ルムジェブ注カート
ルムジェブ注ミリオペン
ルムジェブ注ミリオペン HD
ルムジェブ注 100 単位/mL

2.6.6　毒性試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 1
2.6.6.1　まとめ 1
2.6.6.1.1　トレプロスチニル 1
2.6.6.1.2　LY900014 製剤 2
2.6.6.1.3　塩化マグネシウム 2
2.6.6.2　単回投与毒性試験 3
2.6.6.2.1　トレプロスチニル 3
2.6.6.2.2　LY900014 製剤 3
2.6.6.3　反復投与毒性試験 3
2.6.6.3.1　トレプロスチニルのラット 3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験 3
2.6.6.3.2　トレプロスチニルのラット 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験 5
2.6.6.3.3　トレプロスチニルのイヌ 3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験 7
2.6.6.3.4　トレプロスチニルのイヌ 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験 8
2.6.6.4　遺伝毒性試験 9
2.6.6.4.1　トレプロスチニルの細菌を用いる復帰突然変異試験 9
2.6.6.4.2　トレプロスチニルのチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる染色体異常試験 9
2.6.6.4.3　トレプロスチニルのラット小核試験 10
2.6.6.5　がん原性試験 11
2.6.6.5.1　トレプロスチニル 11
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 11
2.6.6.6.1　トレプロスチニルの雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験 11
2.6.6.6.2　トレプロスチニルの雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験 12
2.6.6.6.3　トレプロスチニルのラット胚・胎児発生に関する皮下投与試験 14
2.6.6.6.4　トレプロスチニルのウサギ胚・胎児発生に関する皮下投与試験 15
2.6.6.6.5　トレプロスチニルのラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する皮下投与試験 16
2.6.6.7　局所刺激性試験 17
2.6.6.7.1　トレプロスチニルの皮下投与による局所刺激性 17
2.6.6.7.2　LY900014 製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験 17
2.6.6.8　その他の毒性試験 18
2.6.6.8.1　トレプロスチニルのラット経皮曝露皮膚刺激性（ハザード評価） 18
2.6.6.8.2　トレプロスチニルの眼刺激性試験（ハザード評価） 19
2.6.6.8.3　LY900014 製剤の不純物の評価 19
2.6.6.8.4　塩化マグネシウムの安全性評価 20
2.6.6.9　考察及び結論 22
2.6.6.9.1　トレプロスチニル 22
2.6.6.9.2　LY900014 製剤 24
2.6.6.9.3　塩化マグネシウム 24
2.6.6.10　図表 24
2.6.6.11　参考文献 24

2.6.6　毒性試験の概要文

LY900014 製剤は、既承認の超速効型インスリンアナログであるヒューマログ注（以下、ヒューマログ）の有効成分インスリン リスプロ（以下、リスプロ）に、投与部位からの吸収を促進させる作用を持つトレプロスチニルナトリウム（以下、トレプロスチニル）及びクエン酸ナトリウム（以下、クエン酸）を添加剤として加えた新規の超速効型インスリン製剤である。トレプロスチニル（フリー体）はトレプロスト注射液の有効成分として日本で承認されており、肺動脈性肺高血圧症に対し持続静脈内投与又は持続皮下投与で使用されるプロスタサイクリンのアナログである（トレプロスト注射液添付文書, 2017）。LY900014 製剤に含まれる少量のトレプロスチニルは、局所血管拡張によりリスプロの吸収を促進する。また、クエン酸は血管透過性を高めることで、リスプロの吸収を促進する。このほか、LY900014 製剤には、添加剤として塩化マグネシウムが含まれる。LY900014 製剤に含まれる添加剤のうち、トレプロスチニルおよび塩化マグネシウムは、医薬品添加剤としての皮下投与による使用前例がないため、新添加剤に相当する。

2.6.6.1　まとめ

LY900014 製剤の承認申請をサポートするための一連の毒性試験を実施した。新添加剤であるトレプロスチニルについて、ラット及びイヌの最長 26 週間の反復皮下投与毒性試験、標準的組み合わせの遺伝毒性試験並びにラット及びウサギの生殖発生毒性試験を実施した［本文中にはトレプロスチニル（フリー体）としての用量を記載］。また、LY900014 製剤の局所刺激性を評価する目的で、リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）を用いてラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験を実施した。別の新添加剤である塩化マグネシウムについては、上記の毒性試験で用いた溶媒対照の成績に基づき評価した。

毒性及びトキシコキネティクス（TK）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（Good Laboratory Practice：GLP）に従い実施した。医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use：ICH）ガイドラインをはじめとする各国のガイドラインも参照した。非臨床試験計画概略の詳細は 2.4.1 に記載した。

2.6.6.1.1　トレプロスチニル

- ラット及びイヌを用いた 13 又は 26 週間反復投与毒性試験におけるトレプロスチニルの忍容性は良好であった。ラットでは 0.1 mg/kg/日まで、イヌでは 0.07 mg/kg/日までの用量で、生存への影響、注射部位に対する局所刺激性を示す毒性所見及び直接的な標的器官毒性の徴候はなく、無毒性量（no-observed-adverse-effect levels：NOAEL）はそれぞれ 0.1 及び 0.07 mg/kg/日であった。
- 一般状態所見として、トレプロスチニルの血管拡張作用に関連し、ラット及びウサギで用量依存性の四肢の赤色化のみが一過性に見られた。
- ラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験で、リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、ク

エン酸及び塩化マグネシウムを含有）を投与したところ、注射部位反応は認められなかった。

- 標準的な組合せの遺伝毒性試験において、トレプロスチニルに遺伝毒性は認められなかった。
- 生殖発生毒性試験において、ラットでは 0.1 mg/kg/日までの用量で雌雄の生殖能、胚・胎児発生、出生前及び出生後発生及び母体の機能に毒性は認められず、ウサギでは 0.4 mg/kg/日までの用量で胚・胎児発生に毒性は認められなかった。

表 2.6.6-1. トレプロスチニルの毒性試験一覧表

試験の種類	投与経路	被験物質*
反復投与毒性試験		
ラット 3 ヵ月試験	皮下	トレプロスチニル
ラット 6 ヵ月試験	皮下	トレプロスチニル
イヌ 3 ヵ月試験	皮下	トレプロスチニル
イヌ 6 ヵ月試験	皮下	トレプロスチニル
遺伝毒性試験		
細菌を用いる復帰突然変異試験	In vitro	トレプロスチニル
チャイニーズハムスター卵巣細胞染色体異常試験	In vitro	トレプロスチニル
ラット小核試験	皮下	トレプロスチニル
がん原性試験		
なし	–	–
生殖発生毒性試験		
雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下	トレプロスチニル
雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下	トレプロスチニル
ラット胚・胎児発生に関する試験	皮下	トレプロスチニル
ウサギ胚・胎児発生に関する試験	皮下	トレプロスチニル
ラット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	皮下	トレプロスチニル
その他の試験		
ラット経皮曝露皮膚刺激性試験	経皮	トレプロスチニル
眼刺激性試験	Ex vivo	トレプロスチニル

*：トレプロスチニルナトリウムを投与。

2.6.6.1.2 LY900014 製剤

- リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）を、リスプロは最大[redacted]U、トレプロスチニルは最大[redacted]ng/kg、塩化マグネシウムは最大[redacted]mg/kg の用量で雄ラットに 14 日間反復皮下投与し、一般状態所見、注射部位の皮膚スコア及び肉眼的・病理組織学的検査に基づき局所刺激性を評価した結果、投与に関連する注射部位反応及び刺激性は見られなかった。

表 2.6.6-2. LY900014 製剤の毒性試験一覧表

試験の種類	投与経路	被験物質
ラット 14 日間局所刺激性試験	皮下	LY900014 試験製剤*

*ヒューマログ及び Remodulin を混合・希釈した投与液

2.6.6.1.3 塩化マグネシウム

- トレプロスチニルの一連の毒性試験及び LY900014 試験製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験で用いた媒体対照の成績に基づき塩化マグネシウムの評価を行ったところ、安全

性上の懸念は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 トレプロスチニル

トレプロスチニルの単回投与毒性試験は実施していない。

ラットにおける 14 日間予備試験［報告書 8329241 （4.2.3.2.1）、2.6.7.6A］で、トレプロスチニルを 0.6 mg/kg/日までの用量で皮下投与したところ、死亡はなく、身体及び四肢に赤色化が発現した。0.6 mg/kg/日群では、心臓の左心室自由壁又は心尖付近の心室中隔にアラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase：ALT）の軽微な増加を伴うごく軽度から中等度の心筋変性及び壊死（10 匹中 8 匹）が見られたほか、一般状態観察における注射部位の腫脹、注射部位における皮筋の変性及び壊死巣（雌雄各 1 匹）並びに皮下の動脈変性及び壊死（雌 1 匹）も見られ、いずれも毒性と考えられた。概略の致死量は 0.6 mg/kg/日を超えると考えられた。

イヌにおける 7 日間予備試験［報告書 8329243 （4.2.3.2.4）、2.6.7.6A］では、0.28 mg/kg/日の用量を皮下投与したところ、死亡はなく、自発運動の低下、赤色化、流涎、嘔吐及び徐脈が発現した。Day 2 以降は用量を 0.14 mg/kg/日に減量したが、Day 1 と同様の一般状態毒性所見が発現した。病理組織学的検査では注射部位反応のみが全例で見られた。0.28/0.14 mg/kg 群の注射部位反応は、軽微から中等度の血管変性／壊死、軽微からごく軽度の皮下筋肉（皮筋）の変性／壊死、ごく軽度から中等度の皮下出血及び軽微な炎症を特徴とし、毒性であると考えられた。概略の致死量は 0.28 mg/kg/日を超えると考えられた。

2.6.6.2.2 LY900014 製剤

LY900014 製剤の単回投与毒性試験は実施していない。

LY900014 製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験（報告書 8330849、2.6.6.7.2）において、リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）を、リスプロとして最大[redacted]U/kg の用量で雄ラットに投与しても死亡はなく、一般状態にも異常は見られなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

ラット及びイヌを用いてトレプロスチニルの 3 ヵ月及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。

2.6.6.3.1 トレプロスチニルのラット 3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

報告書 8327887 （4.2.3.2.2）、2.6.7.7A

Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]ラットにトレプロスチニルを 3 ヵ月間連日皮下投与したときの毒性及びトキシコキネティクス（TK）を評価した。

用量はラット 14 日間予備試験［報告書 （4.2.3.2.1）、2.6.7.6A］に基づき選択した。予備試験では、雌雄各 5 匹のラットにトレプロスチニルを 0.1 及び 0.6 mg/kg/日の用量（投与濃度：0.25 及び 1.5 mg/mL）で連日皮下投与したところ、死亡はなかった。主な一般状態所見として、投与後 30 分の観察において 0.1 及び 0.6 mg/kg/日群で皮膚の末梢血管拡張を示唆する全身及び四肢の皮

膚の赤色化が認められ、0.6 mg/kg/日群ではさらに自発運動の低下及び呼吸数の増加が見られた。これらの変化は、投与約 2 時間後には消失した。0.6 mg/kg/日群では、心臓の左心室自由壁又は心尖付近の心室中隔に ALT の軽微な増加を伴うごく軽度から中等度の心筋変性及び壊死（10 匹中 8 匹）が見られたほか、一般状態観察における注射部位の腫脹、注射部位における皮筋の変性及び壊死巣（雌雄各 1 匹）並びに皮下の動脈変性及び壊死（雌 1 匹）も見られ、いずれも毒性と考えられた。0.1 及び 0.6 mg/kg/日群の他の個体にも軽微な注射部位反応が認められた。予備試験における NOAEL は 0.1 mg/kg/日と判断した。以上の結果に基づき、ラット 3 ヵ月間反復投与毒性試験では 0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg/日の用量を設定した。

試験デザインを表 2.6.6-3 に示す。

表 2.6.6-3　　トレプロスチニルのラット 3 ヵ月間試験のデザイン（8327887 試験）

群	サブグループ [a]	動物数		用量（mg/kg）[b]	投与濃度（mg/mL）[b]
		雄	雌		
1（対照）[c]	毒性	10	10	0	0
	TK	9	9	0	0
	サテライト	5	5	0	0
2（低）	毒性	10	10	0.01	0.025
	TK	9	9	0.01	0.025
	サテライト	5	5	0.01	0.025
3（中）	毒性	10	10	0.03	0.075
	TK	9	9	0.03	0.075
	サテライト	5	5	0.03	0.075
4（高）	毒性	10	10	0.1	0.25
	TK	9	9	0.1	0.25
	サテライト	5	5	0.1	0.25

a　TK 用動物は血液検体採取のみを目的として設けた。サテライト用動物は心筋トロポニン I 測定用血液検体の採取及び心臓の病理組織学的検査用として設けた。
b　投与容量は 0.4 mL/kg とした。用量はトレプロスチニル量で表記した。
c　第 1 群の個体には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。

生死及び一般状態観察［機能観察総合評価法（functional observational battery : FOB）及びプレチスモグラフィによる呼吸系の評価を含む］、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、臨床検査（心筋トロポニン I 測定を含む）、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査及び TK 評価を実施した。

0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 152 倍、443 倍及び 1301 倍であった（表 2.6.6-15）。

トレプロスチニル投与に関連する死亡はなかった。0.01 mg/kg/日群の毒性評価用動物の雄 1 匹が、瀕死状態のため Day 39 に屠殺された。本個体の剖検時の所見として、左腎盂の腫大、尿管の大型化及び膀胱の大型化（内部に暗赤色の液体を含む）が見られ、瀕死状態に関連すると考えられた。0.01 mg/kg/日群の TK 用動物の雄 1 匹が、頭部に生じた潰瘍性腫瘤のため瀕死状態となり、Day 90 に屠殺された。これら 2 匹は低用量群であり、他の個体で同様の一般状態所見がなかったことから、トレプロスチニル投与に関連しないと考えられた。さらに、対照群の TK 用動物の雄 2 匹がそれぞれ Day 40 又は Day 64 に死亡した。他の個体はすべて計画剖検時まで生存した。

トレプロスチニル投与に関連する一般状態所見として、すべての用量で耳、肢、脚又は鼻に皮膚の赤色化が認められ、耳における皮膚赤色化の発現率は用量依存的であった。この所見は一過性であり、投与後 1 時間以内に消失した。

トレプロスチニル投与に関連する眼科学的検査所見及び摂餌量の変化は認められなかった。

0.1 mg/kg/日群の雄及び全用量群の雌で体重の低下が投与期間を通じて認められたが、その程度はごく軽度であり統計学的に有意な差はなかったことから、毒性ではないと判断した。0.1 mg/kg/日群の雌で体温が低下し、トレプロスチニルの血管拡張作用に関連する可能性があるが、ごく軽度の変化であることから毒性ではないと判断した。FOB においてトレプロスチニル投与に関連するその他の所見は認められなかった。

トレプロスチニルは検討したいずれの用量でも呼吸系（1 回換気量、呼吸数及び分時換気量）に明らかな影響を及ぼさず、臨床検査（心筋トロポニン I を含む）、器官重量、剖検所見及び病理組織学的検査所見（投与部位を含む）に明らかな影響を及ぼさなかった。

以上より、NOAEL は 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.2 トレプロスチニルのラット 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

報告書 8340039 （4.2.3.2.3）、2.6.7.7B

Sprague-Dawley [Crl:(CD)SD]ラットにトレプロスチニルを 6 ヵ月間連日皮下投与したときの毒性及び TK を評価した。

本試験の高用量は、3 ヵ月間反復投与毒性試験（報告書 8327887、2.6.6.3.1）における NOAEL（0.1 mg/kg/日）と同じ用量を設定した。この用量は、薬理作用（血管拡張）による皮膚の赤色化が発現し、また、血漿中曝露量比が最大臨床曝露量を十分上回ると予想された。低用量の 0.01 mg/kg/日は、ラットにおける 6 ヵ月間反復投与毒性試験の NOAEL となると予想した。

試験デザインを表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4 トレプロスチニルのラット 6 ヵ月間試験デザイン（8340039 試験）

群	サブグループ [a]	動物数		投与量（mg/kg）[b]	投与濃度（mg/mL）[b]
		雄	雌		
1（対照）[c]	毒性	15	15	0	0
	TK	6	6	0	0
2（低）	毒性	15	15	0.01	0.025
	TK	12	12	0.01	0.025
3（高）	毒性	15	15	0.1	0.25
	TK	12	12	0.1	0.25

a TK 用動物は血液検体採取のみを目的として設けた。
b 投与容量は 0.4 mL/kg とした。用量はトレプロスチニル量で表記した。
c 第 1 群の個体には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。

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、臨床検査、器官重量測定、剖検、病理組織学的検査及び TK 評価を実施した。

0.01 及び 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 164 倍及び 1469 倍であった（表 2.6.6-15）。

0.01 mg/kg/日群の TK 用動物の雌 1 匹（動物番号 B61862）が Day 145 に死亡発見されたが、一般状態所見及び体重変化がなかったことから、この死亡は偶発的なものであると考えられた。また、0.1 mg/kg/日群の毒性評価用動物の雌 1 匹（動物番号 B61872）が瀕死状態のため Day 134 に屠殺された。本個体の一般状態所見として円背位、削痩及び進行性の体重減少が、また、臨床検査において炎症を示唆する所見（白血球数及び好中球絶対数の軽度な増加並びに総タンパク及びアルブミンの軽度な減少）が見られた。病理組織学的検査において、本死亡例の脳に壊死像が見られ、これが瀕死状態の原因と考えられた。この所見は、Sprague-Dawley ラットで報告されている自然発生性の所見（De Jonghe et al. 2015）と類似していること、本試験において他の個体の中枢神経系に同様の所見が認められなかったことから、トレプロスチニルの投与に関連しないと考えられた。他の個体に同様の一般状態所見及び体重変化はなく、すべて計画剖検時まで生存した。

一般状態観察では、トレプロスチニル投与に関連する所見として、肢、胸部、耳あるいは鼻の皮膚の赤色化が投与期間を通じて認められた。この所見は概して投与約 15 分後に見られ、その日のうちに消失した。眼科学的検査において、トレプロスチニル投与に関連する所見は認められなかった。

トレプロスチニル投与に関連して、体重が低下し、投与期間終了時の 0.01 及び 0.1 mg/kg/日群の平均体重は、対照群と比較し雄でそれぞれ 92.6%及び 86.7%、雌で 96.3%及び 87.5%であった。0.1 mg/kg/日群では 10%以上の体重低下が見られたものの、ほぼ試験期間を通して体重は増加に推移しており、健康状態の悪化を示唆する一般状態所見も見られなかったことから、この体重変化は毒性ではないと判断した。摂餌量は、0.01 及び 0.1 mg/kg/日群で概して対照群と同等以下であった。

