							
Organ Weights (g)[f]:									
Spleen	Absolute (g)	0.9493	0.5602	1.1536	0.6491	1.2010*	0.7104	1.4831*	0.9355*
(%)	Organ-to-Body Weight ratio	0.147	0.161	0.171	0.187	0.196*	0.204	0.242*	0.261*
Testes	Absolute (g)	5.2911	NA	5.0419	NA	4.8632	NA	3.9664*	NA
(%)	Organ-to-Body Weight ratio	0.829	NA	0.754	NA	0.792	NA	0.662*	NA
Gross Pathology (at Terminal Necropsy):									
Number Evaluated		9	9	10	10	10	10	9	10
Spleen enlargement		0	0	0	0	2	0	3	0

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07034-R

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:	M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
Histopathology (at Interim Necropsy):								
Number Evaluated	10	10	NA	NA	NA	NA	10	10
Bone marrow (femur); mild to moderate hypocellularity	0/10	0/10	NA	NA	NA	NA	10/10	10/10
Liver; mild to moderate hematopoiesis	0/10	0/10	NA	NA	NA	NA	9/10	4/10
Spleen; mild hematopoiesis; multifocal	0/10	0/10	NA	NA	NA	NA	2/10	2/10
Spleen; moderate hematopoiesis; multifocal	0/10	0/10	NA	NA	NA	NA	8/10	3/10
Histopathology (at Terminal Necropsy):								
Number Evaluated	9	9	NA	NA	NA	NA	9	10
Bone marrow (femur); mild hypocellularity	0/9	0/9	NA	NA	NA	NA	6/9	3/10
Liver; mild to moderate hematopoiesis	0/9	0/9	NA	NA	NA	NA	9/9	8/10
Spleen; mild hematopoiesis	9/9	5/9	NA	NA	NA	NA	0/9	0/10
Spleen; moderate to marked hematopoiesis	0/9	4/9	NA	NA	NA	NA	9/9	10/10
Additional Examinations:								
Coagulation - Prothrombin Time at Terminal Necropsy (seconds)[g]	15.69	14.52	16.02	14.87	16.53*	15.29*	16.64*	15.90*

2.6.7.7.1 ラット 6 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07034-R

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		5		10		25	
Number of Animals [a]:	M: 25 (0)	F: 25 (0)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 20 (9)	F: 20 (9)	M: 25 (9)	F: 25 (9)
Postdose Evaluation (4 week recovery):								
Number Evaluated	5	5	NA	NA	NA	NA	4	5
All noteworthy findings	none	none	NA	NA	NA	NA	Except for decreased testes weight, all noteworthy findings were resolving at the recovery necropsy	

[a] Control and high dose groups consisted of 25 animals per gender; 10 for interim, 10 for terminal, and 5 for recovery necropsy.
Low and intermediate dose groups consisted of 20 animals per gender; 10 for interim and 10 for terminal necropsy.
Number of animals for toxicokinetics evaluation in satellite groups were designated in ( ).

[b] AUC_{inf} are the sum of the individual diastereomer exposures (PDX-10a + PDX-10b) and means from 3 animals per dose per gender.

[c] Only findings that are significantly different from the Control group are reported (ie, $p < 0.05$).

[d] One female in 10 mg/kg and 2 males in 25 mg/kg were in the satellite groups. Not related to pralatrexate.

[e] Quantitative results were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test for normality, the Levene Median test for equal variance, and the one-way analysis of variance (ANOVA). If the ANOVA indicated statistical significance among groups, then the Dunnett's test (parametric data) or the Dunn's test (non-parametric data) was used to delineate which groups differed from control. The probability value (p) < 0.05 (two-tailed) was used as the critical level of significance.

[f] Absolute organ weights and Organ-to-Body Weight ratio at terminal necropsy. Only organs with statistically significant ($p < 0.05$) changes in organ weight are listed.

[g] Prothrombin time increases are likely due to a decrease in release of coagulation proteins from the liver.

* Significantly different from Control group, $p < 0.05$

PDX = pralatrexate, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, M = male, F = female, AUC_{inf} = area under the concentration time curve from time 0 to infinity, NA = not applicable, HGB = hemoglobin, HCT = hematocrit, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, PLT = platelet count, MPV = mean platelet volume, ABNEUT = absolute neutrophil count, ABLYMP = absolute lymphocyte count, ABMONO = absolute monocyte count, ABEOS = absolute eosinophil count, ABSRET = absolute reticulocyte count, RDW = red blood cell distribution width, dL = deciliter, fL = femtoliter, pg = pictogram, p = probability value

2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Nine-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Beagle Dogs with a Four-Week Recovery Interval

Study No.: PDX-T-07054-D

Species / Strain: Beagle dog

Duration of Dosing: 6 seven-week cycles (cycle = 6 weekly doses followed by a drug-free week)

Location: 4.2.3.2.6

Initial Age: 4 - 5 months

Duration of Postdose: 4 weeks

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 5/6 September, 2006

Method of Administration: IV bolus

Vehicle / Formulation: PBS / Solution

Special Features: Interim Necropsy was performed after 2 seven-week cycles

No Observed Adverse Effect Level: 0.1 mg/kg, Maximum Tolerated Dose: 0.7 mg/kg

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.1		0.3		0.7[a]	
Number of Animals[b]:	M: 12	F: 12	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 13[c]	F: 12
Toxicokinetics: AUC_{inf} (ng·min/mL)								
Cycle 1/Dose 1 (SD 1)	NA	NA	18,317	14,160	38,663	48,050	103,692	83,932
Cycle 2/Dose 6 (SD 85)	NA	NA	13,183	11,996	41,516	35,381	93,305	39,879
Cycle 6/Dose 6 (SD 281)	NA	NA	20,963	14,755	58,408	30,072	88,709	72,029
Noteworthy Findings[d]								
Died or sacrificed moribund:	0	0	0	0	0	0	2[e]	2[e]
Body Weight (kg)								
SD 1	8.59	6.98	8.94	6.90	8.44	6.64	9.03	7.21
SD 85 (end of Cycle 2)	11.34	9.28	10.96	8.78	9.92	7.90	9.92	7.95
SD 183 (end of Cycle 4)	11.47	9.33	10.94	9.64	10.34	8.06	9.87	8.86
SD 282 (end of Cycle 6)	11.70	9.82	11.18	9.56	10.90	7.94	10.10	8.52

2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07054-D

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.1		0.3		0.7[a]	
Number of Animals[b]:	M: 12	F: 12	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 13[c]	F: 12
Body Weight (% change Day 1 to 281)[f]:	32.22	42.06	21.83	44.78	29.26	30.43	13.84	19.17
Food Consumption	-	-	-	-	decreased	decreased	decreased	decreased
Clinical Observations:	none	none	none	none	Gastrointestinal distress, ie., emesis and signs of diarrhea (soft and/or discolored feces, mucoid feces, few or no feces etc.) were observed. These signs were generally dose related. In addition, appetite loss and thin appearance (0.7 mg/kg only) were observed.			
Hematology (at Terminal Necropsy)[g]:								
WBC (10^3/μL)	10.99	9.52	9.63	10.58	9.01	9.29	7.37*	9.52
RBC (10^6/μL)	6.45	6.72	6.21	6.28	5.93	6.04	5.80*	5.93
HGB (g/dL)	15.43	15.71	14.54	15.20	14.12*	14.54	13.82*	14.29
HCT (%)	44.40	44.86	42.04	43.50	40.70*	41.74	39.83*	41.37
MCV (fL)	68.89	66.89	67.66	69.34	68.70	69.18	68.80	69.69
MCH (pg)	23.94	23.43	23.40	24.26	23.86	24.06	23.85	24.07
MCHC (g/dL)	34.76	35.06	34.58	35.00	34.74	34.80	34.67	34.54
PLT (10^3/μL)	315.67	338.57	308.80	348.00	327.60	377.00	394.00	426.67
MPV (fL)	10.37	9.16	11.40	9.72	10.70	9.30	10.03	9.63
ABNEUT (10^3/μL)	7.02	6.00	6.13	6.79	6.11	6.38	4.78*	7.33

2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07054-D

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.1		0.3		0.7[a]	
Number of Animals[b]:	M: 12	F: 12	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 13[c]	F: 12
ABLYMP (10^3/µL)	2.79	2.55	2.57	2.84	2.08	2.06	1.82	1.55*
ABMONO (10^3/µL)	0.56	0.52	0.54	0.49	0.48	0.53	0.42	0.39
ABEOS (10^3/µL)	0.54	0.36	0.38	0.44	0.30	0.28	0.34	0.21
ABBAS (10^3/µL)	0.05	0.06	0.01*	0.01*	0.01*	0.02*	0.01*	0.01*
ABSRET (10^9/L)	50.80	40.31	48.94	45.16	44.94	29.34	48.27	47.96
Serum Chemistry:	There were no biologically or toxicologically significant pralatrexate-related changes in clinical chemistry parameters							
Ophthalmology	No treatment-related findings							
Organ Weights (at Terminal Necropsy):								
Heart (absolute weight [g])	102.6	86.8	89.8*	77.4	87.9*	72.7	80.4*	72.9
Heart (relative to body weight [%])	0.882	0.895	0.840	0.841	0.833	0.885	0.830	0.892
Adrenal gland (absolute weight [g])	1.06	1.16	1.18	1.21	1.07	1.06	1.18	1.20
Adrenal gland (relative to body weight [%])	0.0091	0.0122	0.0111	0.0130	0.0101	0.0129	0.0124*	0.0147
Liver (absolute weight [g])	297	238	294	230	292	219	309	250
Liver (relative to body weight [%])	2.52	2.46	2.73	2.49	2.75	2.66	3.17	3.05*
Spleen (absolute weight [g])	30.5	24.4	28.1	27.2	27.0	28.4	26.2	24.3
Spleen (relative to body weight [%])	0.260	0.254	0.262	0.291	0.258	0.347*	0.270	0.295