臨床検査において、0.1 mg/kg/日群の雄で軽度な骨髄抑制を示唆する所見（血小板数、白血球数、網状赤血球絶対数、好中球絶対数及び単球絶対数の軽度な減少）が見られ、関連する病理組織学的所見として同群の雄で胸骨に骨髄細胞の減少が見られた。この所見は体重低下に関連した変化である可能性があるが（Hubert et al. 2000; Everds et al. 2013）、血球パラメータの変化の程度が軽度であったことから毒性ではないと判断した。0.01 mg/kg/日群ではトレプロスチニル投与に関連する臨床検査所見はなかった。

0.1 mg/kg/日群で最終屠殺時の体重が低下した。剖検においてトレプロスチニル投与に関連する所見はなかった。0.1 mg/kg/日群で副腎重量（絶対重量及び体重あるいは脳重量に対する相対重量）が増加し、関連する病理組織学的所見として副腎皮質のびまん性肥大が見られた。病理組織学的検査におけるその他の所見として、0.01 mg/kg/日以上の群で注射部位に皮下出血の発現率あるいは重症度が増加した。注射部位の皮下出血は、トレプロスチニルの注射部位に対する局所刺激性を示すものではなく、薬理作用である血管拡張作用に続発する変化と考えられたが、その多くは軽微から軽度（対照群における重症度の範囲）であったことから、毒性ではないと判断した。

以上より、NOAEL は 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.3 トレプロスチニルのイヌ 3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

報告書 8327888 （4.2.3.2.5）、2.6.7.7C

ビーグル犬にトレプロスチニルを 3 ヵ月間以上連日皮下投与したときの毒性及び TK を評価した。

用量は 7 日間予備試験［報告書 8329243 （4.2.3.2.4）、2.6.7.6A］に基づき設定した。予備試験では、ビーグル犬（雌雄各 1 匹）にトレプロスチニルを 0.07 又は 0.28/0.14 mg/kg/日の用量で連日皮下投与した。Day 1 に 0.28 mg/kg/日を投与されたイヌで自発運動の低下が見られ、投与後 30～45 分以内に流涎、粘膜の蒼白化、毛細血管再充満時間の延長及び徐脈など、顕著な血管拡張を示唆する一般状態所見が発現した。粘液便も両個体で認められ、雌で白色泡状嘔吐物が認められた。投与 1 時間後にはこれらの所見は消失した。0.28 mg/kg/日の用量は最大耐量を超えていたと考えられたことから、Day 2 以降は 0.14 mg/kg/日に減量したが、残りの投与期間を通して投与 30 分後～2 時間後に自発運動の低下、皮膚及び耳介の赤色化、粘液便又は水様便並びに泡状嘔吐物が認められた。投与 2 時間後にはこれらの所見は消失した。0.07 mg/kg/日群でも耳介の赤色化及び粘液便が認められたが、いずれも軽微であった。臨床検査においてトレプロスチニル投与に関連する変化は生じなかった。病理組織学的検査では、トレプロスチニル投与に関連する変化として注射部位反応のみが全例で見られた。0.28/0.14 mg/kg/日群の注射部位反応は、軽微から中等度の血管変性／壊死、軽微からごく軽度な皮筋の変性／壊死、ごく軽度から中等度の皮下出血及び軽微な炎症を特徴とし、毒性と判断した。以上の結果に基づき、イヌにおける 3 ヵ月間反復投与毒性試験では 0.004、0.015 及び 0.07 mg/kg/日の用量を設定した。

試験デザインを表 2.6.6-5 に示す。

表 2.6.6-5 トレプロスチニルのイヌ 3 ヵ月間試験デザイン（8327888 試験）

群	動物数		用量（mg/kg）[a]	投与濃度（mg/mL）[a]
	雄	雌		
1（対照）[b]	3	3	0	0
2（低）	3	3	0.004	0.04
3（中）	3	3	0.015	0.15
4（高）	3	3	0.07	0.70

[a] 投与容量は 0.1 mL/kg とした。用量はトレプロスチニル量で表記した。
[b] 第 1 群の個体には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。

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、身体検査、心血管系安全性薬理評価、臨床検査（心筋トロポニン I 測定を含む）、器官重量測定、剖検、病理組織学的検査及び TK 評価を実施した。

0.004、0.015 及び 0.07 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 53 倍、205 倍及び 896 倍であった（表 2.6.6-15）。

全例が試験終了時まで生存した。0.07 mg/kg/日群で嘔吐を発現した個体数が増加し、0.004 mg/kg/日以上の群で糞の異常（液状便、粘液便あるいは無形便）が見られた。これらの所見の個体ごとの発現頻度は概して低く、毒性ではないと考えられた。

0.07 mg/kg/日群の雌は投与開始前の期間に体重が減少し、Week 1 にはやや痩せた状態であったことから、身体状態を保持するため同群の 2 匹に高カロリーの缶詰飼料を補給した。この餌の補給を継続したため本群における乾燥飼料摂取量は減少したものの、缶詰飼料の摂食は良好であり、投与期間中の体重は概して対照群と同程度に維持されたことから、体重及び摂餌量にトレプロスチニルの明らかな毒性作用はなかったものと考えられた。0.015 mg/kg/日以下の群では体重、体重増加量及び摂餌量にトレプロスチニル投与に関連する変化はなかった。眼科学的検査において、トレプロスチニル投与に関連する所見は見られなかった。

心血管系安全性薬理評価の結果は 2.6.2.4.1.3 に詳述した。0.015 mg/kg/日以上の群で収縮期血圧及び脈圧の低下が見られ、0.07 mg/kg/日群では心拍数の増加も伴っていたが、トレプロスチニルの薬理作用に一致する変化であり一過性であったことから、毒性ではないと考えられた。ECG において、PR 間隔、QRS 幅、QT 間隔、心拍数補正 QT（corrected QT： QTc）間隔及び定性的評価における変化は認められなかった。

臨床検査（心筋トロポニン I を含む）、器官重量並びに投与部位を含む剖検及び病理組織学的検査所見において、トレプロスチニル投与による毒性変化は見られなかった。

以上より、NOAEL は 0.07 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.4 トレプロスチニルのイヌ 6 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

報告書 8340050（4.2.3.2.6）、2.6.7.7D

ビーグル犬にトレプロスチニルを 6 ヵ月間連日皮下投与したときの毒性及び TK を評価した。

本試験の高用量は、3 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL（0.07 mg/kg/日）と同じ用量を設定した。この用量は散発性の嘔吐、薬理作用（血管拡張）による収縮期血圧及び脈圧の軽度な低下並びに心拍数の軽度な増加が発現し、また、血漿中曝露量比が最大臨床曝露量を十分上回ると予想された。低用量の 0.004 mg/kg/日は、イヌにおける 6 ヵ月間反復投与毒性試験の NOAEL になると予想した。

試験デザインを表 2.6.6-6 に示す。

表 2.6.6-6 トレプロスチニルのイヌ 6 ヵ月間試験デザイン（8340050 試験）

群	動物数		用量（mg/kg）[a]	投与濃度（mg/mL）[a]
	雄	雌		
1（対照）[b]	4	4	0	0
2（低）	4	4	0.004	0.04
3（高）	4	4	0.07	0.7

[a] 投与容量は 0.1 mL/kg とした。用量はトレプロスチニル量で表記した。
[b] 第 1 群には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。

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、心電図検査、臨床検査、器官重量測定、剖検、病理組織学的検査及び TK 評価を実施した。

0.004 及び 0.07 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 45 倍及び 741 倍であった（表 2.6.6-15）。

0.004 mg/kg/日群の雌 1 匹（動物番号 H14102）は、一般状態観察で腟脱を呈し全身衰弱したため、Day 141 に安楽死させた。剖検時の血液学的検査及び血液生化学的検査では炎症あるいはストレス反応に一致する変化が、また、腟脱に関連する病理組織学的検査所見として、腟に浮腫、びらん／潰瘍、好中球浸潤及び出血が見られた。これらは自然発生性の所見でありトレプロスチニル投与に関連しないと考えられた。その他の個体はすべて計画屠殺時まで生存した。

投与部位を含む一般状態観察、眼科学的検査、体重、体重増加量及び摂餌量において、トレプロスチニル投与に関連する所見は見られなかった。

心電図評価（Day 6、85 及び 177 に実施）において、0.07 mg/kg/日群で、Day 6、85 及び 177 に心拍数が一過性（投与後 1.5 時間以内）に中等度の上昇（最大+43 bpm、45%）を示し、Day 85 及び 177 の投与後 1 時間に統計学的に有意に上昇した。この心拍数の上昇は、トレプロスチニルの血管拡張作用に対する代償性の反応と考えられた。同群では心拍数の上昇に伴い Day 85 及び 177 に QT 間隔の短縮傾向が見られたが、QTc 間隔に変化はなかった。0.004 mg/kg/日群では、心拍数、QT 間隔及び QTc 間隔に変化は認められなかった。PR 間隔、QRS 幅及び定性的 ECG 評価における変化並びにリズム異常は認められなかった。

臨床検査（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査及び尿検査）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、トレプロスチニルに関連する変化は生じなかった。

以上より、NOAEL は 0.07 mg/kg/日とした。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 トレプロスチニルの細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書 8327885 （4.2.3.3.1.1）、2.6.7.8A

トレプロスチニルがネズミチフス菌のヒスチジン要求性株及び大腸菌のトリプトファン要求性株において復帰突然変異を誘発するか否かを、ラット肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で評価した。

試験に用いた 5 種類すべての試験菌株について、トレプロスチニルの用量を 5.00、16.0、50.0、160、500、1600 及び 5000 µg/plate として S9 の存在下及び非存在下で評価した結果、復帰突然変異体の増加は認められなかった。媒体対照及び陽性対照の結果から、試験の妥当性が示された。

以上、細菌を用いる復帰突然変異試験において、トレプロスチニルは遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.4.2 トレプロスチニルのチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いる染色体異常試験

報告書 8327886 （4.2.3.3.1.2）、2.6.7.8B

トレプロスチニルが培養チャイニーズハムスター卵巣細胞の染色体異常を誘発するか否かを、S9 の存在下で 3 時間処理［処理濃度範囲：134～391 µg/mL、評価濃度：134、191 及び 273 µg/mL（273 µg/mL の濃度で 45%の細胞毒性）］及び非存在下で 3 時間処理［処理濃度範囲：93～391 µg/mL、評価濃度：191、273 及び 391 µg/mL（391 µg/mL の濃度で 51%の細胞毒性）］並びに S9 非存在下で約 23 時間処理［処理濃度範囲：93.0～391 µg/mL、評価濃度：93.0、133 及び 201 µg/mL（201 µg/mL の濃度で 49%の細胞毒性）］して評価した。用量は、予備試験における細胞毒性データに基づき設定した。

S9 非存在下で 23 時間処理したところ、133 及び 201 μg/mL の濃度で異常細胞発現率（ギャップを除く）が統計学的有意（p≤0.05）に上昇した。しかし、これら 2 濃度における異常細胞発現率（1.33%）は本試験条件下での媒体対照の背景データ（0.00～4.00%）内にあった。したがって、これらの濃度で見られた増加は生物学的意義がないと考えられた。S9 存在下及び非存在下で 3 時間処理したところ、いずれの評価濃度でも染色体異常を有する細胞の数の統計学的有意な増加、倍数性細胞の増加及び核内倍加は認められなかった。媒体対照及び陽性対照は予想される反応を示したことから、試験の妥当性が示された。

以上、染色体異常試験において、トレプロスチニルは遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.4.3　トレプロスチニルのラット小核試験

報告書 8327890 （4.2.3.3.2.1）、2.6.7.9A

トレプロスチニルのラット骨髄小核試験を実施した。

用量設定試験において、ラット（雌雄各 3 匹）にトレプロスチニル 5 mg/kg/日を単回皮下投与したところ、死亡は見られず、全例で不整呼吸を伴う自発運動の低下及び全身皮膚の赤色化が発現した。毒性に性差はなかった。この結果に基づき、小核試験では最高用量を 5 mg/kg/日とし、雄のみを用いた。

雄 Sprague-Dawley ラット（6 匹/群）に媒体（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用水）もしくは 1.25、2.50 又は 5.00 mg/kg/日[1]のトレプロスチニルを、投与容量 1 mL/kg 体重で 2 日間連日投与した。陽性対照群には 60 mg/kg のシクロホスファミドを単回経口投与した。最終投与 24 時間後にすべての動物を安楽死させ、骨髄を採取し、個体あたり少なくとも 4000 個の多染性赤血球（polychromatic erythrocytes：PCE）から小核を有する多染性赤血球（micronucleated PCE：MN-PCE）の出現頻度を解析した。個体あたり少なくとも 500 個の赤血球を評定したときの%PCE を算出して骨髄毒性を評価した。

死亡は生じなかった。すべてのトレプロスチニル投与群で自発運動の低下から不整呼吸といった一般状態の毒性所見が発現した。

トレプロスチニルは骨髄毒性を示さなかった。MN-PCE の出現頻度については、トレプロスチニルの高用量群で統計学的に外れ値と判定された 1 匹が認められたため、この値を解析から除外したところ、いずれの投与群でも MN-PCE 出現頻度の統計学的有意な増加はなかった。媒体対照群及び陽性対照群の MN-PCE 出現頻度はそれぞれの背景データの範囲内にあり、試験の妥当性が示された。

以上、ラット小核試験において、トレプロスチニルは遺伝毒性を示さなかった。なお、トレプロスチニルに関する公表情報として、ラットにトレプロスチニルを 1500 ng/kg/分（2160 μg/kg/日）までの用量で 3 日間持続皮下投与した骨髄小核試験において、染色体異常誘発能は認められなかったと報告されている（トレプロスト注射液　申請概要）。

[1] 投与液の濃度分析に基づく実際の用量はそれぞれ 1.21、2.28 及び 3.76 mg/kg/日であり、目標用量よりも低かった。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 トレプロスチニル

トレプロスチニルの血管拡張作用からは腫瘍原性は予想されないこと、本申請資料に含めたトレプロスチニルの非臨床安全性試験において、腫瘍原性を示唆するような毒性変化や遺伝毒性は認められていないこと、LY900014 製剤の治療用投与に伴うトレプロスチニルの全身曝露量は極めて低いと予想されることから、トレプロスチニルのがん原性の懸念は低いと考えられた。したがってがん原性試験は実施しなかった。

なお、トレプロスチニルを有効成分とする Tyvaso 及び Orenitram について、遺伝毒性並びに吸入及び経口投与でのがん原性は陰性であったとされている（Tyvaso 米国添付文書 2017、Orenitram 米国添付文書 2017）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用いてトレプロスチニルの生殖発生毒性試験を実施した。

2.6.6.6.1 トレプロスチニルの雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験

報告書 8338440 （4.2.3.5.1.1）、2.6.7.12A

雄 Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]ラット（投与開始時に 10 週齢）に、媒体対照もしくはトレプロスチニルを 0.01、0.03 又は 0.1 mg/kg/日の用量で、交配前 28 日間及び 2 週間の交配期間中を通して屠殺時まで 1 日 1 回皮下投与し、無処置雌と交配させたときの交配及び受胎能への影響を評価した。

先に実施したラット 14 日間予備試験［報告書 8329241 （4.2.3.2.1）、2.6.7.6A］結果から、0.1 mg/kg/日の用量ではトレプロスチニルの薬理作用として肢、耳及び全身の赤色化が生じると予想されること、これより高い用量では心臓の病変、自発運動の低下、呼吸数の増加などの所見が発現し、過度の親動物毒性が生じる可能性があることから、本試験では 0.1 mg/kg/日を高用量に設定した。低用量には NOAEL となると予想される 0.01 mg/kg/日を選択した。

試験デザインを表 2.6.6-7 に示す。

表 2.6.6-7 トレプロスチニルの雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生試験デザイン（8338440 試験）

群 [a]	動物数		用量 (mg/kg/日) [c]	投与濃度 (mg/mL) [d]
	雄	雌 [b]		
主試験用動物				
1（対照）	20	25	0	0
2（低）	20	25	0.01	0.025
3（中）	20	25	0.03	0.075
4（高）	20	25	0.1	0.25
TK 評価用動物				
1（対照）	3	-	0	0
2（低）	9	-	0.01	0.025
3（中）	9	-	0.03	0.075
4（高）	9	-	0.1	0.25

a 第 1 群の雄［主試験用及び TK 評価用］には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。
b 交配用の無処置雌。各群最大 20 匹について雄と交配させた後、帝王切開を実施した。
c 用量はトレプロスチニル量で表記した。
d 投与容量は 0.4 mL/kg とした。

生死及び一般状態、体重及び摂餌量、生殖パラメータ、帝王切開所見（妊娠 13 日）、精子検査、器官重量、剖検、病理組織学的検査及び TK を評価した。

0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 91 倍、322 倍及び 977 倍であった（表 2.6.6-15）。

全例が計画屠殺時まで生存した。トレプロスチニル投与全群で肢の腫脹並びに肢及び耳の赤色化が一過性に見られ、0.03 及び 0.1 mg/kg/日群では耳、皮膚及び全身の赤色化並びに不整呼吸が用量依存的に発現した。さらに 0.1 mg/kg/日群では口腔内の透明分泌物及び一過性の自発運動の低下が見られた。これらの一般状態所見は一過性であり、雄ラットの全般的な健康状態に影響を及ぼさなかったことから、毒性ではないと判断した。

0.1 mg/kg/日群では交配前 10 日頃から体重増加が対照群よりもわずかに緩やかで（交配後 0 日の体重は対照群と比べ-6.6%）であり、摂餌量も、試験期間を通じてわずかに減少（交配前 21～28 日の期間の摂餌量は対照群と比べ-7.1%）したが、いずれも毒性ではないと考えられた。0.01 及び 0.03 mg/kg/日群では体重及び摂餌量は、試験期間を通じて対照群と概して同程度であった。

帝王切開パラメータ、生殖指標、精子検査、雄の器官重量、剖検及び雄生殖組織（精巣、左精巣上体、凝固腺、前立腺及び精嚢）の病理組織学的検査において、トレプロスチニル投与に関連する影響は見られなかった。

以上より親動物毒性及び生殖毒性の NOAEL はいずれも 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.2 トレプロスチニルの雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験

報告書 8338441 （4.2.3.5.1.2）、2.6.7.12B

雌 Crl:CD(SD)ラット（投与開始時に 12 週齢）に、媒体対照もしくはトレプロスチニルを 0.01、0.03 又は 0.1 mg/kg/日の用量で、交配前 14 日間、交配期間中及び妊娠 7 日まで 1 日 1 回皮下投与

し、雌ラットの性腺機能及び性周期並びに無処置雄と交配させたときの交配及び受胎能への影響を評価した。

用量は、雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験と同じ用量を選択した。

試験デザインを表 2.6.6-8 に示す。

表 2.6.6-8 トレプロスチニルの雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験デザイン（8338441 試験）

群 [a]	動物数		用量 [c] (mg/kg/日)	投与濃度 [d] (mg/mL)
	雄 [b]	雌		
主試験用動物				
1（対照）	20	20	0	0
2（低）	20	20	0.01	0.025
3（中）	20	20	0.03	0.075
4（高）	20	20	0.1	0.25
TK 評価用動物				
1（対照）	5	5	0	0
2（低）	9	9	0.01	0.025
3（中）	9	9	0.03	0.075
4（高）	9	9	0.1	0.25

a 第 1 群の雌（主試験用及び TK 評価用）には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。
b 交配用の無処置雄。
c 用量はトレプロスチニル量で表記した。
d 投与容量は 0.4 mL/kg とした。

生死及び一般状態、体重及び摂餌量、生殖パラメータ、剖検及び帝王切開パラメータ（妊娠 13 日）及び TK を評価した。

0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 89 倍、289 倍及び 693 倍であった（表 2.6.6-15）。

全例が計画屠殺時まで生存した。トレプロスチニルを投与した全ての群でトレプロスチニルの血管拡張作用に一致する一般状態所見（四肢及び皮膚の赤色化）が一過性に見られ、その重症度は用量依存的な増加傾向を示した。さらに 0.03 及び 0.1 mg/kg/日群では肢の腫脹及び注射部位の腫脹が、0.1 mg/kg/日群では自発運動の低下、不整呼吸及び胸部背側の腫脹も見られた。これらの所見は雌ラットの全般的な健康状態に影響を及ぼさなかったことから、毒性ではないと考えられた。体重、体重増加量及び摂餌量において投与に関連した影響は見られず、剖検においてトレプロスチニル投与に関連する所見はなかった。

性周期評価、交配確認までの期間及び生殖パラメータにおいて重要な変化はなかった。剖検時の肉眼観察及び帝王切開パラメータにおいてトレプロスチニルの影響はなかった。

以上より、親動物毒性及び生殖毒性の NOAEL はいずれも 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.3 トレプロスチニルのラット胚・胎児発生に関する皮下投与試験

報告書 8338442 （4.2.3.5.2.2）、2.6.7.13A

妊娠 Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]ラット（投与開始時に 10～11 週齢）に、媒体対照もしくはトレプロスチニルを 0.01、0.03 又は 0.1 mg/kg/日の用量で、器官形成期（妊娠 6～17 日）の間連日皮下投与し、妊娠動物及び胚・胎児への毒性並びに TK を評価した。

先に実施したラット胚・胎児発生に関する予備試験［報告書 8338438 （4.2.3.5.2.1）、2.6.7.11A］結果から、0.1 mg/kg/日の用量では自発運動の低下、常同行動（口唇を鳴らす）などの一般状態所見、また肢の腫脹並びに肢、耳及び全身の赤色化などの薬理作用に伴う変化が生じると予想された。また、これより高い用量では心臓の病変、自発運動の低下、呼吸数の増加などの所見が発現し、過度の親動物毒性が生じる可能性があると考えられた［報告書 8329241 （4.2.3.2.1）、2.6.7.6A］。したがって、本試験では 0.1 mg/kg/日を高用量に設定した。低用量には NOAEL となると予想される 0.01 mg/kg/日を選択した。

試験デザインを以下の表 2.6.6-9 に示す。

表 2.6.6-9 トレプロスチニルのラット胚・胎児発生試験デザイン（8338442 試験）

群 [a]	動物数 交配した雌	用量 [b] (mg/kg/日)	投与濃度 [c] (mg/mL)
主試験用動物			
1（対照）	26	0	0
2（低）	26	0.01	0.025
3（中）	26	0.03	0.075
4（高）	26	0.1	0.25
TK 評価用動物			
1（対照）	4	0	0
2（低）	8	0.01	0.025
3（中）	8	0.03	0.075
4（高）	8	0.1	0.25

a 第 1 群（主試験用及び TK 評価用）には媒体対照物質（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。
b 用量はトレプロスチニル量で表記した。
c 投与容量は 0.4 mL/kg とした。

母動物の生死及び一般状態、体重及び摂餌量、剖検、帝王切開所見（妊娠 21 日）、胎児の生存性、胎児体重、胎児の形態（外表、内臓及び骨格）並びに TK を評価した。

0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 86 倍、240 倍及び 964 倍であった（表 2.6.6-15）。

毒性評価用動物は全例が計画剖検時（妊娠 21 日）まで生存した。TK 評価用動物の 0.01 mg/kg/日群の 1 匹が死亡したが、低用量における所見であり他に死亡はなかったことから、トレプロスチニル投与との関連はないと判断した。トレプロスチニル投与全群で血管拡張作用に関連する一般状態所見（四肢及び皮膚の赤色化）並びに不整呼吸が一過性に見られ、その重症度は用量依存的な増加傾向を示した。0.1 mg/kg/日群では自発運動の低下も見られた。これらの所見は一過性でありラットの全般的な健康状態に影響を及ぼさなかったことから、毒性ではないと考えられた。

体重、体重増加量及び摂餌量に毒性変化はなく、剖検においてトレプロスチニル投与に関連する所見はなかった。

胎児の生存性及び胎児体重に重要な影響は見られず、またトレプロスチニル投与に関連すると考えられる胎児の形態異常はなかった。

以上より、母動物毒性及び胚・胎児発生毒性の NOAEL はいずれも 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.4 トレプロスチニルのウサギ胚・胎児発生に関する皮下投与試験

報告書 8338443（4.2.3.5.2.4）、2.6.7.13B

妊娠ニュージーランドホワイト[Hra:(NZW)SPF]ウサギ（投与開始時に 8 ヵ月齢）に、媒体対照またはトレプロスチニルを 0.05、0.14 又は 0.4 mg/kg/日の用量で、器官形成期（妊娠 7～19 日）の間連日皮下投与し、妊娠動物及び胚・胎児への毒性並びに TK を評価した。

用量は、ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験［報告書 8338439（4.2.3.5.2.3）］に基づき設定した。予備試験では、妊娠ウサギに妊娠 7 日から 19 日までトレプロスチニルを 0、0.05、0.1、0.2 又は 0.4 mg/kg/日の用量で連日皮下投与した。全例が計画剖検時（妊娠 29 日）まで生存した。0.2 mg/kg/日以上の群で耳に、0.4 mg/kg/日群では眼周囲にも赤色化が発現し、トレプロスチニルの血管拡張に関連すると考えられた。トレプロスチニル投与全群で投与期間を通じて摂餌量が低下し（0.05、0.1、0.2 又は 0.4 mg/kg/日群で対照群のそれぞれ 84.9%、87.6%、71.6%及び 58.8%）、0.4 mg/kg/日群では統計学的に有意な差であったが、体重に変化はなかった。0.4 mg/kg/日群で早期吸収数の増加（対照群：0、0.4 mg/kg/日群：1.8）及び着床後胚損失率の上昇（対照群：0%、0.4 mg/kg/日群：19.7%）が見られた。胎児重量に毒性作用は見られず、トレプロスチニルに明らかに関連する外表奇形もなかった。これらの結果に基づき、本試験では 0.4 mg/kg/日を高用量に設定した。

試験デザインを表 2.6.6-10 に示す。

表 2.6.6-10 トレプロスチニルのウサギ胚・胎児発生試験デザイン（8338443 試験）

群 [a]	動物数 交配した雌	用量 [b] (mg/kg/日)	投与濃度 [c] (mg/mL)
主試験用動物			
1（対照）	22	0	0
2（低）	22	0.05	0.025
3（中）	22	0.14	0.07
4（高）	22	0.4	0.2
TK 評価用動物			
1（対照）	4	0	0
2（低）	4	0.05	0.025
3（中）	4	0.14	0.07
4（高）	4	0. 4	0.2

a 第 1 群（主試験用及び TK 評価用）には媒体対照（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）を投与した。
b 用量はトレプロスチニル量で表記した。
c 投与容量は 2 mL/kg とした。

母動物の生死及び一般状態、体重及び摂餌量、剖検及び帝王切開所見、胎児の生存性、胎児体重並びに胎児の形態（外表、内臓及び骨格）並びに TK を評価した。

0.05、0.14 又は 0.4 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 1903 倍、4434 倍及び 11974 倍であった（表 2.6.6-15）。

0.4 mg/kg/日群の 3 匹を、摂餌量が持続的に減少したためそれぞれ妊娠 21 日、20 日及び 28 日に屠殺した。同群の別の 1 匹は妊娠 22 日に流産した。摂餌量が減少した期間が継続していたこと及び妊娠 7～20 日に体重が 104 g 減少したことから、本例の流産はこの用量で見られたトレプロスチニルの母動物毒性に起因すると考えられた。その他のすべての動物は計画剖検時まで生存した。

一般状態観察では、トレプロスチニル投与全群で皮膚の変色（全身及び耳の赤色化）が、0.14 及び 0.4 mg/kg/日群で眼（暗赤色化）及び鼻（赤色化）の変色が発現し、さらに 0.4 mg/kg/日群では体温上昇（触診による所見）、自発運動の低下及び不整呼吸も認められた。

トレプロスチニル投与全群で、投与開始後の母動物体重がわずかに減少したが、妊娠 11 日に回復に転じ、妊娠 20 日には対照群の値と同程度となった。摂餌量は、投与開始後にトレプロスチニル投与全群で用量依存的に減少したが、妊娠 18～19 日にはごく軽度回復し、その後妊娠 21～22 日までに対照群と同程度まで回復した。投与期間全体（妊娠 7～20 日）の摂餌量は 0.05、0.14 及び 0.4 mg/kg/日群で対照群に比べそれぞれ 13.8%、20.7%及び 41.5%減少した。0.14 及び 0.4 mg/kg/日群の摂餌量減少は対照群に比べ 20%を超えていたことから、毒性と判断した。

妊娠 29 日の剖検において、投与に関連すると考えられる肉眼所見はなかった。帝王切開パラメータ（胎児の生存性）及び胎児体重に毒性作用は見られず、トレプロスチニル投与に関連すると考えられる胎児の形態異常はなかった。

以上より、母動物毒性に関する NOAEL は 0.05 mg/kg/日、胚・胎児発生毒性に関する NOAEL は 0.4 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.5 トレプロスチニルのラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する皮下投与試験

報告書 20104727 （4.2.3.5.3.1）、2.6.7.14A

妊娠 Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]ラット（F_0 世代）にトレプロスチニル又は対照物質を妊娠 6 日から授乳 20 日（出産した F_0 世代の雌）又は推定妊娠 24 日（出産しなかった F_0 世代の雌）まで 1 日 1 回皮下投与し、妊娠ラット及び次世代の発生・発達への影響を評価した。

試験デザインを表 2.6.6-11 に示す。

表 2.6.6-11 トレプロスチニルのラット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デザイン（20104727 試験）

群番号	用量 (mg/kg) [a]	濃度(mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	F_0 世代の妊娠雌ラットの数	
				主試験	TK 試験
1	0（対照）	0	0.4	24	4
2	0.01	0.025	0.4	24	8
3	0.03	0.075	0.4	24	8
4	0.1	0.25	0.4	24	8

注：対照＝媒体（15 mM クエン酸及び 5 mM 塩化マグネシウム含有注射用滅菌水）

[a] 用量はトレプロスチニル量で表記した。

F_0 世代については、生死及び一般状態、体重及び摂餌量、母動物の観察、自然分娩及び出生児の観察、TK 評価、剖検並びに卵巣及び子宮パラメータの評価を実施した。F_1 世代については、生死及び一般状態、体重及び摂餌量、離乳後の発達、行動（詳細な一般状態観察、聴覚驚愕反応、運動活性、モーリス水迷路試験）、性成熟、性周期、生殖能（交尾能及び受胎能）、剖検、雌雄生殖器の器官重量測定、病理組織学的検査（雄生殖器）、精子評価（運動性、濃度及び形態）並びに卵巣及び子宮の評価を実施した。

0.01、0.03 又は 0.1 mg/kg/日群の血漿中トレプロスチニル曝露量は、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量と比較すると、それぞれ 53 倍、219 倍及び 605 倍であった（表 2.6.6-15）。

トレプロスチニル投与に関連する母動物の死亡、一般状態所見及び母動物の剖検所見はなかった。すべての用量で妊娠 9～12 日に母動物の体重増加量及び摂餌量が減少し、トレプロスチニル投与に関連すると考えられたが、一過性の変化であり全期間を通した値には変化が見られなかったこと、明確な用量依存性がなかったことから毒性ではないと考えられた。分娩の評価項目（妊娠期間及び分娩後の転帰）及び出生児の評価項目（離乳前の成長及び生存）に影響は見られなかった。0.1 mg/kg/日群で妊娠期間が対照群と比較し有意に延長し（対照群：22.5 日、0.1 mg/kg/日群：22.9 日、$p \leq 0.05$）、施設の背景データの範囲（22.0～22.8 日）を超えていたものの、その差はわずかであり、関連する影響が他に見られなかったことから、トレプロスチニル投与に関連しないと考えられた。なお、トレプロスチニルに関する公表情報として、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で、ラットにトレプロスチニルを 450 ng/kg/分（648 μg/kg/日）までの用量で浸透圧ポンプを用いて持続皮下投与したところ、分娩や妊娠期間に影響はなかったと報告されている（トレプロスト注射液　申請概要）。

F_1 世代においては、いずれの評価項目についても、母動物に投与したトレプロスチニル投与に関連する影響はなかった。

以上より、ラットの母動物毒性並びに F_1 世代の成長及び生殖に関する NOAEL はいずれも 0.1 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 トレプロスチニルの皮下投与による局所刺激性

トレプロスチニルを皮下投与時の局所刺激性の評価は、トレプロスチニルの反復投与毒性試験（2.6.6.3）及び生殖発生毒性試験（2.6.6.6）並びに LY900014 製剤の局所刺激性試験（2.6.6.7.2）の一部として実施し、各項に結果を記載した。

2.6.6.7.2 LY900014 製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験

報告書 8330849（4.2.3.6.1）、2.6.7.16A

LY900014 製剤の局所刺激性を評価し、第 I 相臨床試験をサポートする目的で、雄 Crl:CD(SD) ラットにリスプロ（ヒューマログ）、トレプロスチニル（Remodulin）及び希釈調製液を混合し調製した LY900014 試験製剤を、1 日 1 回、14 日間皮下投与し、注射部位の忍容性を評価した。

用量は、リスプロのラット 1 年間反復投与毒性試験［インスリン リスプロ（遺伝子組換え）2001 年 6 月 20 日承認時の既提出承認申請資料（資料番号：ニー７）］において 200 U/kg がリスプロの最大耐量と考えられたことから、[redacted]U/kg を高用量に設定した。

試験デザインを表 2.6.6-12 に示す。

表 2.6.6-12　LY900014 製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験デザイン（8330849 試験）

群	雄動物数	投与容量 (mL/kg)	インスリンリスプロ 用量 (U/kg)	インスリンリスプロ 投与濃度 (U/mL)	トレプロスチニル 用量 (ng/kg)	トレプロスチニル 投与濃度 (ng/mL)
1（対照）[a]	5	[redacted]	0	0	0	0
2（トレプロスチニル）	5	[redacted]	0	0	[redacted]	[redacted]
3（リスプロ）	5	[redacted]	[redacted]	[redacted]	0	0
4（リスプロ及びトレプロスチニル低用量）[b]	5	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
5（リスプロ及びトレプロスチニル高用量）[b]	5	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

注：リスプロ=ヒューマログ（イーライリリー社）、トレプロスチニル= Remodulin（[redacted]社）

a　第 1 群には媒体対照物質（[redacted]mM クエン酸、[redacted]mM 塩化マグネシウム、[redacted]% ポロキサマー188 及び [redacted]mM 塩化亜鉛を含有）。

b　第 I 相試験で用いた LY900014 試験製剤と同様に、ヒューマログと Remodulin を混合・希釈して調製した試験製剤（[redacted]U/mL リスプロ、[redacted]µg/mL トレプロスチニル、[redacted]mM クエン酸、[redacted]mM 塩化マグネシウム、[redacted]% ポロキサマー188 及び[redacted]mM 塩化亜鉛を含有）。この組成は LY900014 市販予定製剤の組成と大きく異ならなかった。臨床試験で用いた LY900014 試験製剤及び市販予定製剤の組成に関する情報は、2.7.1.1.2 に記載。

生死、一般状態観察、体重及び摂餌量測定、Draize スコアによる注射部位の皮膚刺激性の評価並びに注射部位・周囲組織の剖検及び病理組織学的検査を実施した。

全例が計画屠殺時まで生存した。一般状態観察、体重及び摂餌量において投与に関連する所見はなかった。トレプロスチニル単独で[redacted]ng/kg、リスプロ単独で[redacted]U/kg、及び両者の混合液（リスプロは最大[redacted]U/kg、トレプロスチニルは最大[redacted]ng/kg）の忍容性は良好であり、いずれの注射部位にも投与に関連する刺激性は認められなかった。本試験で用いたリスプロ（[redacted]U/kg）及びトレプロスチニル（[redacted]ng/kg）の最高用量を、ヒトに LY900014 製剤の一日最大用量［LY900014 製剤 100 U、トレプロスチニル 1000 ng］と比較したときの用量に基づく安全域はそれぞれ[redacted]倍（リスプロ）及び[redacted]倍（トレプロスチニル）[2]であった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　トレプロスチニルのラット経皮曝露皮膚刺激性（ハザード評価）

報告書 20085992 （4.2.3.7.7.1）、2.6.7.17A

Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]ラット（雌雄各 5 匹）にトレプロスチニルを 2000 mg/kg の用量で皮膚に 24 時間にわたり曝露（Day 1）したときの全身毒性及び皮膚刺激性を評価した。全例について一般状態観察及び体重測定を実施し、Day 14 で剖検した。

[2] アロメトリック補正により算出した体表面積あたり用量での比較（ヒト体重を 50kg とした）。

雌 1 匹が Day 1 の曝露中に死亡した。本例では胃の異常内容物、胃の暗色巣及び胸腺の暗色化が見られた。他の動物は試験終了時まで生存し、雄では一般状態に毒性徴候はなく、雌では触診による体温低下、自発運動の低下あるいは脱水が一過性に見られたのみであった。また、体重への影響及び剖検における毒性所見もなかったことから、トレプロスチニル 2000 mg/kg の全身毒性は弱いと考えられた。したがって、この 1 例の死亡は偶発的に生じたものでありトレプロスチニルの曝露には関連しないと考えられた。