2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07054-D

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.1		0.3		0.7[a]	
Number of Animals[b]:	M: 12	F: 12	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 13[c]	F: 12
Gross Pathology (at Terminal Necropsy):								
Number Evaluated	5	5	5	5	5	4	4	5
Observations	There were no pralatrexate-related macroscopic findings							
Histopathology (at Terminal Necropsy):								
Number Evaluated	5	5	5	5	5	4	4	5
Duodenum, diffuse villus fusion (minimal to moderate)	0	0	0	0	5	4	4	5
Ileum, diffuse villus fusion (minimal to moderate)	0	0	0	0	5	4	4	5
Jejunum, diffuse villus fusion (minimal to moderate)	0	0	0	0	5	4	4	5
Thymus, diffuse atrophy (minimal to moderate)	0	0	0	0	0	0	0	3
Additional Examinations:								
Electrocardiography[h]	There were no pralatrexate-related electrocardiographic changes							

2.6.7.7.2 イヌ 9 ヵ月間投与試験（続き） PDX-T-07054-D

Test Article: Pralatrexate

Weekly Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.1		0.3		0.7[a]	
Number of Animals[b]:	M: 12	F: 12	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 13[c]	F: 12
Postdose Evaluation:								
Number Evaluated	2	2	NA	NA	NA	NA	2	1
Observations	There were no significant pralatrexate-related findings in the recovery animals							

a Due to GI toxicity, starting study week 4, the high dose group received Vitamin B_{12} and folic acid supplementation.
b Five animals for interim necropsy, 5 animals for terminal necropsy, and 2 extra animals in the Control and High Dose group for the recovery necropsy.
c One male was added on study day 15 due to a death in this group.
d Only findings that are significantly different from the Control group are reported (ie, $p < 0.05$).
e Both males were euthanized in moribund condition, one on SD 11 and the other on SD 88. One female was found dead and the other was euthanized in moribund condition, both on SD 19.
f Although there were no significant ($p < 0.05$) changes in body weight gain over the study period, there appears to be a trend to lower body weight gain in the 0.7 mg/kg group.
g Quantitative results were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test for normality, the Levene Median test for equal variance, and the one-way analysis of variance (ANOVA). If the ANOVA indicated statistical significance among groups, then the Dunnett's test (parametric data) or the Dunn's test (non-parametric data) was used to delineate which groups differed from control. The probability value (p) < 0.05 (two-tailed) was used as the critical level of significance.
h A nine lead electrocardiogram and a 30-second six lead ECG rhythm strip were recorded pre-dose (Study Day -8), and at interim (Study Day 81-83), terminal (Study Day 282), and recovery (Study Day 309) time points.
* Significantly different from Control group, $p < 0.05$

PDX = pralatrexate, eCTD = electronic Common Technical Document, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, M = male, F = female, AUC_{inf} = area under the concentration time curve from time 0 to infinity, NA = not applicable, WBC = white blood cell count, RBC = red blood cell count, HGB = hemoglobin, HCT = hematocrit, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, PLT = platelet count, MPV = mean platelet volume, ABNEUT = absolute neutrophil count, ABLYMP = absolute lymphocyte count, ABMONO = absolute monocyte count, ABEOS = absolute eosinophil count, ABSRET = absolute reticulocyte count, RDW = red blood cell distribution width, dL = deciliter, GI = gastrointestinal, p = probability value

2.6.7.8 遺伝毒性試験： *In Vitro*

2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of PDX in the Salmonella typhimurium/Escherichia coli Plate Incorporation Mutation Assay in the Presence and Absence of Induced Rat Liver S9		Study No.: PDX-T-06021-I
Test for Induction of: Reverse mutation	No. of Independent Assays: 2	Location: 4.2.3.3.1.1
Strains: *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and *Escherichia coli* strain WP2 uvrA	No. of Replicate Cultures: 3	GLP Compliance: No
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9 plus co-factors	No. of Cells Analyzed/Cultured: 5.6 - 11 x 10^7	
Vehicle for Test Article: Phosphate-buffered saline	Vehicle for Positive Controls: Water or DMSO	Date of Treatment: 18 Oct 2005 and 02 Nov 2005
Treatment: Plate Incorporation Method, pralatrexate doses used were 100, 500, 1000, 3000, and 5000 µg/plate		
Cytotoxic Effects: pralatrexate was non-toxic at doses of ≤ 5,000 µg/plate with or without S9.		
Genotoxic Effects: pralatrexate at doses of ≤ 5,000 µg/plate with or without S9 was negative in two independent assays in all strains tested. Both negative and positive controls fulfilled the requirements of the test.		