トレプロスチニルの経皮曝露に関連する皮膚刺激性として、ごく軽度から中等度の紅斑が雌雄で認められ、散発性の浮腫、点状／限局性の痂皮及び皮膚の剥離もごく軽微に認められた。これらの所見は試験終了時までに完全に消失した。

本試験条件下でトレプロスチニルの皮膚毒性は限定的であり、2000 mg/kg の用量で皮膚刺激性が見られた。経皮曝露時の概略の致死量は 2000 mg/kg 超であると推定された。

2.6.6.8.2 トレプロスチニルの眼刺激性試験（ハザード評価）

報告書 15AI00.350055 （4.2.3.7.7.2）、2.6.7.17A

OECD 437 の標準プロトコールに従い、ウシ摘出角膜（n=5）を用いてトレプロスチニルの眼刺激性を評価した。角膜の混濁度及び透過性の変化（対照角膜との比較）に基づき in vitro 刺激性スコアを決定した。その結果、トレプロスチニルの in vitro スコアは 76.2 であり、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals：GHS）において重篤な眼の傷害を起こすとされるカットオフ値（55.1）を超えていたことから、トレプロスチニルは重度の眼刺激性物質であると予測された。

2.6.6.8.3 LY900014 製剤の不純物の評価

LY900014 製剤について、[redacted]（[redacted]）、[redacted]（[redacted]）及び[redacted]の規格はそれぞれ[redacted]%以下、[redacted]%以下及び[redacted]%以下に設定予定である。LY900014 製剤の[redacted]及び[redacted]に関する規格の妥当性は、リスプロのラット 1 年間反復投与毒性試験［インスリン リスプロ（遺伝子組換え）2001 年 6 月 20 日承認時の既提出承認申請資料（資料番号：ニー 7）］に基づき検討した。この試験では、20 及び 200 U/kg/日の用量のリスプロを Fischer 344 ラットに 1 年間投与したところ、注射部位における中等度の炎症及び 200 U/kg/日群で低血糖によると考えられる死亡が認められたものの、慢性毒性は認められなかった。このラットの用量（200 U/kg/日）における[redacted]及び[redacted]用量は、LY900014 製剤をヒトに 60 U（1 回最大用量 20 U を 1 日 3 回）で投与時の[redacted]及び[redacted]摂取量（提案されている規格に基づく）のそれぞれ 9.7 倍及び 1.1 倍 （表 2.6.6-11）であることから、規格設定の妥当性が裏付けられる。

表 2.6.6-11 ラット 1 年間反復投与毒性試験及び予定臨床最高用量から算出した[redacted]（[redacted]）及び[redacted]の用量比

種 リスプロの用量	[redacted]（[redacted]）		[redacted]	
	用量 (mg/m²)	規格濃度での用量比 [a]	用量 (mg/m²)	規格濃度での用量比 [a]
ヒト [b]				
予定最高用量 = 0.0416 mg/kg （1.2 U/kg）	[redacted]	–	[redacted]	–
ラット 1 年間反復投与毒性試験 （報告書 R07792）[c]				
200 U/kg = 6.94 mg/kg	[redacted]	9.7 倍	[redacted]	1.1 倍

a 用量比 = 不純物%（毒性用量）/不純物%（規格用量）
[redacted]（[redacted]）の規格は[redacted]%以下。[redacted]の規格は[redacted]%以下。

b 体重 50 kg の場合。

c ラット 1 年間反復投与毒性試験では、ロット[redacted]を 11 ヵ月間、ロット[redacted]を 1 ヵ月間投与した。[redacted]（[redacted]）はロット[redacted]及び[redacted]でそれぞれ[redacted]%及び[redacted]%（投与期間を考慮し平均した含量は[redacted]%）、[redacted]の含量はロット[redacted]及び[redacted]でそれぞれ[redacted]%及び[redacted]%（投与期間を考慮し平均した含量は[redacted]%）であった。

リスプロのラット 1 年間反復投与毒性試験で用いたロットでは[redacted]濃度を測定しなかった。[redacted]は主に[redacted]で生じる[redacted]であるが（Brange and Langkjoer 1993; Jars et al. 2002）、モノクローナル抗体などのタンパク質やペプチドも in vitro 及び in vivo で[redacted]が生じることから（Huang et al. 2005）、リスプロの投与後に[redacted]が体内で代謝物として産生されている可能性が高いと考えられる。また、[redacted]は、ルシフェラーゼ・セルベースアッセイにおいてインスリン様の薬理作用を示すものの、その効力はリスプロよりも弱い。したがって、LY900014 製剤に含まれる[redacted]は安全性上のリスクにはならないと予想され、設定された規格値は毒性の観点で妥当と考える。

以上、[redacted]の規格（[redacted]%以下）、[redacted]の規格（[redacted]%以下）、[redacted]の規格（[redacted]%以下）は毒性の観点で妥当と考える。

2.6.6.8.4 塩化マグネシウムの安全性評価

塩化マグネシウム六水和物（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$、以下、塩化マグネシウム）は、医薬品添加剤としての皮下投与による使用前例がないため、新添加剤に該当するが、静脈内投与用添加剤として 213.6 mg/日までの用量で使用前例がある。LY900014 製剤の最大 1 日用量（100 U）における塩化マグネシウムの最大 1 日用量（1.0 mg）を皮下投与した場合、完全に吸収されると仮定した場合でも静脈内投与で使用前歴のある最大用量の約 200 分の 1 である。このため、塩化マグネシウムについて独立した非臨床試験は実施しなかった。塩化マグネシウムは、トレプロスチニルの一連の毒性試験及び LY900014 製剤のラット 14 日間皮下局所刺激性試験で用いた媒体対照に含まれていたことから、この成績に基づき塩化マグネシウムの評価を行った。

塩化マグネシウムは溶解度が高く、溶液中でマグネシウムと塩素に完全に解離する。マグネシウムは軟組織のすべての細胞で作用を発揮し、タンパク合成装置の一部をなすとともに、エネル

ギー代謝にも必要である。成人男性において推奨されるマグネシウムの栄養所要量（recommended dietary allowance：RDA）は約 400 mg/日であり（Otten et al. 2006a）、これと比較すると、塩化マグネシウム（六水和物含む）の最大 1 日用量（1 mg）中に含まれるマグネシウム（0.12 mg）はわずかである。塩素は、全身の体液中に存在する必須の電解質であり、酸／塩基平衡、神経インパルス伝達及び細胞内外の体液調節に関与する。食事による成人の塩素摂取量（食事摂取基準、dietary reference intakes：DRI）は 2300 mg/日であり（Otten et al. 2006b）、これと比較すると、塩化マグネシウム（六水和物含む）の最大 1 日用量（1 mg）中に含まれる塩素（0.35 mg）はわずかである。

トレプロスチニルの一連の毒性試験及び LY900014 製剤のラット 14 日間皮下局所刺激性試験で用いた媒体対照の成績に基づき塩化マグネシウムの評価を行ったところ、安全性上の懸念は認められなかった（表 2.6.6-14）。以下に得られた成績を要約する。

- ラット及びイヌを用いた 13 又は 26 週間反復投与毒性試験における媒体（塩化マグネシウムは 5 mM の濃度で含有）の忍容性は良好であり、注射部位に対する局所刺激性を示す毒性所見及び直接的な標的器官毒性の徴候は認められなかった。これらの試験における媒体の塩化マグネシウム用量は、ラットで 0.407 mg/kg（ヒト最大用量の 20.3 倍）、イヌで 0.102 mg/kg（ヒト最大用量の 5.08 倍）であった。
- ラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験において、媒体（塩化マグネシウムは[redacted]mM の濃度で含有）あるいはリスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）を投与したところ、注射部位反応は認められなかった（媒体の塩化マグネシウム用量はヒト最大用量の[redacted]倍）。
- ラット骨髄を用いた小核試験において媒体（塩化マグネシウムを含有）を投与したところ、媒体対照群の小核を有する多染性赤血球の出現頻度は背景データの範囲内であった（ヒト最大用量の 50.8 倍）。
- 生殖発生毒性試験において媒体（塩化マグネシウムは 5 mM の濃度で含有）を投与したところ、ラット（0.407 mg/kg、ヒト最大用量の 20.3 倍）及びウサギ（2.03 mg/kg、ヒト最大用量の 102 倍）に明らかな生殖発生毒性は見られなかった。

表 2.6.6-14.　塩化マグネシウムを含む媒体対照を用いた毒性試験一覧及びヒト最大用量との比較

試験の種類及び期間	投与経路	媒体対照における塩化マグネシウムの用量 (mg/kg)	ヒトにおける用量との比較[a]
トレプロスチニルの反復投与毒性試験			
ラット3ヵ月試験	皮下	0.407	20.3倍
ラット6ヵ月試験	皮下	0.407	20.3倍
イヌ3ヵ月試験	皮下	0.102	5.08倍
イヌ6ヵ月試験	皮下	0.102	5.08倍
トレプロスチニルの遺伝毒性試験			
ラット小核試験	皮下	1.02	50.8倍
トレプロスチニルの生殖発生毒性試験			
雄ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下	0.407	20.3倍
雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下	0.407	20.3倍
ラット胚・胎児発生に関する試験	皮下	0.407	20.3倍
ウサギ胚・胎児発生に関する試験	皮下	2.03	102倍
ラット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	皮下	0.407	20.3倍
LY900014製剤の局所刺激性試験			
ラット2週間局所刺激性試験	皮下	[redacted]	[redacted]倍

a　用量比＝（動物の用量）÷（ヒトの用量）。LY900014 製剤のヒトにおける最大 1 日用量（100 U）での塩化マグネシウムの最大 1 日皮下用量は 1.0 mg 又は 0.02 mg/kg（体重 50 kg）となる。

2.6.6.9　考察及び結論

LY900014 製剤の承認申請をサポートするための一連の毒性試験を実施した。新添加剤であるトレプロスチニルについて、ラット及びイヌの最長 26 週間反復投与試験毒性試験、標準的組み合わせの遺伝毒性試験並びにラット及びウサギの生殖発生毒性試験を実施した。また、LY900014 製剤の局所刺激性を評価する目的で、リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）を用いてラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験を実施した。別の新添加剤である塩化マグネシウムについては、上記の毒性試験で用いた溶媒対照の成績に基づき評価した。

2.6.6.9.1　トレプロスチニル

トレプロスチニルの毒性試験におけるトレプロスチニルの血漿中曝露量をヒトにおける曝露量と比較した安全域を表 2.6.6-15 に示す。結果の要約は 2.6.6.1 に示した。トレプロスチニルはヒトに LY900014 製剤の一日最大用量 100 U を投与した際のトレプロスチニルの曝露量に比べはるかに高い曝露量において安全性の問題となるような毒性所見を示さなかった。

表 2.6.6-15. トレプロスチニルを皮下投与時の安全域（全身曝露量に基づく）

種 用量	AUC_{0-24} (ng•hr/mL)	ヒトにおける曝露量との比較 [a]
ヒト		
1000 ng/日トレプロスチニル	0.0309[b]	-
反復投与毒性試験		
ラットにおける 3 ヵ月間投与試験（報告書 8327887）[c]		
0.1 mg/kg/日 [d]	40.2	1301 倍
0.03 mg/kg/日	13.7	443 倍
0.01 mg/kg/日	4.69	152 倍
ラットにおける 6 ヵ月間投与試験（報告書 8340039）[e]		
0.1 mg/kg/日 [d]	45.4	1469 倍
0.01 mg/kg/日	5.07	164 倍
イヌにおける 3 ヵ月間投与試験（報告書 8327888）[c]		
0.07 mg/kg/日 [d]	27.7	896 倍
0.015 mg/kg/日	6.32	205 倍
0.004 mg/kg/日	1.63	53 倍
イヌにおける 6 ヵ月間投与試験（報告書 8340050）[e]		
0.07 mg/kg/日 [d]	22.9	741 倍
0.004 mg/kg/日	1.40	45 倍
生殖毒性試験		
ラットにおける雄受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（報告書 8338440）[f]		
0.1 mg/kg/日 [d]	30.2	977 倍
0.03 mg/kg/日	9.96	322 倍
0.01 mg/kg/日	2.80	91 倍
ラットにおける雌受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（報告書 8338441）[g]		
0.1 mg/kg/日 [d]	21.4	693 倍
0.03 mg/kg/日	8.94	289 倍
0.01 mg/kg/日	2.74	89 倍
ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（報告書 8338442）[h]		
0.1 mg/kg/日 [d]	29.8	964 倍
0.03 mg/kg/日	7.41	240 倍
0.01 mg/kg/日	2.67	86 倍
ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験（報告書 8338443）[i]		
0.4 mg/kg/日 [d]	370	11974 倍
0.14 mg/kg/日	137	4434 倍
0.05 mg/kg/日	58.8	1903 倍
ラットにおける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（報告書 20104727）[j]		
0.1 mg/kg/日 [d]	18.7	605 倍
0.03 mg/kg/日	6.78	219 倍
0.01 mg/kg/日	1.65	53 倍

略語：AUC＝濃度－時間曲線下面積、AUC_{0-24}＝0 時間から 24 時間までの AUC

a 曝露量比＝（動物における AUC_{0-24}）÷（ヒトにおける AUC_{0-24}）

b 日本人健康被験者にトレプロスチニル 1000 ng を投与したときの AUC_{0-24}（インスリン一日最大用量である 100 U の LY900014 製剤を投与した際に含有されるトレプロスチニルの用量に相当：ITRK 試験）

c 8327887 試験では Day 90 の投与後、8327888 試験では Day 92 の投与後における雌雄合算血漿中 AUC の平均値

d 無毒性量

e Day 180 の投与後における雌雄合算血漿中 AUC の平均値

f Day 28 の投与後における雄血漿中 AUC の平均値

g 妊娠 7 日の投与後における雌血漿中 AUC の平均値

h 妊娠 17 日の投与後における雌血漿中 AUC の平均値

i 妊娠 19 日の投与後における雌血漿中 AUC の平均値

j 授乳 20 日の投与後における雌血漿中 AUC の平均値

2.6.6.9.2　LY900014 製剤

リスプロ（ヒューマログ）及びトレプロスチニル（Remodulin）を混合し調製した LY900014 試験製剤（リスプロ、トレプロスチニル、クエン酸及び塩化マグネシウムを含有）のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験において、投与に関連する注射部位反応は見られなかった。

2.6.6.9.3　塩化マグネシウム

トレプロスチニルの一連の毒性試験及び LY900014 試験製剤のラット 14 日間皮下投与局所刺激性試験で用いた媒体対照の成績に基づき、塩化マグネシウムの評価を行ったところ、安全性上の懸念は認められなかった。

2.6.6.10　図表

表あるいは図を適切な項に示す。

2.6.6.11　参考文献

Brange J, Langkjoer L. Insulin structure and stability. *Pharm Biotechnol*. 1993;5:315-350.

De Jonghe S, Abbott D, Vinken P, et al. Bilateral symmetrical idiopathic necrotizing encephalopathy: a new syndrome in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 2015;43:1141-1148.

Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol Pathol.* 2013;41(4):560-614.

Huang L, Lu J, Wroblewski VJ, Beals JM, Riggin RM. In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal Chem*. 2005;77:1432-1439Jars MU, Hvass A, Waaben D. Insulin aspart (AspB28 human insulin) derivatives formed in pharmaceutical solutions. *Pharm Res*. 2002;19(5):621-628.

Hubert MF, Laroque P, Gillet JP, Keenan KP. The effects of diet, ad libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2000;58(1):195-207.

Jars MU, Hvass A, Waaben D. Insulin aspart (AspB28 human insulin) derivatives formed in pharmaceutical solutions. *Pharm Res*. 2002;19(5):621-628.

[OECD] Organization for Economic Cooperation and Development. Test No. 437: bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. 2013. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203846-en.pdf?expires=1550708132&id=id&accname=guest&checksum=85D7C364ED02339142C0634D0145AC20. Accessed Feb. 21, 2019.

Orenitram® (treprostinil) extended-release tablets. Research Triangle Park, NC: United Therapeutics Corp.; 2017. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/203496s006lbl.pdf. Accessed Feb. 21, 2019.

Otten J, Hellwig JP, Meyers LD, eds. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. Washington: Institute of Medicine of the National Academics Press; 2006a: 340-349.

Otten J, Hellwig JP, Meyers LD, editors. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. Washington: Institute of Medicine of the National Academics Press; 2006b: 386-396.

Tyvaso® (treprostinil) inhalation solution. Research Triangle Park,NC: United Therapeutics Corp.; 2017. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/022387s015lbl.pdf. Accessed Feb. 21, 2019.

トレプロスト注射液［添付文書］持田製薬株式会社，2017 年 5 月改訂（第 3 版）Available at: https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/790005_2190416A1024_1_05. Accessed Feb. 21, 2019.

トレプロスト注射液［申請資料概要］持田薬品株式会社. Available at: http://www.pmda.go.jp/drugs/2014/P201400035/index.html. Accessed Feb. 21, 2019.