2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験（続き）

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (μg/plate)	Revertants/Plate (Mean ± SD)											
			TA98			TA100			TA1535			TA1537			WP2uvrA		
Without Activation (confirmatory assay)	PBS	-	34	±	4	120	±	4	37	±	1	14	±	2	17	±	1
	PDX	100	31	±	3	119	±	8	52	±	3	8	±	1	16	±	4
		500	41	±	7	139	±	23	35	±	7	8	±	1	20	±	3
		1000	29	±	2	110	±	3	25	±	1	9	±	1	14	±	4
		3000	32	±	2	114	±	4	27	±	6	9	±	1	14	±	5
		5000	38	±	10	124	±	14	32	±	1	8	±	3	12	±	3
	2-nitrofluorene	5.0	706	±	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	sodium azide	1.0	-	-	-	690	±	80	924	±	85	-	-	-	-	-	-
	9-aminoacridine	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	±	36	-	-	-
	Methyl methanesulfonate	4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	584	±	39
With Activation (confirmatory assay)	PBS	-	36	±	4	105	±	19	15	±	3	12	±	2	15	±	6
	PDX	100	49	±	5	104	±	15	10	±	4	10	±	3	16	±	2
		500	50	±	10	109	±	7	17	±	4	11	±	2	12	±	1
		1000	41	±	5	96	±	3	12	±	6	9	±	3	18	±	4
		3000	35	±	1	105	±	12	19	±	4	8	±	2	20	±	2
		5000	35	±	6	113	±	23	17	±	2	10	±	2	16	±	2
	2-aminoanthracene	a	1978	±	176	1952	±	81	287	±	24	480	±	60	258	±	32

a: TA98, TA100 and TA1535=2.5 μg/plate, TA1537=5.0 μg/plate, WP2uvrA=20 μg/plate
PDX = pralatrexate, No. = number, GLP = Good Laboratory Practice, DMSO = dimethyl sulfoxide

2.6.7.8.2 細菌を用いる復帰突然変異試験（再試験）

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate: Bacterial Reverse Mutation Assay
Study No.: 8360855
Test for Induction of: Reverse mutation
No. of Independent Assays: 1
Location: 4.2.3.3.1.3
Strains: *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102
No. of Replicate Cultures: 3
GLP Compliance: Yes
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9 plus co-factors
No. of Cells Analyzed/Cultured: 10^7 – 10^8
Date of Treatment: 3 Feb 2017 to 06 Feb 2017
Vehicle for Test Article: Phosphate-buffered saline, Vehicle for Positive Controls: Water or DMSO
Treatment: Plate Incorporation Method, pralatrexate doses used were 5, 16, 50, 160, 500, 1600 and 5000 µg/plate
Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity was observed at 5000 µg/plate in strain TA102 in the presence of S-9 only.
Genotoxic Effects: pralatrexate at doses of ≤ 5,000 µg/plate with or without S9 was negative in all strains tested. Both negative and positive controls fulfilled the requirements of the test.

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (µg/plate)	Revertants/Plate (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102
Without Activation	PBS	-	45.7 ± 1.5	120.7 ± 3.5	16.3 ± 3.2	9.0 ± 4.4	216.3 ± 9.2
	PDX	5	29.3 ± 11.6	100.0 ± 12.5	24.3 ± 5.0	9.0 ± 8.9	218.7 ± 8.1
		16	26.0 ± 5.6	124.3 ± 14.6	15.7 ± 4.7	10.7 ± 4.2	231.3 ± 15.5
		50	26.0 ± 4.6	127.0 ± 8.9	17.7 ± 6.7	8.7 ± 2.3	202.3 ± 5.5
		160	35.0 ± 3.5	123.3 ± 9.5	23.0 ± 3.6	9.0 ± 3.6	205.7 ± 16.0
		500	30.0 ± 10.0	124.7 ± 4.0	18.3 ± 6.7	8.3 ± 2.1	205.3 ± 16.5
		1600	35.3 ± 8.5	121.3 ± 24.0	17.7 ± 5.9	7.7 ± 5.5	197.7 ± 16.3
		5000	30.7 ± 4.0	118.0 ± 20.1	16.0 ± 4.0	8.0 ± 5.3	232.3 ± 17.0
	2-nitrofluorene	5	438.7 ± 156.8	- - -	- - -	- - -	- - -
	sodium azide	2	- - -	541.0 ± 17.1	509.0 ± 178.8	- - -	- - -
	9-aminoacridine	50	- - -	- - -	- - -	187.3 ± 121.5	- - -
	mitomycin C	0.2	- - -	- - -	- - -	- - -	737.0 ± 164.5

2.6.7.8.2 細菌を用いる復帰突然変異試験（再試験）（続き）

Metabolic Activation	Treatment	Dose Level (μg/plate)	Revertants/Plate (Mean ± SD)					
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102	
With Activation	PBS	-	39.0 ± 7.0	118.7 ± 16.3	13.0 ± 7.5	15.3 ± 0.6	236.3 ± 27.2	
	PDX	5	31.3 ± 2.5	119.7 ± 8.7	13.3 ± 9.3	18.3 ± 1.2	174.3 ± 36.7	
		16	33.0 ± 7.5	121.3 ± 4.5	18.0 ± 2.6	11.3 ± 1.2	216.3 ± 5.5	
		50	30.0 ± 3.6	116.7 ± 6.8	18.0 ± 2.6	15.7 ± 8.1	197.0 ± 23.5	
		160	41.0 ± 12.5	134.0 ± 16.1	19.7 ± 2.5	11.7 ± 2.1	186.3 ± 16.4	
		500	38.3 ± 3.1	134.0 ± 7.5	17.3 ± 4.2	16.0 ± 1.0	192.0 ± 15.1	
		1600	38.0 ± 5.2	120.7 ± 1.2	16.7 ± 4.9	16.3 ± 6.8	196.0 ± 25.1	
		5000	36.7 ± 5.0	120.3 ± 1.2	17.0 ± 2.6	11.7 ± 3.8	187.3 ± 16.6	
	benzo[a]pyrene	10	336.7 ± 30.4	- - -	- - -	- - -	- - -	
	2-aminoanthracene	a	- - -	1018.7 ± 48.2	223.7 ± 15.7	362.7 ± 64.4	1554.0 ± 233.4	

a: TA100, and TA1535 and TA1537=5.0 μg/plate, TA102=20 μg/plate
PDX = pralatrexate, No. = number, GLP = Good Laboratory Practice, DMSO = dimethyl sulfoxide