ルムジェブ注カート
ルムジェブ注ミリオペン
ルムジェブ注ミリオペン HD
ルムジェブ注 100 単位/mL

2.6.7　毒性試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.7.1. Toxicology: Overview 1
2.6.7.1A. Treprostinil: Overview 1
2.6.7.1B. LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil): Overview 4
2.6.7.2. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies 5
2.6.7.2A. Treprostinil: Overview of Toxicokinetics Studies 5
2.6.7.3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 6
2.6.7.3A. Treprostinil: Overview of Toxicokinetics Data 6
2.6.7.4. Toxicology: Drug Substance and Drug Product 8
2.6.7.4A. Treprostinil 8
2.6.7.4B. LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil) 9
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity 10
2.6.7.6. Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies 11
2.6.7.6A. Treprostinil: Nonpivotal Studies 11
2.6.7.7. Repeat-Dose Toxicity 12
2.6.7.7A. Treprostinil: 3-Month Study in Rats 12
2.6.7.7B. Treprostinil: 6-Month Study in Rats 15
2.6.7.7C. Treprostinil: 3-Month Study in Dogs 20
2.6.7.7D. Treprostinil: 6-Month Study in Dogs 24
2.6.7.8. Genotoxicity: In Vitro 28
2.6.7.8A. Treprostinil: In Vitro, Bacterial Mutation 28
2.6.7.8B. Treprostinil: In Vitro, Chromosome Aberration 30
2.6.7.9. Genotoxicity: In Vivo 31
2.6.7.9A. Treprostinil: In Vivo, Micronucleus 31
2.6.7.10. Carcinogenicity 32
2.6.7.11. Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies 33
2.6.7.11A. Treprostinil Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies 33
2.6.7.12. Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development 34
2.6.7.12A. Treprostinil: Male Fertility 34
2.6.7.12B. Treprostinil: Female Fertility 37
2.6.7.13. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development 40
2.6.7.13A. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat 40
2.6.7.13B. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit 43
2.6.7.14. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development 47
2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development 47
2.6.7.15. Studies in Juvenile Animals 53
2.6.7.16. Local Tolerance 54
2.6.7.16A. LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil): Local Tolerance 54
2.6.7.17. Other Toxicity Studies 55
2.6.7.17A. Treprostinil: Other Toxicity Studies 55

2.6.7.1. Toxicology: Overview

2.6.7.1A. Treprostinil: Overview

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Single-Dose Toxicity									
Not applicable									
Repeat-Dose Toxicity									
	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	2 weeks	0, 0.1, 0.6	No	[redacted], USA	8329241	4.2.3.2.1
	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	3 months	0, 0.01, 0.03, 0.1	Yes	[redacted], USA	8327887	4.2.3.2.2
	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	6 months	0, 0.01, 0.1	Yes	[redacted], USA	8340039	4.2.3.2.3
	Dog, Beagle	SC	Treprostinil[a]	1 week	0.07, 0.28/0.14	No	[redacted], USA	8329243	4.2.3.2.4
	Dog, Beagle	SC	Treprostinil[a]	3 months	0, 0.004, 0.015, 0.07	Yes	[redacted], USA	8327888	4.2.3.2.5
	Dog, Beagle	SC	Treprostinil[a]	6 months	0, 0.004, 0.07	Yes	[redacted], USA	8340050	4.2.3.2.6
Genotoxicity									
Bacterial mutation	S. typhimurium E. coli	Cell culture	Treprostinil[a]	52±4 hours	Nonactivated and activated: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], USA	8327885	4.2.3.3.1.1
Chromosome Aberration	CHO cells	Cell culture	Treprostinil[a]	Nonactivated: 3 and 23 hours Activated: 3 hours	Nonactivated: 93.0–391 µg/mL Activated: 134-273 µg/mL	Yes	[redacted], USA	8327886	4.2.3.3.1.2
In vivo micronucleus	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	2 days	1.21, 2.28, 3.76	Yes	[redacted], USA	8327890	4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity									
Not applicable									

(continued)

2.6.7.1A. Treprostinil: Overview (continued)

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity									
Male fertility	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	28 days prior to mating, through mating, and up to day prior to termination	0, 0.01, 0.03, 0.1	Yes	[redacted], USA	8338440	4.2.3.5.1.1
Female fertility/early embryonic development	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	14 days prior to mating, through mating, and up to including GD 7	0, 0.01, 0.03, 0.1	Yes	[redacted], USA	8338441	4.2.3.5.1.2
Embryo-fetal pilot	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	GD 6 –17	0, 0.1, 0.2, 0.65, 1.3	No	[redacted], USA	8338438	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal development	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	GD 6 –17	0, 0.01, 0.03, 0.1	Yes	[redacted], USA	8338442	4.2.3.5.2.2
Embryo-fetal pilot	Rabbit, NZW	SC	Treprostinil[a]	GD 7 –19	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4	No	[redacted], USA	8338439	4.2.3.5.2.3
Embryo-fetal development	Rabbit, NZW	SC	Treprostinil[a]	GD 7 –19	0, 0.05, 0.14, 0.4	Yes	[redacted]	8338443	4.2.3.5.2.4
Prenatal and postnatal development	Rat, SD	SC	Treprostinil[a]	GD 6 –LD 20	0, 0.01, 0.03, 0.1	Yes	[redacted], USA	20104727	4.2.3.5.3.1

(continued)

2.6.7.1A. Treprostinil: Overview (concluded)

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Other Toxicity Studies									
Ocular irritation	Bovine cornea	in vitro	Treprostinil[a]	4 hours	0.75 mL of a 20% suspension	Yes	[redacted], USA	15AI00.350055	4.2.3.7.7.2
Dermal irritation	Rat, SD	Dermal	Treprostinil[a]	24 hours	2140	Yes	[redacted], USA	20085992	4.2.3.7.7.1

Abbreviations: GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; NZW = New Zealand White; SC = subcutaneous injection; SD = Sprague Dawley.

[a] Treprostinil sodium

2.6.7.1B. LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil): Overview

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Local Tolerance									
Tolerability Study	Rat, SD	SC	Insulin lispro and Treprostinil	2 weeks	Insulin lispro or Treprostinil alone or in combination[a]	Yes	[redacted], USA	8330849	4.2.3.6.1

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous injection; SD = Sprague Dawley.

[a] Dose levels of insulin lispro (Humalog®) and treprostinil (Remodulin®) tested in the tolerability study were as follows: 0,[redacted]ng/kg Remodulin alone,[redacted]U/kg Humalog alone,[redacted]U/kg Humalog +[redacted]ng/kg Remodulin, and[redacted]U/kg Humalog +[redacted]ng/kg Remodulin.

2.6.7.2. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

2.6.7.2A. Treprostinil: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Species	Route	Doses (mg/kg/day)	GLP	Document ID	Location in CTD
Repeat dose, 3 month	Rat	SC	0.01, 0.03, 0.1	Yes	8327887	4.2.3.2.2
Repeat dose, 6 month	Rat	SC	0.01, 0.1	Yes	8340039	4.2.3.2.3
Repeat dose, 3 month	Dog	SC	0.004, 0.015, 0.07	Yes	8327888	4.2.3.2.5
Repeat dose, 6 month	Dog	SC	0.004, 0.07	Yes	8340050	4.2.3.2.6
Fertility, Male	Rat	SC	0.01, 0.03, 0.1	Yes	8338440	4.2.3.5.1.1
Fertility, Female	Rat	SC	0.01, 0.03, 0.1	Yes	8338441	4.2.3.5.1.2
Embryo-Fetal	Rat	SC	0.01, 0.03, 0.1	Yes	8338442	4.2.3.5.2.2
Embryo-Fetal	Rabbit	SC	0.05, 0.14, 0.4	Yes	8338443	4.2.3.5.2.4
Pre/postnatal	Rat	SC	0.01, 0.03, 0.1	Yes	20104727	4.2.3.5.3.1

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous injection.

2.6.7.3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

2.6.7.3A. Treprostinil: Overview of Toxicokinetics Data

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL) and AUC (ng•h/mL)											
	Rats				Dogs				Rabbits		Human	
	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}	AUC	C_{max}	AUC
	M	F	M	F	M	F	M	F	F	F		
0.0000025											< 0.04[j]	NE
0.004					1.57[a]	1.18[a]	1.77[a]	1.49[a]				
0.004					1.62[b]	1.39[b]	1.49[b]	1.30[b]				
0.01	6.04[c]	5.61[c]	4.95[c]	4.43[c]								
0.01	6.89[d]	3.76[d]	6.63[d]	3.50[d]								
0.01		1.49[e]		1.65[e]								
0.01	3.79[f]		2.80[f]									
0.01		3.26[g]		2.74[g]								
0.01		3.09[h]		2.67[h]								
0.015					7.02[a]	6.39[a]	7.33[a]	5.30[a]				
0.03	15.9[c]	20.9[c]	13.4[c]	13.9[c]								
0.03		6.33[e]		6.78[e]								
0.03	12.1[f]		9.96[f]									
0.03		9.12[g]		8.94[g]								
0.03		8.07[h]		7.41[h]								
0.05									14.9[i]	58.8[i]		
0.07					32.1[a]	27.6[a]	32.3[a]	23.1[a]				
0.07					37.9[b]	22.5[b]	28.7[b]	17.1[b]				
0.1	56.0[c]	48.5[c]	42.7[c]	37.6[c]								
0.1	70.4[d]	45.3[d]	55.0[d]	35.8[d]								
0.1		16.8[e]		18.7[e]								
0.1	41.0[f]		30.2[f]									
0.1		27.6[g]		21.4[g]								
0.1		28.3[h]		29.8[h]								
0.14									24.2[i]	137[i]		
0.4									81.3[i]	370[i]		

(continued)

2.6.7.3A. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data For Treprostinil (concluded)

Abbreviations: AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximal observed plasma concentration, F = female, M = male, NE = not evaluable.

[a] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Day 92 (Study 8327888).

[b] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Day 180 (Study 8340050).

[c] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Week 13 (Study 8327887).

[d] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Day 180 (Study 8340039).

[e] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Lactation Day 20 (Study 20104727).

[f] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Day 28 (Study 8338440).

[g] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Gestation Day 7 (Study 8338441).

[h] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Gestation Day 17 (Study 8338442).

[i] C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ at Gestation Day 19 (Study 8338443).

[j] The average human steady $C_{max,ss}$ and $AUC_{tau,ss}$ following 15 U of LY900014 administered daily (assuming highest human dose = 150 ng treprostinil per 15 U dose of insulin lispro for a 60-kg human) was determined as part of a population PK analysis involving Studies ITRL, ITRT, ITRR, ITRU, ITSH, ITRQ, ITRV, ITRW (Population PK/PD Report). No sex difference in exposure was observed between human males and females.

2.6.7.4. Toxicology: Drug Substance and Drug Product

2.6.7.4A. Treprostinil

Lot Number [a]	Purity (%)	Specified Impurities (%)			Document ID	Type of Study
		[redacted] [b]	[redacted] [c]	[redacted] [d]		
Specification:	**NLT[redacted]**	**NMT[redacted]**	**NMT[redacted]**	**NMT[redacted]**		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8327887	Repeat dose, 3 month, rat
					8327888	Repeat dose, 3 month, dog
					8327885	Bacterial reverse mutation
					8327886	Chromosome aberration
					8327890	In vivo micronucleus
					8338438	Embryo-Fetal pilot, rat
					8338439	Embryo-Fetal pilot, rabbit
					20104727	Pre/postnatal development, rat
					20085992	Dermal irritation, in vivo
					15AI00.350055	Ocular irritation, in vitro
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8338441	Female fertility and early embryonic development, rat
					8338442	Embryo-fetal development, rat
					8340039	Repeat dose, 6 month, rat
					8340050	Repeat dose, 6 month, dog
					8338443	Embryo-Fetal development, rabbit
[redacted] and [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8338440	Male fertility, rat

Abbreviations: ND = not determined; NLT = not less than; NMT = not more than.

[a] Treprostinil sodium

[b] [redacted]

[c] [redacted]

[d] [redacted]

2.6.7.4B.　LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil)

Lot Number	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Document ID	Type of Study
Humalog® [redacted] Remodulin® [redacted]	NA	NA	8330849	Tolerability Study, 2 weeks, rat

Abbreviations: NA = not applicable

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

No single-dose toxicity studies were conducted.

2.6.7.6. Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

2.6.7.6A. Treprostinil: Nonpivotal Studies

Species Strain	Route[a]	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	#/Group	Noteworthy Findings	Document ID	Location in CTD
Rat/SD	SC	2 weeks	0, 0.1, 0.6	5M/5F (Tox) + 3M/3F (TK)	≥0.1 mg/kg: red discoloration (flushing) of the skin and extremities within 30 minutes post-dose on all dosing days 0.6 mg/kg: hypoactivity, ↑respiration, local swelling of the injection site; ↑ALT; slight to moderate myocardial degeneration and necrosis in the left ventricular free wall or interventricular septum, near the apex of the heart; degeneration and necrosis of subcutaneous muscle (1M/1F) or artery at the injection site (1F)	8329241	4.2.3.2.1
Dog/ beagle	SC	1 week	0.07, 0.28/0.14[b]	1M/1F	≥0.07 mg/kg: red discoloration (flushing) of the ears (F), mucoid feces; ↓FC; injection site reactions characterized by minimal degeneration of subcutaneous muscle, minimal hemorrhage, and minimal to slight inflammation. 0.14/0.28 mg/kg: red discoloration (flushing) of the ears and ventral abdominal area, hypoactivity, salivation, pale mucous membranes, increased capillary refill time, bradycardia, watery feces; injection site reactions characterized by minimal to moderate vascular degeneration/ necrosis, minimal to slight degeneration/necrosis of subcutaneous muscle (panniculus carnosus), slight to moderate subcutaneous hemorrhage, and minimal inflammation.	8329243	4.2.3.2.4

Abbreviations: # = number, ↓ = decreased, ↑ = increased, ALT = alanine aminotransferase, F = female, FC = food consumption, M = male, SC = subcutaneous injection, SD = Sprague Dawley, TK = toxicokinetic.

[a] Vehicle = 15 mM Sodium citrate dihydrate, 5 mM Magnesium chloride hexahydrate, in sterile water for injection.

[b] Following a single dose of 0.28 mg/kg administered on Day 1, the dose level was reduced to 0.14 mg/kg on Days 2 through 7.

2.6.7.7. Repeat-Dose Toxicity

2.6.7.7A. Treprostinil: 3-Month Study in Rats

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats Given Treprostinil Sodium (Compound [redacted]) Once Daily by Subcutaneous Injection for 3 Months						
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD)	Duration of dosing: 3 Months			Test Article: Treprostinil Sodium		
Initial Age: approximately 11 weeks	Route: subcutaneous injection; 0.4 mL/kg			Document ID: 8327887 Location in CTD: 4.2.3.2.2		
Date of First Dose:[redacted]20[redacted] NOAEL: 0.1 mg/kg	Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection			GLP compliance: Yes		
Special features: Functional Observational Batteries, Plethysmography, Cardiac Troponin I Analysis						
Composite Toxicokinetics						
Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil			Number of animals: 3 animals/sex/group/time point		
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily			Assay/Method: LC-MS/MS / 8346664		
Dose (mg/kg):	0.01		0.03		0.1	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics:						
Day 1						
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	3.75	2.45	9.14	8.42	33.0	32.7
(SEM)	(0.183)	(0.142)	(0.566)	(0.652)	(2.10)	(7.63)
C_{max} (ng/mL) [2]	4.49	2.88	9.96	10.0	37.3	44.8
(SD)	(0.475)	(0.366)	(1.20)	(1.33)	(5.01)	(NA)
Week 13						
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	4.95	4.43	13.4	13.9	42.7	37.6
(SEM)	(0.795)	(0.577)	(0.695)	(2.46)	(3.84)	(2.33)
C_{max} (ng/mL) [2]	6.04	5.61	15.9	20.9	56.0	48.5
(SD)	(2.54)	(1.76)	(1.27)	(7.54)	(9.18)	(7.37)

(continued)

2.6.7.7A. Treprostinil: 3-Month Study in Rats (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.01		0.03		0.1	
Sex:Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund[a]	0	0	1	0	0	0	0	0
Clinical signs (n[b])								
Discolored skin, all feet, red	0	0	7	1	4	5	10	10
Discolored skin, all legs, red	0	0	0	0	8	0	0	0
Discolored skin, ears, red	0	0	10	9	10	10	10	10
Discolored skin, front feet, red	0	0	0	0	10	10	0	0
Discolored skin, nose, red	0	0	0	0	0	0	4	0
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight, g (% change[c])								
Day 1	357	232	↑2.5	0.0	↑2.8	↑0.4	↑3.4	↓0.9
Day 36	482	287	↑1.7	↓3.1	↑0.4	↓3.1	↓1.7	↓3.1
Day 91	586	325	↑4.3	↓5.8	↑1.5	↓3.7	↓2.9	↓5.2
Food consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Functional Observational Battery								
Body Temperature, °C								
Day 1	NA	37.3	NA	37.3	NA	37.7	NA	36.9
Plethysmography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiac Troponin I[d]	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.7A. Treprostinil: 3-Month Study in Rats (concluded)

Abbreviations: ↑ = increase, ↓ = decrease, – = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, F = female, M = male, NA = not applicable, NOAEL = no-observed-adverse effect level, SD = standard deviation, SEM = standard error of the mean, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] No compound-related mortalities occurred. One toxicity male given 0.01 mg/kg, one toxicokinetic male given 0.01 mg/kg, and two toxicokinetic males in the vehicle control group were sacrificed or found dead at unscheduled intervals. These deaths were not considered to be compound related.

[b] Number of animals.

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

[d] Satellite animals (5/sex/group) were bled for Cardiac Troponin I analysis on Days 1, 30, and 61 at approximately 4 hours post dose. Blood for Cardiac Troponin I was also collected at the scheduled sacrifice on Day 92 from all Toxicity and Satellite animals.

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

2.6.7.7B. Treprostinil: 6-Month Study in Rats

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats Administered Treprostinil Sodium (Compound [redacted]) Once Daily by Subcutaneous Injection for 6 Months		
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD)	Duration of dosing: 6 Months	Test Article: Treprostinil Sodium
Initial Age: 6 to 7 weeks	Route: subcutaneous injection; 0.4 mL/kg	Document ID: 8340039 Location in CTD: 4.2.3.2.3
Date of First Dose: [redacted]20[redacted] NOAEL: 0.1 mg/kg	Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection	GLP compliance: Yes
Special features: None		

Composite Toxicokinetics				
Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil		Number of animals: 3 animals/sex/group/time point	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily		Assay/Method: LC-MS/MS / 8326664	
Dose (mg/kg):	0.01		0.1	
Sex	M	F	M	F
Toxicokinetics:				
Day 1				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	1.35	1.76	20.1	22.5
(SEM)	(0.145)	(0.164)	(1.96)	(2.46)
C_{max} (ng/mL) [2]	1.54	2.10	23.1	22.7
(SD)	(0.382)	(0.447)	(5.06)	(6.96)
t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500	0.500
Day 90				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	5.07	3.16	55.0	32.3
(SEM)	(0.508)	(0.108)	(4.49)	(4.54)
C_{max} (ng/mL) [2]	5.55	3.94	81.2	33.7
(SD)	(0.918)	(0.184)	(15.1)	(11.2)
t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500	0.500
Day 180				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	6.63	3.50	55.0	35.8
(SEM)	(0.648)	(0.266)	(6.82)	(5.63)
C_{max} (ng/mL) [2]	6.89	3.76	70.4	45.3
(SD)	(1.01)	(0.667)	(22.1)	(18.8)
t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500	0.500

(continued)

2.6.7.7B. Treprostinil: 6-Month Study in Rats (continued)

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.01		0.1	
Sex:Number of Animals	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund[a]	0	0	0	0	0	1
Clinical signs (n[b])						
Discharge, oral, clear	0	0	0	0	9	1
Skin and pelage, discolored skin, all feet, red	0	0	14	5	15	15
Skin and pelage, discolored skin, dorsal thorax, red	0	0	0	7	1	13
Skin and pelage, discolored skin, ears, red	0	0	15	13	15	15
Skin and pelage, discolored skin, front feet, red	0	0	4	0	3	2
Skin and pelage, discolored skin, hind feet, red	0	0	1	0	3	3
Skin and pelage, discolored skin, nose, red	0	0	1	1	15	11
Body weight, g (% change[c])						
Day 1	218	196	↓0.5	↓1.5	↓0.5	↓2.0
Day 57	524	312	↓7.4	↓3.5	↓9.0	↓8.0*
Day 64	545	316	↓7.9	↓2.8	↓9.7*	↓7.6*
Day 92	609	335	↓8.5	↓3.0	↓11.5*	↓7.2
Day 155	691	368	↓8.2	↓3.0	↓13.2*	↓10.9*
Day 182	713	384	↓7.4	↓3.6	↓13.3*	↓12.5*
Body weight Change, g						
Days 1-182	495	188	443	177	401*	144*

(continued)

2.6.7.7B. Treprostinil: 6-Month Study in Rats (continued)

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.01		0.1	
Sex:Number of Animals	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings						
Food consumption, g/animal/day (% change[c])						
Day 1-8	27	20	0.0	↓5.0	↓3.7	↓5.0
Day 22-29	31	23	↓6.5	↓8.7	↓9.7	↓13.0*
Day 43-50	31	22	↓6.5	↓4.5	↓12.9*	↓9.1
Day 57-64	31	25	↓3.2	↓16.0	↑3.2	↓20.0
Day 113-120	31	21	↓9.7	↓9.5	↓16.1*	↓9.5
Day 176-182	30	22	↓3.3	↓9.1	↓6.7	↓9.1
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–
Hematology						
Day 183						
Mean Corpuscular Volume (fL)	53.2	–	54.0	–	56.3*	–
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	16.2	–	16.2	–	17.3*	–
Reticulocyte Count (E3/uL)	230.1	–	232.1	–	183.0*	–
Platelet Count (E3/uL)	1164	–	1166	–	973*	–
White Blood Cell Count (E3/uL)	8.87	–	9.11	–	6.72*	–
Absolute Neutrophils (E3/uL)	2.49	–	2.74	–	1.51*	–
Absolute Monocytes (E3/uL)	0.36	–	0.35	–	0.23*	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry						
Day 183						
Glucose (mg/dL)	–	100	–	94	–	91*
Triglyceride (mg/dL)	–	64	–	51	–	41*
Aspartate aminotransferase (U/L)	137	–	147	–	119*	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–
Organ Weights						
Adrenal						
Absolute Organ Weight, g (% change[c])	0.0594	0.0736	↑12.3	↓6.1	↑30.8*	↑12.1
Organ to Body Weight (%)	0.0089	0.0206	0.0111	0.0203	0.0134*	0.0265*
Organ to Brain Weight (%)	2.5723	3.4889	2.9003	3.4006	3.3972*	3.9183
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–

(continued)

2.6.7.7B. Treprostinil: 6-Month Study in Rats (concluded)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.01		0.1	
Sex: Number of Animals	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings						
Histopathology (n[b])						
Adrenal Cortex						
Hypertrophy, diffuse						
Minimal	0	0	0	0	9	5
Marrow, Sternum						
Hypocellular						
Minimal	0	0	0	0	7	0
Subcutaneous Injection Site A[d]						
Hemorrhage, subcutis						
Minimal	0	0	3	6	2	4
Slight	0	0	2	1	0	2
Moderate	0	0	1	0	0	0
Subcutaneous Injection Site B[d]						
Hemorrhage, subcutis						
Minimal	1	0	6	3	4	5
Slight	0	1	2	3	1	1
Subcutaneous Injection Site C[d]						
Hemorrhage, subcutis						
Minimal	0	1	0	2	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0
Subcutaneous Injection Site D[d]						
Hemorrhage, subcutis						
Minimal	0	0	0	1	0	1
Slight	0	0	0	0	0	1

Abbreviations: ↑ = increase, ↓ = decrease, – = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, F = female, M = male, NOAEL = no-observed-adverse effect level, SD = standard deviation, SEM = standard error of the mean, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] One toxicokinetic female administered 0.01 mg/kg was found dead on Day 145 and one toxicity female administered 0.1 mg/kg was sacrificed in a moribund condition on Day 134. The death of the toxicokinetic female was considered incidental as no clinical observations or changes in body weight occurred. The cause of the moribund condition for the toxicity female was not considered related to treprostinil administration. Clinical observations in this animal included hunched posture, thin appearance, and progressive body weight loss. Clinical pathology findings were consistent with inflammation and included mildly high white blood cell and absolute neutrophil counts and mildly low total protein and albumin.

[b] Number of animals or tissues.

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

[d] Animals were dosed via subcutaneous injection in the dorsal region which was divided into four dose sites (Sites A, B, C, and D). Each dose was rotated between the four dose sites. The final deposition site within each dose site was marked and collected at necropsy.

* = $p \leq 0.05$ (ANOVA and Dunnett's).

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

[3] t_{max} for composite curve.

2.6.7.7C. Treprostinil: 3-Month Study in Dogs

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Dogs Given Treprostinil Sodium (Compound [redacted]) by Subcutaneous Injection Once Daily for 3 Months		
Species/Strain: Dog/ Beagle	Duration of dosing: 3 Months	Test Article: Treprostinil Sodium
Initial Age: 8 to 9 months	Route: subcutaneous injection; 0.1 mL/kg	Document ID: 8327888 Located ID: 4.2.3.2.5
Date of First Dose: [redacted]20[redacted] NOAEL: 0.07 mg/kg	Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection	GLP compliance: Yes
Special features: Cardiovascular Safety Pharmacology (electrocardiograms, hemodynamic measurements), Cardiac Troponin I Analysis		

Mean Toxicokinetics

Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil	Number of animals: 3 animals/sex/group
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily	Assay/Method: LC-MS/MS / 8326554

Dose (mg/kg):	0.004		0.015		0.07	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics:						
Day 1						
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	2.04	1.59	7.20	6.67	37.6	33.2
(SD)	(0.464)	(0.112)	(0.482)	(0.484)	(4.61)	(5.54)
C_{max} (ng/mL)	1.53	1.35	6.67	6.35	40.4	37.0
(SD)	(0.364)	(0.00577)	(0.996)	(0.809)	(8.84)	(3.37)
t_{max} (h)	0.500	0.500	0.517	0.500	0.500	0.500
(SD)	(0.00)	(0.00)	(0.0289)	(0.00)	(0.00)	(0.00)
Day 92						
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	1.77	1.49	7.33	5.30	32.3	23.1
(SD)	(0.127)	(0.420)	(1.15)	(0.618)	(3.90)	(1.69)
C_{max} (ng/mL)	1.57	1.18	7.02	6.39	32.1	27.6
(SD)	(0.0889)	(0.265)	(1.79)	(1.42)	(2.33)	(7.61)
t_{max} (h)	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
(SD)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)

(continued)

2.6.7.7C. Treprostinil: 3-Month Study in Dogs (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.004		0.015		0.07	
Sex:Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs (n[a])								
Emesis	0	0	0	0	0	0	1	3
Vomitus								
Group Observation								
Brown, Containing Food	0	0	0	0	0	0	0	2
Foamy, White	0	0	0	0	0	0	0	2
Individual Observation								
Brown, Containing Food	0	0	0	0	0	0	1	1
Clear, Containing Food	0	0	1	0	0	0	1	2
Containing Food	0	0	1	0	0	0	2	1
Foamy	0	0	0	0	0	0	0	1
Foamy, White	0	0	0	0	0	0	1	2
Foamy, Yellow	0	1	0	0	1	0	0	2
White	0	0	0	0	0	0	1	1
Yellow	0	0	0	0	0	0	0	1
Abnormal feces								
Group Observation								
Liquid	0	0	2	2	0	0	0	0
Nonformed	0	0	3	2	3	0	3	2
Individual Observation								
Liquid	0	0	0	1	0	1	1	2
Mucoid	0	1	0	0	1	0	1	1
Nonformed	0	1	1	2	3	2	2	3
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–[b]
Body Weight Change	–	–	–	–	–	–	–	–[b]
Food Consumpion	–	–	–	–	–	–	–	–[b]
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

2.6.7.7C. Treprostinil: 3-Month Study in Dogs (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.004		0.015		0.07	
Sex:Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings								
Cardiovascular Safety Pharmacology								
Day 3								
Heart Rate (bpm)								
1 Hour Postdose	83	78	75	91	90	84	132	117
1 Hour Postdose (combined sexes)	81		83		87		125**	
Systolic Blood Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	147	155	146	150	133	143	137	131
1 Hour Postdose (combined sexes)	151		148		138		134	
Arterial Pulse Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	80	81	83	76	68	78	55*	52*
1 Hour Postdose (combined sexes)	81		79		73		54	
Day 24								
Heart Rate (bpm)								
1 Hour Postdose	82	80	76	80	89	82	116**	125**
1 Hour Postdose (combined sexes)	81		78		86		121	
Systolic Blood Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	152	148	149	150	133	141	124	112
1 Hour Postdose (combined sexes)	150		149		137		118**	
Arterial Pulse Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	80	77	86	75	66	77	53**	44**
1 Hour Postdose (combined sexes)	79		81		72		48	
Day 87								
Heart Rate (bpm)								
1 Hour Postdose	83	68	75	85	86	86	124	111
1 Hour Postdose (combined sexes)	76		80		86		118**	
Systolic Blood Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	143	154	150	149	145	147	128	139
1 Hour Postdose (combined sexes)	149		150		146		133	
Arterial Pulse Pressure (mmHg)								
1 Hour Postdose	71	76	86	74	75	80	57	62
1 Hour Postdose (combined sexes)	73		80		78		59	

(continued)

2.6.7.7C. Treprostinil: 3-Month Study in Dogs (concluded)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.004		0.015		0.07	
Sex: Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings								
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Cardiac Troponin I	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: – = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum plasma concentration, F = female, M = male, NOAEL = no-observed-adverse effect level, SD = standard deviation, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] Number of animals.

[b] Females administered 0.07 mg/kg/day were in lean condition as early as Week 1, in part, decreases in body weight that occurred during the predose phase, and two were placed on canned food supplementation to aid in body condition. Although body weight changes were generally similar throughout the dosing phase, this was due to the maintenance of higher caloric food supplements, which was reflected in the lower dry food consumption for this group. This finding was not considered adverse because body weights were maintained and qualitative canned food assessment was good for these animals.

* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ (ANOVA and Dunnett's).

2.6.7.7D.　Treprostinil: 6-Month Study in Dogs

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Dogs Given Treprostinil Sodium (Compound [redacted]) Once Daily by Subcutaneous Injection for 6 Months			
Species/Strain: Dog/ Beagle	Duration of dosing: 6 Months		Test Article: Treprostinil Sodium
Initial Age: 6 to 7 months	Route: subcutaneous injection; 0.1 mL/kg		Document ID: 8340050 Located ID: 4.2.3.2.6
Date of First Dose: [redacted]20[redacted] NOAEL: 0.07 mg/kg	Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection		GLP compliance: Yes
Special features: None			
Mean Toxicokinetics			
Sample: Plasma	Analyte:Treprostinil		Number of animals: 4 animals/sex/group
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily		Assay/Method: LC-MS/MS / 8326554

(continued)

2.6.7.7D. Treprostinil: 6-Month Study in Dogs (continued)

Dose (mg/kg):	0.004 (Low)		0.07 (High)	
Sex	M	F	M	F
Toxicokinetics:				
Day 1				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	1.34	1.33	26.0	22.9
(SD)	(0.285)	(0.0804)	(9.57)	(4.22)
C_{max} (ng/mL)	1.58	1.31	32.9	24.8
(SD)	(0.0932)	(0.270)	(12.8)	(5.96)
t_{max} (h)	0.500	0.500	0.500	0.500
(SD)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)
Day 90				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	1.67	1.73	32.1	23.3
(SD)	(0.0919)	(0.303)	(9.68)	(6.14)
C_{max} (ng/mL)	1.88	1.53	39.6	29.0
(SD)	(0.118)	(0.266)	(14.2)	(7.74)
t_{max} (h)	0.500	0.500	0.500	0.500
(SD)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)
Day 180				
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	1.49	1.30[a]	28.7	17.1
(SD)	(0.0375)	(0.424)	(7.53)	(1.75)
C_{max} (ng/mL)	1.62	1.39[a]	37.9	22.5
(SD)	(0.0476)	(0.366)	(16.0)	(2.32)
t_{max} (h)	0.500	0.500[a]	0.500	0.500
(SD)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)

(continued)

2.6.7.7D. Treprostinil: 6-Month Study in Dogs (continued)

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.004		0.07	
Sex: Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–
Body Weight	–	–	–	–	–	–
Body Weight Change	–	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–
Electrocardiographic Examinations						
Day 6						
Heart Rate (bpm)						
1 hour postdose	100	106	96	99	113	136
1 hour postdose (combined sexes)	103		98		125	
1.5 hour postdose	107	117	103	101	101	112
1.5 hour postdose (combined sexes)	112		102		106	
Day 85						
Heart Rate (bpm)						
1 hour postdose	91	99	90	90	132	144
1 hour postdose (combined sexes)	95		90		138**	
1.5 hour postdose	96	98	88	95	104	114
1.5 hour postdose (combined sexes)	97		91		109	
QT Interval (msec)						
1 hour postdose	223	225	223	225	215	203
1 hour postdose (combined sexes)	224		224		209*	
1.5 hour postdose	224	226	228	224	232	222
1.5 hour postdose (combined sexes)	225		226		227	
Day 177						
Heart Rate (bpm)						
1 hour postdose	86	101	81	94	121	132
1 hour postdose (combined sexes)	94		87		127**	
1.5 hour postdose	90	95	81	97	101	108
1.5 hour postdose (combined sexes)	92		88		104	
QT Interval (msec)						
1 hour postdose	232	217	235	222	225	207
1 hour postdose (combined sexes)	224		229		215	
1.5 hour postdose	233	221	237	222	234	219
1.5 hour postdose (combined sexes)	227		234		236	

(continued)

2.6.7.7D. Treprostinil: 6-Month Study in Dogs (concluded)

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.004		0.07	
Sex: Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Noteworthy Findings						
Hematology	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: – = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, F = female, M = male, NOAEL = no-observed-adverse effect level, SD = standard deviation, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] One female was euthanized on Day 141 due to a prolapsed vagina. Other than the clinical observation of swollen vulva from Days 78 to 98, which was associated with the signs of discharge-appeared cycling on Days 78 and 82, and of prolapsed rectum/vagina on Day 141, no other clinical observations considered related to the clinical condition were noted. Although the finding was likely a normal variant for this dog, the dog was humanely sacrificed on Day 141 due to the relapse of this condition and for humane reasons. All hematology and clinical chemistry test results on Day 141 for this dog were
consistent with generalized debilitation and an inflammatory and/or stress response and not considered test article related. The microscopic findings of edema, erosion/ulcer, neutrophilic infiltrate, and hemorrhage in the vagina were correlated with the macroscopic and clinical observations of prolapsed vagina, which was considered a spontaneous finding and not treprostinil related..

2.6.7.8. Genotoxicity: In Vitro

2.6.7.8A. Treprostinil: In Vitro, Bacterial Mutation

Report Title: Treprostinil sodium [[redacted] sodium (compound [redacted])]: Bacterial Reverse Mutation Assay		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	Number of Independent Assays: 1	Test Article: Treprostinil Sodium
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Number of Replicate Cultures: 3	Study No.: 8327885 Located ID: 4.2.3.3.1.1
Metabolizing System: Aroclorinduced rat liver S9	No. of Cells Analyzed/Cultured: $\geq 10^9$ cells/mL	GLP Compliance: Yes
Treatment: Plate incorporation for 52 ± 4 hours		Date of Treatment: [redacted]20[redacted]
Vehicles: Test Article: Dimethylsulfoxide (DMSO)	Positive Controls: Deionized (DI) Water (sodium azide only); DMSO (all other positive controls)	
Cytotoxic Effects: Yes		
Genotoxic Effects: None		

Treatment	Concentration (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Without Metabolic Activation						
DMSO		36 ± 4[a]	87 ± 6[a]	14 ± 3[a]	14 ± 9[a]	18 ± 3[ab]
Treprostinil sodium [[redacted] sodium (compound [redacted])]	5.00	32 ± 7[a]	103 ± 14[a]	15 ± 3[ab]	15 ± 5[ab]	20 ± 3[a]
	16.0	27 ± 1[a]	92 ± 10[a]	9 ± 4[a]	16 ± 4[a]	21 ± 7[a]
	50.0	31 ± 13[ab]	92 ± 4[a]	11 ± 6[a]	17 ± 4[a]	22 ± 2[ab]
	160	35 ± 3[a]	91 ± 4[a]	10 ± 2[a]	18 ± 7[ab]	16 ± 5[a]
	500	31 ± 2[a]	88 ± 15[a]	13 ± 2[ab]	14 ± 3[a]	17 ± 7[a]
	1600	30 ± 6[a]	82 ± 16[a]	9 ± 1[a]	11 ± 4[a]	22 ± 2[ab]
	5000	25 ± 8[a]	84 ± 11[a]	9 ± 6[ab]	8 ± 2[a]	17 ± 8[a]
2-nitrofluorene	1.0	153 ± 10[a]	NT	NT	NT	NT
sodium azide	2.0	NT	1058 ± 54[a]	795 ± 28[a]	NT	NT
ICR-191	2.0	NT	NT	NT	342 ± 22[a]	NT
4-nitroquinoline-N-oxide	1.0	NT	NT	NT	NT	158 ± 17[a]

(continued)

2.6.7.8A. Treprostinil: In Vitro, Bacterial Mutation (concluded)

Treatment	Concentration (μg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
With Metabolic Activation						
DMSO		36 ± 11[a]	125 ± 1[a]	15 ± 4[a]	17 ± 3[a]	21 ± 4[a]
Treprostinil sodium [[redacted]sodium (compound [redacted])]	5.00	35 ± 5[a]	126 ± 7[a]	13 ± 3[ab]	19 ± 7[a]	21 ± 4[a]
	16.0	30 ± 5[ab]	112 ± 9[a]	12 ± 2[a]	21 ± 3[ab]	22 ± 4[a]
	50.0	38 ± 8[a]	105 ± 16[a]	11 ± 2[a]	17 ± 8[ab]	26 ± 1[a]
	160	33 ± 1[a]	114 ± 21[a]	11 ± 0[ab]	14 ± 8[a]	24 ± 11[a]
	500	30 ± 6[a]	114 ± 27[a]	12 ± 1[a]	17 ± 8[a]	20 ± 8[a]
	1600	44 ± 3[ab]	109 ± 4[a]	12 ± 2[a]	15 ± 4[a]	29 ± 7[a]
	5000	25 ± 5[a]	90 ± 2[a]	11 ± 6[a]	9 ± 8[ab]	28 ± 8[a]
benzo[a]pyrene	2.5	394 ± 35[a]	NT	NT	NT	NT
2-aminoanthracene	2.5	NT	1373 ± 111[a]	176 ± 14[a]	170 ± 7[a]	NT
2-aminoanthracene	25.0	NT	NT	NT	NT	390 ± 38[a]

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; NT = not tested; SD = standard deviation.