2.6.7.8.3 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Test for Chemical Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells with and without Metabolic Activation		Study No.: PDX-T-06022-H
Test for Induction of: Chromosomal Aberrations	No. of Independent Assays: 2	Location: 4.2.3.3.1.2
Strains: CHO cells	No. of Replicate Cultures: 2	GLP Compliance: No
Metabolizing System: phenobarbital/ß-naphthoflavone-induced rat liver S9 plus co-factors	No. of Cells Analyzed/Cultured: 200 metaphases scored (100 per culture)/ 5 x 10^5 cells per culture	
Vehicle for Test Article: Phosphate-buffered saline	Vehicle for Positive Controls: Water	
Treatment: Difinitive assay: 3 hours treatment with test article followed by cell harvest 18 hours after initiation of treatment, confirmatory assay: 18hours treatment with test article followed by cell harvest 18 hours after initiation of treatment		Date of Treatment: various during the period Nov 2005 - Apr 2006

Cytotoxic Effects: pralatrexate is a cytotoxic anti-cancer agent and was found to be cytotoxic to CHO cells at concentrations > 1 µg/mL.

Genotoxic Effects: pralatrexate at concentrations of ≤ 1 µg/mL (~2.1 µmol/L) with or without S9 was negative in the CHO cell chromosomal aberration assay. Both negative and positive controls fulfilled the requirements of the test.

2.6.7.8.3 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験（続き）

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Mean Mitotic Index (%)	Aberrations per Cell	Cells with Aberrations (%)
3-Hour Treatment Without Activation	PBS	-	100	0.000	0.0
	PDX	0.25	102	0.000	0.0
		0.5	46	0.000	0.0
		1.0	35	0.005	0.5
	Mitomycin C	0.4	65	0.390	30.0**
3-Hour Treatment With activation	PBS	-	100	0.000	0.0
	PDX	0.25	101	0.000	0.0
		0.5	100	0.000	0.0
		1.0	50	0.005	0.5
	Cyclophosphamide	7.5	25	0.440	29.5**
18-Hour Treatment Without Activation	PBS	-	100	0.005	0.5
	PDX	0.00313	91	0.010	1.0
		0.00625	66	0.000	0.0
		0.0125	38	0.005	0.5
	Mitomycin C	0.2	38	0.460	32.5**

Statistical method used: Chi-square test ** $p \leq 0.001$
PDX = pralatrexate, No. = number, GLP = Good Laboratory Practice, CHO = Chinese hamster ovary

2.6.7.9 遺伝毒性：*In Vivo*

2.6.7.9.1 マウス小核試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: In Vivo Test for Chemical Induction of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes in Mouse Bone Marrow Cells | Study No. PDX-T-06023-M

Test for Induction of: MPCE | Treatment Schedule: qd x 3 | Location: 4.2.3.3.2.1

Species / Strain: mouse/CD-1 | Sampling Time: 24 hours after the final dose | GLP Compliance: No

Age: approximately 50 days | Method of Administration: IP injection

No. of Cells Evaluated / Animal: 2,000 | Vehicle / Formulation: PBS / Solution | Date of Treatment: Oct 2005 - May 2006

Toxic / Cytotoxic Effects: cytotoxic effects as determined by the mean PCE frequency were observed at doses > 3.0 mg/kg.

Genotoxic Effects: no significant increase in number of MPCE was observed at pralatrexate doses of ≤ 3.0 mg/kg. The negative and positive controls fulfilled the requirements of the test.

Evidence of Exposure: dose-dependent exposure was confirmed by determination of plasma concentrations of pralatrexate at 30 minutes after injection (mean plasma concentration 30 minutes after the 3.0 mg/kg dose was 748 ng/mL).

Test Article	Dose (mg/kg)	Average Number of MPCE per 2000 PCE	
		Males (N = 5 per group)	Females (N = 5 per group)
Vehicle (PBS)	NA	0.6	0.8
Pralatrexate	0.5	0.2	0.4
	1.0	0.6	1.0
	2.0	1.4	0.6
	3.0	1.6	0.6
Cyclophosphamide	80	52.6*	46.8*

* Statistically significant response using a one-tailed Student's t-test ($p \leq 0.025$)

MPCE = micronucleated polychromatic erythrocyte, qd = daily, No., N = number, GLP = Good Laboratory Practice, IP = intraperitoneal, PCE = polychromatic erythrocyte, PBS = phosphate-buffered saline, NA = not applicable, *p* = probability value