[a] Normal background bacterial lawn

[b] Plate counted manually

2.6.7.8B. Treprostinil: In Vitro, Chromosome Aberration

Report Title: Treprostinil sodium [[redacted] sodium (compound 3354125)]: In Vitro Chinese Hamster Ovary Chromosome Aberration Assay		Test Article: Treprostinil Sodium
Test for Induction of: Chromosome aberrations	Number of Independent Assays: 2	Study No.: 8327886 Located ID: 4.2.3.3.1.2
Strains: Chinese Hamster Ovary (CHO)	Number of Replicate Cultures: 2	
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	Number of Cells Analyzed/Culture: 150 (or ≥15 if >20% cells with aberrations)	GLP Compliance: Yes
		Date of Treatments: [redacted]20[redacted], [redacted]20[redacted], and [redacted]20[redacted]
Vehicles: Test Article: Dimethylsulfoxide (DMSO) Positive Controls: Deionized (DI) Water		
Treatment: Continuous 23 hour without S9; pulse treatment 3 hour and recovery time 20 hour with and without S9.		
Cytotoxic Effects: Yes		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed	Cytotoxicity[a] based on RICC %[b]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean %	Significance	%P+E (mean)
Continuous treatment for 23 hours without S9	DMSO	10.0 µL/mL	300	-	0	0.00	-	0.0
	Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])]	93	300	10	0	0.00	-	0.0
		133	300	21	4	1.33	*	0.0
		201	300	49	4	1.33	*	0.0
	Mitomycin C	0.300	42	20	30	71.4	***	0.0
Pulse treatment for 3 hours + 20 hour recovery time without S9	DMSO	10.0 µL/mL	300	-	0	0.00	-	0.3
	Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])]	191	300	19	1	0.33	-	0.0
		273	300	30	1	0.33	-	0.7
		391	300	51	2	0.67	-	2.3
	Mitomycin C	0.500	75	58	30	40.0	***	0.7
Pulse treatment for 3 hours + 20 hour recovery time with S9	DMSO	10.0 µL/mL	300	-	1	0.33	-	0.7
	Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])]	134	300	0	1	0.33	-	1.0
		191	300	0	0	0.00	-	0.7
		273	300	45	3	1.00	-	2.7
	Cyclophosphamide	5.00	69	42	30	43.5	***	0.7

Abbreviations: E = endoreduplicated; GLP = Good Laboratory Practice; RICC = Relative increase in cells counts; P = polyploid.

a Cytotoxicity % = (100 – RICC)

b RICC (%) = [(Increases in number of cells in treated cultures (final-baseline)) / (Increase in number of cells in vehicle control cultures (final – baseline))] x100

* p<=0.05, ** p<=0.01, *** p<=0.001 (Fisher's exact test)

2.6.7.9. Genotoxicity: In Vivo

2.6.7.9A. Treprostinil: In Vivo, Micronucleus

Report Title: Treprostinil sodium [[redacted] sodium (compound [redacted])]: In Vivo Rat Bone Marrow Micronucleus Assay		Test Article: Treprostinil Sodium
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei	Treatment Schedule: two doses	Study Number: 8327890 Located ID 4.2.3.3.2.1
Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD)	Sampling Time: 24 hours after second dosing	GLP Compliance: Yes
Age: 8 weeks	Number of Cells Analyzed/Animal: 4000	Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: Subcutaneous Injection	Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes	
Vehicle/Formulation: Test Article: 15 mM Sodium Citrate and 5 mM Magnesium Chloride, in Sterile Water for injection Positive Control: Deionized (DI) Water		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Number of Animals	Harvest Time (Hours)	Mean % PCE Male	Mean % MNPCE (±SD) Male
Vehicle	1.00 mL/kg	6	24	44.17	0.09 ± 0.05
Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])]	1.25[a]	6	24	47.80	0.09 ± 0.03
	2.50[b]	6	24	46.23	0.08 ± 0.04
	5.00[c]	6	24	46.92	0.24 ± 0.23***[d]
Cyclophosphamide	60.0	6	24	38.91	2.85 ± 0.70***

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; MNPCE = micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE = polychromatic erythrocytes; SD = standard deviation.

[a] Target dose level (Mean Achieved Dose Level = 1.21 mg/kg/day)

[b] Target dose level (Mean Achieved Dose Level = 2.28 mg/kg/day)

[c] Target dose level (Mean Achieved Dose Level = 3.76 mg/kg/day)

[d] Statistical analysis showed that this group was heterogeneous. Wilcoxon Rank Sum test showed that this dose is statistically not significant when outliers were excluded.

*** p<=0.001 (Wilcoxon Rank Sum Test and Grubbs test)

2.6.7.10. Carcinogenicity

No carcinogenicity studies were conducted.

2.6.7.11. Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies

2.6.7.11A. Treprostinil Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies

Species Strain	Route[a]	Dosing Period	Doses (mg/kg/day)	#/Group	Noteworthy Findings	Document ID	Location in CTD
Rat, SD	SC	GD 6 –17	0, 0.1, 0.2, 0.65, 1.3	5F	≤ 1.3 mg/kg: no notable effects on BW, BWG, or FC; no notable effects on any cesarean section parameters or fetal weights and no fetal anomalies; clinical observations consistent with vasodilatory activity (flushing of the extremities and skin) and hypoactivity	8338438	4.2.3.5.2.1
Rabbit, NZW	SC	GD 7 –19	0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4	5F	≤ 0.4 mg/kg: ↓ FC; no notable effects on BW or fetal weights; clinical observations consistent with vasodilatory activity (discolored skin [ears and eyes] and irregular respiration), red discharge in cage pan; ↑ early resorptions (postimplantation loss) ≥ 0.2 mg/kg: clinical observations consistent with vasodilatory activity (flushing of the skin [ears and/or eyes]),	8338439	4.2.3.5.2.3

Abbreviation: # = number; ↓ = decrease; ↑ = increase; BW = body weight; BWG = body weight gain; F = female; FC = food consumption; GD = gestation day; NZW = New Zealand White; SC = subcutaneous injection; SD = Sprague Dawley.

[a] Vehicle = 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride in sterile water for injection

2.6.7.12. Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development

2.6.7.12A. Treprostinil: Male Fertility

Report title: Male Fertility and Toxicokinetic Study in Rats Given Treprostinil Sodium [[redacted]Sodium (Compound [redacted])] Once Daily by Subcutaneous Injection				
Design similar to ICH4.1.1: Yes	Duration of dosing: Males: Once daily during the 28 day premating period and throughout the 2-week mating period Females: Not dosed			Document ID: 8338440 Located ID: 4.2.3.5.1.1
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Day of mating: Gestation Day 0			GLP compliance: Yes
Initial age: 10 weeks at initiation of dosing, and 14 weeks at mating	Day of C-section: Gestation Day 13			Test Article: Treprostinil Sodium
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: subcutaneous injection			
Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection				
Special features: Male fertility only				
No-observed-adverse-effect level:				
F_0 general toxicity:	0.1 mg/kg/day			
F_0 fertility:	0.1 mg/kg/day			
Composite Toxicokinetics				
Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil	Number of animals: 3 males/group/time point		
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily	Assay/Method: LC-MS/MS / 8326664		

Daily Dose (mg/kg)	0.01	0.03	0.1
Toxicokinetics (Day 0)			
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	2.42	8.69	24.9
(SEM)	(0.168)	(0.558)	(0.686)
C_{max} (ng/mL) [2]	3.00	8.68	29.2
(SD)	(0.571)	(1.22)	(1.17)
t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500
Toxicokinetics (Day 28)			
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	2.80	9.96	30.2
(SEM)	(0.310)	(0.257)	(3.07)
C_{max} (ng/mL) [2]	3.79	12.1	41.0
(SD)	(0.940)	(0.379)	(10.4)
t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500

(continued)

2.6.7.12A. Treprostinil: Male Fertility (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
Males	Total number of males	20	20	20	20
	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Clinical observations (n[a])				
	Swollen feet	0	4	20	20
	Discolored feet or legs (red)	0	14	20	5
	Discolored ears (red)	0	18	20	18
	Discolored eyes (red)	0	0	20	20
	Discolored skin/entire body	0	0	20	20
	Irregular respiration	0	0	3	20
	Hypoactive behavior	0	0	0	15
	Rough haircoat	0	0	1	2
	Discolored haircoat (perioral red)	0	0	0	4
	Oral discharge (clear)	0	0	0	9
	Body weight gain, g, (% change[b])				
	Premating Days 0-3	20.4	↓16.2	↓18.1	↓31.9#H
	Premating Days 10-14	16.4	↓3.0	↓14.6	↓28.0*H
	Premating Days 17-21	15.2	↓4.6	↓21.7	↓32.9*H
	Premating Days 24-28	10.6	↓7.5	↓2.8	↓60.4#H
	Premating Days 0-28	134.9	↑0.5	↓0.3	↓20.5+H
	Pairing Days 7-10	9.9	↓1.0	↓19.2	↓62.6+H
	Premating Day 0 – Post Pairing Day 0	165.7	↑1.5	↓2.8	↓22.8+H
	Food consumption, average, Premating Days 0-28, (% change[b])	396.1	↑0.4	↑1.4	↓5.3
	Number of males that mated	20	20	20	20
	Number of fertile males	20	17	20	18
	Mating index (%)	100	100	100	100
	Fertility index (%)	100	85	100	90
	Fecundity Index (%)	100	85	100	90
	Sperm motility (%)/count (Den 10^6 sperm /g)	83/645.8	84/669.3	78/735.5	75/642.6
	Organ weight (% change)	-	-	-	-
	Anatomic Pathology	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.12A. Treprostinil: Male Fertility (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
Females	Total number of females	21	21	20	20
	Pregnant females	20	17	20	18
	Non-pregnant females	1	4	0	2
	Pregnant females with total litter loss	0	1	0	0
	Number of females with live fetuses[c]	20	16	20	18
	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Macroscopic observations	-	-	-	-
	Mean number of live fetuses/litter	15.8	13.9	15.7	15.4
	Mean number early resorptions	0.9	1.1	0.6	0.7
	Mean number late resorptions	0.0	0.0	0.0	0.0
	Mean number corpora lutea/dam	16.9	15.8	17.1	16.8
	Mean number implantation/dam	16.7	14.9	16.3	16.2
	Mean preimplantation loss/litter (%)	1.3	6.1	5.3	3.3

Abbreviations: ↑ = increase, ↓ = decrease, - = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, SD = standard deviation, SEM = standard error of the mean, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] Number of animals.

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

[c] This value represents cesarean section data collected from females that had evidence of mating during the two-week mating period. Non-confirmed females only received a pregnancy status. Live or dead fetal data were not collected from these females.

Mating index % = (Number of males mating with at least 1 female / Number of males cohabitated with at least 1 female) x 100
Fecundity index % = (Number of males impregnating at least 1 female / Number of males mating with at least 1 female) x 100
Fertility Index % = (Number of males impregnating at least 1 female / Number of males cohabitated with at least 1 female) x 100
*H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.05 level
+H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.01 level
#H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.001 level

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

[3] t_{max} for compositecurve.

2.6.7.12B.　Treprostinil: Female Fertility

Report title: Female Fertility and Toxicokinetic Study in Rats Given Treprostinil Sodium [[redacted]Sodium (Compound [redacted])] Once Daily by Subcutaneous Injection				
Design similar to ICH4.1.1: Yes	Duration of dosing: Males: Not dosed Females: Once daily during the 14 day premating period, throughout the mating period through GD 7		Document ID: 8338441 Located ID: 4.2.3.5.1.2	
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Day of mating: Gestation Day 0		GLP compliance: Yes	
Initial age: 12 weeks at initiation of dosing, and 14 weeks at mating	Day of C-section: Gestation Day 13		Test Article: Treprostinil Sodium	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: subcutaneous injection			
Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection				
Special features: Female fertility only				
No-observed-adverse-effect level:				
F_0 maternal toxicity:	0.1 mg/kg/day			
F_0 female fertility:	0.1 mg/kg/day			

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil	Number of animals: 3 females/group/time point	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily	Assay/Method: LC-MS/MS / 8326664	

	Daily Dose (mg/kg)	0.01	0.03	0.1
Females	Toxicokinetics (Day 0)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	2.61	7.95	21.3
	(SEM)	(0.298)	(1.05)	(1.39)
	C_{max} (ng/mL) [2]	2.81	8.23	23.4
	(SD)	(0.515)	(1.92)	(1.70)
	t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500
	Toxicokinetics (GD 7)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	2.74	8.94	21.4
	(SEM)	(0.363)	(1.04)	(2.31)
	C_{max} (ng/mL) [2]	3.26	9.12	27.6
	(SD)	(0.392)	(1.72)	(5.40)
	t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500

(continued)

2.6.7.12B. Treprostinil: Female Fertility (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0	0.01	0.03	0.1
Females	Total number of females	20	20	20	20
	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Clinical observations (n[a])				
	Discolored feet (red)	0	1	6	20
	Discolored ears (red)	0	3	17	20
	Swollen feet	0	0	1	20
	Swollen dose site	0	0	2	2
	Discolored entire body (red)	0	0	7	20
	Hypoactivity	0	0	0	1
	Irregular respiration	0	0	0	17
	Swollen dorsal thorax	0	0	0	1
	Body weight gain, g, (% change)	-	-	-	-
	Food consumption, g, (% change)	-	-	-	-
	Pregnant females	19	20	19	20
	Non-pregnant females	1	0	1	0
	Females with total litter loss	0	0	0	0
	Number of females with live fetuses	19	20	19	20
	Mean number of live fetuses/litter	13.0	14.2	15.3	15.0
	Mean number of early resorptions	1.2	0.7	0.9	0.7
	Mean number of late resorptions	0.0	0.0	0.0	0.0
	Mean number of corpora lutea/dam	14.8	15.2	16.4	16.3
	Mean number of implantations/dam	14.2	14.8	16.3	15.7
	Mean preimplantation loss/litter (%)	4.6	2.3	0.9	4.5
	Macroscopic observations	-	-	-	-
	Mating index (%)	95	100	100	100
	Fertility index (%)	95	100	95	100
	Fecundity Index (%)	100	100	95	100

(continued)

2.6.7.12B. Treprostinil: Female Fertility (concluded)

Abbreviations: - = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, GD = Gestation Day, SD = standard deviation, SEM = standard error of the mean, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] Number of animals.

Mating index % =Mated females / females cohabited (excluding females sacrificed during cohabitation) x 100

Fecundity index % = Pregnant females / mated females (excluding females with an undetermined pregnancy status) x 100

Fertility Index % = Pregnant females / females cohabited (excluding females sacrificed during cohabitation on with an undetermined pregnancy status) x 100

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

[3] t_{max} for composite curve.

2.6.7.13. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development

2.6.7.13A. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat

Report title: Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetics Study in Rats Given Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])] Once Daily by Subcutaneous Injection					
Design similar to ICH4.1.3: Yes		Duration of dosing: Gestation Day 6 through 17		Document ID: 8338442 Located ID: 4.2.3.5.2.2	
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)		Day of mating: Gestation Day 0		GLP compliance: Yes	
Initial age: 10 to 11 weeks		Day of C-section: Gestation Day 21		Test Article: Treprostinil Sodium	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]		Route: subcutaneous injection			
Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection					
Special features: None					
No-observed-adverse-effect level:					
	F_0 maternal toxicity:	0.1 mg/kg/day			
	F_1 embryo-fetal development:	0.1 mg/kg/day			
Composite Toxicokinetics					
Sample: Plasma		Analyte: Treprostinil		Number of animals: 4 females/group/time point	
Feeding condition: Fed		Dose frequency: Daily		Assay/Method: LC-MS/MS / 8326664	
	Daily Dose (mg/kg/day)		0.01	0.03	0.1
Dams	Toxicokinetics (GD 6)				
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]		1.91	6.11	17.8
	(SEM)		(0.142)	(0.521)	(1.66)
	C_{max} (ng/mL) [2]		2.14	7.10	22.3
	(SD)		(0.228)	(1.58)	(6.04)
	t_{max} (h) [3]		0.500	0.500	0.500
	Toxicokinetics (GD 17)				
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]		2.67	7.41	29.8
	(SEM)		(0.241)	(0.527)	(2.08)
	C_{max} (ng/mL) [2]		3.09	8.07	28.3
	(SD)		(0.587)	(1.88)	(2.87)
	t_{max} (h) [3]		0.500	0.500	0.500

(continued)

2.6.7.13A. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat (continued)

	Daily Dose (mg/kg/day)	0	0.01	0.03	0.1
Dams	Total females	26	26	26	26
	Number pregnant	26	26	25	25
	Number nongravid	0	0	1	1
	Number died or euthanized moribund (main)	0	0	0	0
	Number died or euthanized moribund (toxicokinetic)	0	1[a]	0	0
	Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
	Clinical observations (n[b])				
	Irregular respiration	0	7	23	26
	Discolored ears (red)	0	17	2	1
	Discolored feet and/or legs (red)	0	2	0	0
	Discolored skin, entire body (red)	0	14	26	26
	Discolored eyes (dark red)	0	0	9	11
	Swollen feet	0	0	4	8
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Body weight gain, g (% change)	-	-	-	-
	Food consumption, g/rat/day (% change)	-	-	-	-
	Mean number corpora lutea/dam	13.7	13.5	13.3	13.6
	Mean number implantations/dam	12.9	12.8	12.4	12.6
	Preimplantation Loss (%)	5.3	5.2	6.7	7.0
Litters	Number of litters evaluated	26	26	25	25
	Number of in utero deaths/litter (early)	0.3	0.3	0.6	0.2
	Number of in utero deaths/litter (late)	0.0	0.0	0.0	0.0
	Number of live fetuses/litter	12.6	12.5	11.8	12.4
	Postimplantation Loss (%)	2.0	2.0	5.4	1.4
	Fetal weight (grams, gender combined)	5.54	5.38	5.38	5.46
	Fetal sex ratios (% male)	54.2	50.9	44.9	47.9
	Fetal anomalies (number of fetuses [litters])				
	External malformations	-	-	-	-
	Visceral malformations	-	-	-	-
	Skeletal malformations	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.13A. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat (concluded)

Abbreviations: - = no compound-related findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, GD = Gestation Day, SD = standard deviation, SEM = standard error of the mean, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] Rat moribund (general debilitation) and euthanized on GD 13. Rat was confirmed gravid. No notable findings at necropsy.