2.6.7.9.2 ラット小核試験（再試験、用量設定試験）

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate: Dose Range-Finder to Support a Rat Bone Marrow Micronucleus Assay | Study No. 8362119

Test for Induction of: MPCE | Treatment Schedule: qd x 2 | Location: 4.2.3.3.2.2

Species / Strain: rats/ Sprague-Dawley | Sampling Time: 24 hours after the final dose | GLP Compliance: Yes

Age: approximately 7- 9 weeks | Method of Administration: IV injection

No. of Cells Evaluated / Animal: 4,000 | Vehicle / Formulation: PBS / Solution | Date of Treatment: 23 Jan 2017 to 1 Feb 2017

Toxic / Cytotoxic Effects: lower %PCE frequencies were observed at doses 200 mg/kg, which was suggestive of test article induced toxicity to the bone marrow.

Genotoxic Effects: At all pralatrexate treated doses, %MPCE exceeded at the upper limit of the laboratory's historical vehicle control data

Test Article	Dose (mg/kg)	% PCE		% MPCE (± SD)	
		Males (N = 3)	Females (N = 3)	Males (N = 3)	Females (N = 3)
Pralatrexate	20	41.13	31.73	1.07 ± 0.26	0.76 ± 0.25
	100	35.67	31.80	1.08 ± 0.18	0.45 ± 0.26
	200	28.20	25.27	0.83 ± 0.30	0.73 ± 0.28
Historical vehicle control data	NA	42.59 [18.80 – 75.88] [a]	NA	0.16 ± 0.12 [0.00 – 0.60] [a]	NA

Historical control data: Range generated from 26 studies dosed between May 2011 and June 2015, Number of Animals = 160,

[a]: Observed Range [minimum - maximum]

MPCE = micronucleated polychromatic erythrocyte, qd = daily, No., N = number, GLP = Good Laboratory Practice, IV =intravenous, PCE = polychromatic erythrocyte, PBS = phosphate-buffered saline, NA = not applicable,, SD = standard deviation

2.6.7.10　　がん原性試験： 重要な試験以外の試験

該当資料なし

2.6.7.11　　がん原性試験

該当資料なし

2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Pralatrexate

<table>
<tr><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/ Formulation)</th><th>Dosing Period</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>No. Per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Rat / Sprague-Dawley</td><td>IV
(PBS/Solution)</td><td>Daily on gestation day 7 - 20</td><td>0, 0.03, 0.1, 0.3, 2</td><td>8 females/group</td><td>

Maternal mortality was observed at 2.0 mg/kg and decreases in body weight at ≥ 0.1 mg/kg
Litter loss with early resorption was observed at doses ≥ 0.1 mg/kg
The maternal NOAEL and maternal reproductive NOAEL was 0.03 mg/kg
There were no gross treatment-related effects on surviving fetuses
Dose-dependent exposure was confirmed by TK analysis. TK parameters in pregnant rats on GD13 is as follows.

<table>
<tr><th>Dose group</th><th>C_{max} (ng/mL)</th><th>AUC_{last} (ng·h/mL)</th></tr>
<tr><td>0.03 mg/kg/day</td><td>6.63</td><td>4.42</td></tr>
<tr><td>0.1 mg/kg/day</td><td>26.8</td><td>15.0</td></tr>
<tr><td>0.3 mg/kg/day</td><td>44.8</td><td>63.9</td></tr>
<tr><td>2 mg/kg/day</td><td>212</td><td>276</td></tr>
</table>
</td><td>PDX-T-07048-R (4.2.3.5.2.1)</td></tr>
</table>

2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Pralatrexate

<table>
<tr><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/ Formulation)</th><th>Dosing Period</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>No. Per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Rabbit / New Zealand White</td><td>IV (PBS/Solution)</td><td>Daily on gestation day 8 - 21</td><td>0, 0.03, 1, 3, 10</td><td>8 females/group</td><td>▪ Pralatrexate treatment did not lead to maternal mortality. 5 animals (incl. a Control animal) were euthanized due to signs of abortion that appeared unrelated to pralatrexate
▪ Decreases in body weight observed at ≥ 1 mg/kg
▪ Litter loss with early resorption was observed at doses ≥ 1 mg/kg
▪ The maternal NOAEL and maternal reproductive NOAEL was 0.03 mg/kg
▪ There were no gross treatment-related effects on surviving fetuses
▪ Dose-dependent exposure was confirmed by TK analysis. TK parameters in pregnant rabbits on GD14 is as follows.
<table>
<tr><th>Dose group</th><th>C_{max} (ng/mL)</th><th>AUC_{last} (ng·h/mL)</th></tr>
<tr><td>0.03 mg/kg/day</td><td>471</td><td>387</td></tr>
<tr><td>1 mg/kg/day</td><td>1110</td><td>1460</td></tr>
<tr><td>3 mg/kg/day</td><td>2560</td><td>2410</td></tr>
<tr><td>10 mg/kg/day</td><td>18600</td><td>20200</td></tr>
</table></td><td>PDX-T-07047-B (4.2.3.5.2.3)</td></tr>
</table>

AUC_{last} = area under the curve to the last time point, C_{max} = maximum concentration, No. = number, PBS = phosphate-buffered saline, NOAEL = no observed adverse effect level, TK = toxicokinetics

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：受胎能及び初期胚発生に関する試験

該当資料なし

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.14.1 ラット胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): Intravenous Study for Effects on Embryo-Fetal Development in Sprague-Dawley Rats — Study No. PDX-T-07050-R

Species / Strain: Rat / Sprague Dawley — Duration of dosing: Gestation Day 7 through 20 — Location: 4.2.3.5.2.2

Age at first dose: 8 - 10 weeks — Day of mating: Gestation Day 0 (March 11 - 15, 2007)

Date of first dose: March 18 - 22, 2007 (Gestation Day 7) — Day of necropsy: April 2 - 6, 2007 (Gestation Day 22) — GLP compliance: Yes

Special features: none — Method of administration: IV

Basis for high dose selection: dose-range finding study — Vehicle/Formulation: PBS/Solution — Design Similar to ICH S5A, 4.1.3: Yes

No Observed Effect Level (NOAEL); F_0 Females: 0.03 mg/kg/day and F_1 Litters: 0.03 mg/kg/day

Daily Dose GD7-20 (mg/kg):		0 (Control)	0.01	0.03	0.06
	No. Pregnant	25	25	25	25
	No. of Pregnant Died or Sacrificed Moribund or Aborted	0	0	0	0
	No. of Pregnant with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
	Clinical Observations	No treatment related findings			
	Necropsy Observations	No treatment related findings			
	Body Weights (gram), GD22	356.0	348.1	346.5	328.4*
	Body Weight (% change GD7-20)	43.57	41.64	41.58	36.15
	Total Food Consumption GD7-20 (gram/animal)	325.8	318.6	326.7	319.5
	Mean No. Corpora Lutea	12.8	13.0	12.0	13.0
	Mean No. Implantations	11.9	12.0	11.1	11.8
	Mean % Preimplantation Loss	6.4	7.7	7.7	8.6

2.6.7.14.1 ラット胚・胎児発生に関する試験（続き） PDX-T-07050-R

Test Article: Pralatrexate

Daily Dose GD7-20 (mg/kg):			0 (Control)	0.01	0.03	0.06
Litters:	No. Litters Evaluated		25	25	25	25
	No. Live Fetuses	Total	295	284	265	239
		Mean	11.8	11.4	10.6	9.6*
	No. Resorptions	Total	3	15	12	57*
		Mean	0.1	0.6	0.5	2.3
	Mean % Postimplantation Loss		1.1	5.0	5.5	19.4*
	Mean Fetal Body Weight/litter(gram)		5.774	5.746	5.735	4.982*
	Fetal Sex Ratios (% males/litter)		54.5	54.3	58.2	51.6
	Fetal Anomalies:		No treatment related findings			
	Total Gross External Anomalies		0	0	1	3
	Total Visceral Anomalies		3	7	2	8
	Total Skeletal Anomalies		15	12	34	18
	Total Fetal Anomalies		18	19	37	29

* Significantly different from control, $p < 0.05$

PDX = pralatrexate, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, ICH = International Conference on Harmonisation, GD = gestation day, No. = number, *p* = probability value

2.6.7.14.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): Intravenous Study for Effects on Embryo-Fetal Development in New Zealand White Rabbits

Study No. PDX-T-07051-B

Species / Strain: Rabbit / New Zealand White

Duration of dosing: Gestation Day 8 through 21

Location: 4.2.3.5.2.4

Age at first dose: 6 - 7 months

Day of mating: Gestation Day 0 (March 10 - 14, 2007)

Date of First Dose: March 18 - 22, 2007 (Gestation Day 8)

Day of Necropsy: April 9 - 13, 2007 (Gestation Day 30)

GLP Compliance: Yes

Special features: none

Method of administration: IV

Basis for high dose selection: dose-range finding study

Vehicle/Formulation: PBS/Solution

Design Similar to ICH S5A, 4.1.3: Yes

No Observed Adverse Effect Level; F_0 Females: 0.1 mg/kg/day and F_1 Litters: 0.1 mg/kg/day

Daily Dose GD8-21 (mg/kg):		0 (Control)	0.03	0.1	1
	No. Pregnant	19	20	20	20
	No. of Pregnant Died or Sacrificed Moribund or Aborted	0	0	0	3
	No. of Pregnant with Total Resorption of Litter	1	1	1	8
	Clinical Observations				
	Red discharge, vagina (No. of animals)	0	0	1	7
	Necropsy Observations	No visible lesions were observed			
	Body Weight (% change GD8-30)	12.4	11.6	12.4	10.4
	Total Food Consumption GD8-30 (gram/animal)	2970	2958	3086	3216*
	Mean No. Corpora Lutea	9.9	10.1	10.1	10.4
	Mean No. Implantations	9.1	9.5	9.0	8.8
	Mean % Preimplantation Loss	7.8	4.9	12.1	15.0