[b] Number of animals.

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

[3] t_{max} for composite curve.

2.6.7.13B.　Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit

Report title: Embryo-Fetal Developmental Toxicity and Toxicokinetics Study in Rabbits Given Treprostinil Sodium [[redacted] Sodium (Compound [redacted])] Once Daily by Subcutaneous Injection					
Design similar to ICH4.1.3: Yes		Duration of dosing: Gestation Day 7 through 19		Document ID: 8338443 Located ID: 4.2.3.5.2.4	
Species/strain: Rabbit/NZW		Day of mating: 0		GLP compliance: Yes	
Initial age: 8 months		Day of C-section: 29		Test Article: Treprostinil Sodium	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]		Route: subcutaneous injection			
Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection					
Special features: None					
No-observed-adverse-effect level:					
	F_0 maternal toxicity:	0.05 mg/kg/day			
	F_1 embryo-fetal development:	0.4 mg/kg/day			
Toxicokinetics					
Sample: Plasma		Analyte: Treprostinil		Number of animals: 4 females/group	
Feeding condition: Fed		Dose frequency: Daily		Assay/Method: LC-MS/MS / 8337558	

	Dose (mg/kg/day):	0.05	0.14	0.4
Dams	Toxicokinetics (GD 7)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	83.6	197	687
	(SD)	(5.89)	(19.8)	(68.5)
	C_{max} (ng/mL)	30.6	63.2	215
	(SD)	(8.76)	(2.40)	(65.7)
	t_{max} (h)	0.500	0.625	0.625
	(SD)	(0.00)	(0.250)	(0.250)
	Toxicokinetics (GD 19)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL)	58.8	137	370
	(SD)	(3.06)	(18.8)	(49.7)
	C_{max} (ng/mL)	14.9	24.2	81.3
	(SD)	(2.76)	(9.28)	(21.9)
	t_{max} (h)	0.763	1.13	0.750
	(SD)	(0.275)	(0.629)	(0.289)

(continued)

2.6.7.13B. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit (continued)

	Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.05	0.14	0.4
Dams	Total Females	22	22	22	22
	Number pregnant	22	21	21	22
	Number nongravid	0	1	1	0
	Number died or euthanized moribund (main)	0	0	0	3[a]
	Number died or euthanized moribund (toxicokinetic)	0	0	0	1[b]
	Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	1[a]
	Clinical observations (n[c])				
	Irregular respiration	0	0	0	19
	Discolored ears (red)	0	1	22	22
	Discolored nose (red)	0	0	12	20
	Discolored skin, entire body (red)	0	4	22	22
	Discolored eyes (dark red)	0	0	16	6
	Warm to touch	0	0	2	3
	Hypoactive behavior	0	0	0	13
	Few, small, and/or nonformed feces	2	7	8	16
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Body weight gain, g (% change[d])				
	Gestation Days 7-20	186.9	↓41.4+r	↓11.8	↓82.7+r
	Gestation Days 20-29	167.0	↓22.6	↓2.8	↓14.7
	Food consumption, g (% change[d])				
	Gestation Days 7-8	134.5	↓11.7	↓22.0+r	↓44.9#r
	Gestation Days 8-9	131.8	↓15.6	↓19.7*r	↓50.5#r
	Gestation Days 9-10	133.4	↓23.6*H	↓20.4*H	↓44.3#H
	Gestation Days 10-11	136.2	↓20.9+r	↓25.0#r	↓40.8#r
	Gestation Days 11-12	132.0	↓14.7	↓27.5+H	↓45.4#H
	Gestation Days 12-13	126.1	↓17.5	↓20.7	↓45.2#H
	Gestation Days 13-14	125.3	↓11.3	↓21.1	↓44.1#H
	Gestation Days 14-15	125.3	↓15.6	↓20.8	↓42.1#H
	Gestation Days 15-16	127.0	↓15.2	↓24.2*H	↓44.1#H
	Gestation Days 16-17	129.2	↓11.1	↓20.3+r	↓39.0#r
	Gestation Days 17-18	131.9	↓8.7	↓26.5#r	↓36.2#r
	Gestation Days 18-19	136.5	↓9.4	↓15.0#r	↓37.8#r

2.6.7.13B. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit (continued)

	Daily Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.05	0.14	0.4
	Food consumption, g (% change[d]) (continued)				
	Gestation Days 19-20	131.7	↓4.5	↓6.1*r	↓26.3+r
	Gestation Days 20-21	133.3	↓0.9	↓0.8	↓0.9
	Gestation Days 21-22	132.0	↓1.6	↑0.8	↑3.5
	Gestation Days 23-24	120.6	↑6.8	↑14.2*H	↑15.8*H
	Gestation Days 24-25	107.2	↑17.4	↑23.6*H	↑25.5+H
	Gestation Days 25-26	100.2	↑15.1	↑36.0+r	↑32.3+r
	Gestation Days 26-27	96.7	↑19.6	↑34.4+H	↑33.3+H
	Gestation Days 27-28	102.1	↑13.2	↑24.9*H	↑29.3+H
	Gestation Days 28-29	99.9	↓0.9	↑31.1+r	↑36.6#r
	Mean number corpora lutea/dam	10.5	10.0	9.1	9.6
	Mean number implantations/dam	9.4	9.1	8.7	8.6
	Mean preimplantation loss (%)	9.4	10.1	4.9	8.7
Litters	Number of litters evaluated	22	21	21	18
	Number of live fetuses/litter	9.3	8.7	8.4	7.8
	Number of early resorptions/litter	0.0	0.4	0.2	0.4
	Number of late resorptions/litter	0.1	0.1	0.0	0.4
	Number of dead fetuses/litter	0.0	0.0	0.0	0.0
	Mean postimplantation loss (%)	1.2	5.5	3.0	9.0
	Fetal weight (grams, gender combined)	41.3	40.6	42.3	40.2
	Sex ratio (% male)	54.2	48.9	44.8	46.2
	Fetal anomalies (number of fetuses [litters])				
	External malformations	-	-	-	-
	Visceral malformations	-	-	-	-
	Skeletal malformations	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.13B. Treprostinil: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit (concluded)

Abbreviations: ↑ = increase, ↓ = decrease, - = no compound-related findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, GD = Gestation Day, SD = standard deviation, t_{max} = time to maximum concentration.

[a] Three females sacrificed on GD 20, 21, and 28 primarily due to extended periods of low food consumption and/or body weight reductions. One female aborted and was subsequently euthanized on GD 22.

[b] Toxicokinetic animal found dead on the first day of dosing as a result of bleeding trauma replaced. Replacement was dosed and had blood collected at all scheduled TK collection timepoints.

[c] Number of animals.

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

*r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.05 level
+r = Wilcoxon Rank Sum Test Significant at 0.01 level
#r = Wilcoxon rank Sum Test Significant at 0.001 level
*H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.05 level
+H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.01 level
#H = Dunnett Exact Homogeneous Test Significant: 0.001 level

2.6.7.14. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development

Report title: A Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study of [redacted] (Compound [redacted]) by Subcutaneous Injection in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation				
Design similar to ICH4.1.2?: Yes	Duration of dosing: Gestation Day 6 through Lactation Day 20 (F_0 generation dams that delivered a litter) or Gestation Day 24 (F_0 generation dams that did not deliver a litter)			Document ID: 20104727 Located ID: 4.2.3.5.3.1
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Day of mating: 0		GLP compliance: Yes	
Initial age: 76 to 83 days at arrival	Litters culled / not culled: culled		Test Article: Treprostinil Sodium	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: subcutaneous injection			
Vehicle: 15 mM sodium citrate and 5 mM magnesium chloride, in sterile water for injection			Special features: None	
No-observed-adverse-effect level:	F_0 maternal toxicity: 0.1 mg/kg/day			
	F_1 growth and reproduction: 0.1 mg/kg/day			
Composite Toxicokinetics				
Sample: Plasma	Analyte: Treprostinil		Number of animals: 4 females/group/time point	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily		Assay/Method: LC-MS/MS / 8326664	

	Dose (mg/kg):	0.01	0.03	0.1
F_0 females	Toxicokinetics (GD 6)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	2.51	8.17	29.1
	(SEM)	(0.331)	(0.597)	(1.84)
	C_{max} (ng/mL) [2]	3.17	7.67	31.9
	(SD)	(0.372)	(1.38)	(5.50)
	t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500
	Toxicokinetics (LD 20)			
	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng•h/mL) [1]	1.65	6.78	18.7
	(SEM)	(0.155)	(0.654)	(1.90)
	C_{max} (ng/mL) [2]	1.49	6.33	16.8
	(SD)	(0.152)	(1.37)	(2.96)
	t_{max} (h) [3]	0.500	0.500	0.500

(continued)

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
F_0 females	Number pregnant	24	23	24	23
	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
	Clinical observations (Gestation and Lactation)	-	-	-	-
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Gestation Body Weight Change, g (%)[a]				
	GD 6 to 9	17.6	↓5.1	↓2.8	↓15.3
	GD 9 to 12	23.2	↓15.9*	↓21.1**	↓11.2
	GD 12 to 15	21.2	0.0	↑9.0	↓2.4
	GD 15 to 18	40.9	↓0.7	↑0.2	↑0.2
	GD 18 to 21	52.5	↑3.4	↑5.9	↑9.5
	GD 6 to 21	155.9	↓3.1	↑0.1	↓0.8
	Gestation Food Consumption, g (%)[a, b]				
	GD 6 to 9	48.4	↑0.2	↓0.8	↑3.3
	GD 9 to 12	54.3	↓8.7*	↓8.8*	↓9.6*
	GD 12 to 15	55.5	↓7.6	↓6.3	↓7.0
	GD 15 to 18	58.1	↑0.2	↓2.8	↓5.2
	GD 6 to 18	54.8	↓4.6	↓4.6	↓4.7
	GD 18 to 20	28.1	↑2.8	0.0	↑2.1
	Lactation Body Weight (%)	-	-	-	-
	Lactation Body Weight Change (%)	-	-	-	-
	Lactation Food Consumption (%)	-	-	-	-
	Mean duration of gestation (days)	22.5	22.5	22.8	22.9#
	Abnormal parturition	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
F_1 litters	Number of litters evaluated	24	23	24	23
Preweaning	Mean number of implantations	13.7	13.8	14.1	14.6
	Mean number pups/litter	12.5	13.1	13.5	13.9
	Mean number liveborn pups/litter	12.3	13.0	13.4	13.7
	Mean number stillborn pups/litter	0.2	0.1	0.1	0.2
	Number of liveborn pups	283	299	321	316
	Number of litters with stillborn pups	4	2	3	2
	Number Stillborn Pups	5	2	3	4
	Number of total litter losses	1	0	0	0
	Gestation Index[c] (%)	95.8	100.0	100.0	100.0
	Viability Index[d] (%)	99.3	99.6[#]	99.4	98.4
	Lactation Index[e] (%)	100.0	99.4	100.0	100.0
	Number live newborn pups with external anomalies	-	-	-	-
	Pup body weight (grams, gender combined)				
	Newborn (postnatal day 1)	7.2	6.9	7.0	7.2
	Weaning (postnatal day 21)	58.1	56.5	56.6	56.0
	Pup sex ratio on Day 1 (% males)	53.0	52.9	49.6	55.0
	Pup Clinical Observations	-	-	-	-
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
F_1 males	Number evaluated postweaning	23	22	24	23
Postweaning	Number died or euthanized moribund	0	0	0	1[f]
	Clinical observations	-	-	-	-
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Mean Body Weight (%)	-	-	-	-
	Mean Body Weight Change (%)	-	-	-	-
	Mean Food Consumption (%)	-	-	-	-
	Mean Age of Preputial Separation (days)	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Acoustic Startle	-	-	-	-
	Morris Water maze	-	-	-	-
	Mean number days prior to mating	-	-	-	-
	Number of Males that Mated	-	-	-	-
	Number of Fertile Males	-	-	-	-
	Terminal Body Weights	-	-	-	-
	Organ Weights	-	-	-	-
	Ratio (Organ Weights to Terminal Body Weights)	-	-	-	-
	Ratio (Organ Weights to Brain Weights)	-	-	-	-
	Histopathology	-	-	-	-
	Sperm Motility	-	-	-	-
	Sperm Concentration	-	-	-	-
	Sperm Morphology	-	-	-	-

(continued)

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
F_1 females	Number evaluated postweaning	23	23	24	23
Postweaning	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Clinical observations	-	-	-	-
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Mean Premating Body Weight (%)	-	-	-	-
	Mean Premating Body Weight Change (%)	-	-	-	-
	Mean Premating Food Consumption (%)	-	-	-	-
	Mean Gestation Body Weight (%)	-	-	-	-
	Mean Gestation Body Weight Change (%)	-	-	-	-
	Mean Gestation Food Consumption (%)	-	-	-	-
	Mean Age of Vaginal Patency (days)	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Acoustic Startle	-	-	-	-
	Morris Water maze	-	-	-	-
	Terminal Body Weights	-	-	-	-
	Organ Weights	-	-	-	-
	Ratio (Organ Weights to Terminal Body Weights)	-	-	-	-
	Ratio (Organ Weights to Brain Weights)	-	-	-	-
	Mean number of estrous stages interval	-	-	-	-
	Mean number days prior to mating	-	-	-	-
	Number of Females Sperm Positive	-	-	-	-
	Number of Pregnant Females	22	23	23	23
	Mean number corpora lutea	17.0	16.2	17.7	17.2
	Mean Number Implantations	15.3	14.6	16.6	16.7
	Mean % Preimplantation Loss	9.9	10.3	6.3	2.6

(continued)

2.6.7.14A. Treprostinil: Effects on Pre- and Postnatal Development (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
F_2 litters	Mean No. Viable Conceptuses/Litter	14.3	13.4	15.7	15.8
	Mean No. Nonviable Conceptuses/Litter	1.0	1.2	0.9	0.9
	Number of Litters with Nonviable Conceptuses	10	14	11	14
	Number Nonviable Conceptuses	22	27	20	20
	Mean % Postimplantation Loss	6.3	11.5	5.4	5.3

Abbreviations: ↑ = increase, ↓ = decrease, - = no important findings, AUC = area under the plasma concentration-time curve, C_{max} = maximum observed plasma concentration, GD = gestation day, t_{max} = time to maximum concentration.

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

[b] F_0 generation dams were co-housed in solid-bottomed cages through GD 18. On GD 18, F_0 generation dams were individually housed until parturition.

[c] Number of rats with live offspring/number of pregnant rats.

[d] Number of live pups on LD 4/number of live pups on LD 1.

[e] Number of live pups on LD 21 (weaning)/number of live pups on LD 4.

[f] F_1 generation male 7042 in the 0.1 mg/kg/day maternal dose group was found dead on Day 63 postpartum. There were no clinical signs for this animal prior to death. This animal gained body weight throughout the postweaning observation period. There were no macroscopic or microscopic lesions. A cause of death could not be determined. This death represented a single spontaneous mortality among the F_1 generation rats and was considered unrelated to maternal treatment with treprostinil.

* Significant at $p \leq 0.05$ (Dunnett's)

** Significant at $p \leq 0.01$ (Dunnett's)

Significant at $p \leq 0.05$ (Dunn's)

Note: For this study, a composite $AUC_{(0\text{-}24h)}$ was calculated across multiple rats.

[1] Composite AUC.

[2] Mean of treprostinil concentrations at t_{max} for composite curve.

[3] t_{max} for composite curve.

2.6.7.15. Studies in Juvenile Animals

No studies in juvenile animals were conducted.

2.6.7.16. Local Tolerance

2.6.7.16A. LY900014 (Insulin lispro, Treprostinil): Local Tolerance

Report title: A Repeat-Dose Tolerability Study in Male Rats Given Humalog® and Remodulin® Alone or in Combination Once Daily by Subcutaneous Injection for 2 Weeks					
Species/strain: Rat/ Crl:CD(SD)	Duration of dosing: 2 weeks			Test articles: LY900014 (insulin lispro and treprostinil) [a]	
Initial age: 6 to 7 weeks	Route: subcutaneous injection			Document ID: 8330849 Located ID: 4.2.3.6.1	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Vehicle control: [redacted] mM magnesium chloride, [redacted] % Poloxamer 188, [redacted] mM sodium citrate, and [redacted] mM zinc chloride			GLP compliance: Yes	
NOAEL: >[redacted] U/kg Humalog + [redacted] ng/kg Remodulin					
Special features: Draize dermal irritation scoring of injection sites					
Daily Dose (U insulin lispro/kg/ ng treprostinil/kg)[b]	0/0 (Control)	0/[redacted] (treprostinil)	[redacted]/0 (insulin lispro)	[redacted]/[redacted] (insulin lispro and treprostinil Low Dose)	[redacted]/[redacted] (insulin lispro and treprostinil High Dose)
Sex:Number of Animals	M:5	M:5	M:5	M:5	M:5
Noteworthy Findings					
Died or euthanized moribund	0	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-	-
Body weight	-	-	-	-	-
Food consumption	-	-	-	-	-
Dermal Irritation Scoring	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-

Abbreviations: - = no important findings; M = male

[a] Humalog and Remodulin

[b] For Groups 1, 2, 3, and 5, the dose volume was [redacted] mL/kg. Group 4 was given a dose volume of [redacted] mL/kg. Combinations were formulated to mimic extemporaneous pharmacy preparations and given as a single injection/day.

2.6.7.17. Other Toxicity Studies

2.6.7.17A. Treprostinil: Other Toxicity Studies

Species Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	#/Group	Noteworthy Findings	Document ID	Location in CTD
Dermal irritation							
Rat, SD	Dermal	24 hours	2140	5M/5F	One female was found dead on Day 1 prior to exposure completion. Two females were noted with clinical signs of cold to the touch, decreased activity, and/or dehydration. Dermal irritation consisting of very slight to moderate erythema (Grade 1 to 3) was observed in males and females. Sporadic barely perceptible edema (Grade 1), pinpoint/focal eschar, and skin flaking were also observed. Complete resolution of the dermal irritation occurred by study termination. Treprostinil is considered to have limited toxicity, with a potential for dermal irritation.	20085992	4.2.3.7.7.1
Ocular irritation							
Bovine eyes (corneas)	in vitro	4 hours	0.75 ml of 20% Treprostinil suspension	NA	Severe irritant	15AI00.350055	4.2.3.7.7.2

Abbreviations: # = number, F = female, M = male, NA = not applicable, SD = Sprague Dawley.