2.6.7.14.2　ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き）　PDX-T-07051-B

Test Article: Pralatrexate

Daily Dose GD8-21 (mg/kg):		0 (Control)	0.03	0.1	1
Litters:	No. Litters Evaluated	18	19	19	12
	Mean No. Live Fetuses	8.6	9.3	8.9	4.2*
	Mean No. Resorptions	0.5	0.2	0.1	4.7*
	Mean % Postimplantation Loss	5.2	2.2	3.5	50.7*
	Mean Fetal Body Weight/letter (gram)	41.29	39.01	41.87	44.17
	Fetal Sex Ratios (mean % males)	52.0	39.8	54.9	54.5
	Fetal Anomalies:	No treatment related findings			
	Gross External Anomalies	0	0	14	1
	Visceral Anomalies	0	0	10	5
	Skeletal Anomalies	86	119	113	21
	Total Fetal Anomalies	86	119	137	27

* Significantly different from control, $p < 0.05$

PDX = pralatrexate, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, PBS = phosphate-buffered saline, ICH = International Conference on Harmonisation, GD = gestation day, No. = number, *p* = probability value

2.6.7.15 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

該当資料なし

2.6.7.16 新生児を用いた試験

該当資料なし

2.6.7.17 局所刺激性試験

Test Article: Pralatrexate

Species / Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat / Sprague-Dawley	Perivascular	40	5M/5F	Perivenous injection of pralatrexate at 40 mg/kg did not result in any local irritancy at the injection site.	PDX-T-04003-R (4.2.3.6.1)
Rat / Sprague-Dawley	Intradermal	20	5M/5F	Minimal edema and minimal to mild erythema were observed in both males and females from day 4 following administration of a single dose of pralatrexate. There was no microscopic evidence of test article effect at the end of study (day 8 following administration). Therefore, under the conditions of this study, a single intradermal administration of pralatrexate produces only minimal to mild irritancy in Sprague-Dawley rats.	PDX-T-04003-R (4.2.3.6.1)

No. = number, M = male, F = female

2.6.7.18 その他の毒性試験

Test Article: Impurity A*

Type of Study	Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Impurities	Dog / Beagle	Intravenous	QW x 3	0, 0.1, 1, 3, 10	2M/2F	Within minutes following administration of 3 and 10 mg/kg doses of Impurity A* food emesis and/or foamy white or yellow emesis was noted for both males and female dogs; the dogs recovered shortly thereafter. Treatment with Impurity A* at doses of up to 10 mg/kg via slow bolus intravenous injection once weekly for three consecutive weeks had no adverse effect on mortality, body weights, body weight changes, food consumption, selected clinical pathology parameters, absolute and relative organ weights, or gross necropsy findings. The NOAEL for Impurity A* dosed once weekly for 3 consecutive weeks is considered to be at least 10 mg/kg (200 mg/m^2).	PDX-T-08063-D (4.2.3.7.6.1)
Impurities	Dog / Beagle	Intravenous	QW x 6	0, 3, 10, 30	4M/4F[b]	Emesis and salivation were seen at all doses. Ataxia, reduced capillary refill time, pale gums, and labored breathing were observed in 1 male dosed at 30 mg/kg and another male at this dose was lethargic following the 5th and 6th dose. Higher kidney-to-body weight ratios were noted for the 30 mg/kg-males and this was associated with microscopic tubular dilation and minimal to mild chronic inflammation/mononuclear cell infiltration in the renal cortex. These findings appeared to be reversible after a 2-week recovery period. The NOEL could not be determined because emesis with or without salivation occurred at all doses. Since the emesis was not associated with weight loss or any other significant findings, the NOAEL is considered to be 10 mg/kg.	PDX-T-08064-D (4.2.3.7.6.2)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.18 その他の毒性試験（続き）

Test Article: Impurity A*

<table>
<tr><th>Type of Study</th><th>Species / Strain</th><th>Method of Administration</th><th>Duration of Dosing</th><th>Dose (mg/kg)[a]</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Impurities</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>In general, plasma concentration-time profiles appear to increase in relation to the administered dose and no accumulation was observed. Plasma Impurity A*TK parameters in dogs on Day 1 and 36 are as follows.
<table>
<tr><th rowspan="2">Dose group</th><th colspan="2">C_{max} (μg/mL)</th><th colspan="2">AUC_{inf} (μg·min/mL)</th></tr>
<tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr>
<tr><td colspan="5">Day 1</td></tr>
<tr><td>3 mg/kg</td><td>10.0</td><td>9.1</td><td>743</td><td>788</td></tr>
<tr><td>10 mg/kg</td><td>35.2</td><td>30.4</td><td>2,986</td><td>2,367</td></tr>
<tr><td>30 mg/kg</td><td>97.1</td><td>86.5</td><td>14,882</td><td>7,155</td></tr>
<tr><td colspan="5">Day 36</td></tr>
<tr><td>30 mg/kg</td><td>107.3</td><td>97.8</td><td>10,028</td><td>6,938</td></tr>
</table></td><td></td></tr>
</table>

[a] The highest NOAEL is underlined.
[b] An additional 2 animals per gender were added to Group 1 and 4 (0 and 30 mg/kg) for the recovery phase of the study.
No. = number, QW = once weekly, M = male, F = female, [redacted] NOEL = no observed effect level, NOAEL = no observed adverse effect level

*：新薬承認情報提供時に置き換えた