アロカリス点滴静注　235 mg

第 2 部（モジュール 2）:
CTD の概要（サマリー）

2.6.6　毒性試験の概要文

大鵬薬品工業株式会社

目次

目次 2
略号一覧表 4
2.6.6　毒性試験の概要文 5
2.6.6.1　まとめ 5
2.6.6.2　単回投与毒性試験 10
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 10
2.6.6.3.1　Non-Pivotal 試験（用量設定試験） 10
2.6.6.3.2　Non-Pivotal 試験におけるトキシコキネティクス評価 13
2.6.6.3.3　Pivotal 試験 14
2.6.6.3.4　Pivotal 試験におけるトキシコキネティクス評価 15
2.6.6.4　遺伝毒性試験 17
2.6.6.4.1　*In vitro 試験* 17
2.6.6.4.2　*In vivo 試験* 19
2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 19
2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 19
2.6.6.6.1　ラットを用いた試験 19
2.6.6.6.2　ウサギを用いた試験 23
2.6.6.7　新生児を用いた試験 24
2.6.6.8　局所刺激性試験 24
2.6.6.8.1　ヒト，イヌ及びラット全血を用いた安定性試験（NETU-10-13） 24
2.6.6.8.2　ラットを用いた 1 週間静脈内投与による忍容性確認試験（NETU-09-08） 25
2.6.6.8.3　ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与による忍容性確認試験（NETU-10-05） 25
2.6.6.8.4　ウサギを用いた静脈内，傍静脈及び動脈内投与による忍容性確認試験（PNET-14-12） 25
2.6.6.8.5　ウサギを用いた急性皮膚刺激性試験（PNET-13-44） 26
2.6.6.8.6　モルモットを用いた皮膚感作性及びマキシマイゼーション試験（PNET-13-46） 26
2.6.6.8.7　ウシ角膜を用いた眼腐食性，刺激性及び透過性確認試験（PNET-13-65） 27
2.6.6.8.8　ヒトのヘパリン加血を用いた *in vitro* 溶血性試験 （NETU-09-18） 27
2.6.6.9　その他の毒性試験 27
2.6.6.9.1　抗原性試験 27
2.6.6.9.2　光毒性試験 28
2.6.6.10　考察及び結論 28

2.6.6.11　図表..... 29
2.6.6.12　参考文献..... 29

表一覧

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要 5

略号一覧表

略号	内容
AUC	Area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours：投与 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to time infinity：投与 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to t hours：投与 0 時間から t 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
CL	Clearance：クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
hERG	Human ether-a-go-go related gene：ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
IA	Intr-arterial：動脈内
IC_{50}	Half maximal (50%) inhibitory concentration : 50%阻害濃度
IP	Intraperitoneal：腹腔内
IV	Intravenous：静脈内
M1	Metabolite M1; Desmethyl derivative of NETU：代謝物 M1；NETU の脱メチル体
M2	Metabolite M2; N-oxide derivative of NETU：代謝物 M2；NETU の N-オキシド体
M3	Metabolite M3; Hydroxy-methyl derivative of NETU：代謝物 M3；NETU のヒドロキシメチル体
MTD	Maximum tolerable dose：最大耐量
NOAEL	No observed adverse effect level：無毒性量
NOEL	No observed effect level：最大無作用量
PV	Paravenous：傍静脈
QSAR	Quantitative Structure - Activity Relationship：定量的構造活性相関
S9	Supernatant fraction obtained from an organ homogenate：臓器ホモジネートから得られた上清画分
SC	Subcutaneous：皮下
$T_{1/2}$	Terminal elimination half-life：消失半減期
T_{max}	Time of the maximum plasma concentration：最高血漿中濃度到達時間
TK	Toxicokinetics：トキシコキネティクス
V_z	Distribution volume in the terminal phase：消失相における分布容積

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

Pro-NETU（ホスネツピタント塩化物塩酸塩，以下，本剤）を用いた毒性試験概要を表 2.6.6.1-1 に示した.

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要

Title /Study No	Species (No sex /group) /System	Route	Duration	Doses (mg/kg/day)/ Concentrations	GLP
Repeated dose toxicity studies					
Preliminary Intravenous Toxicity Study in Rats (PNET-11-06)	Han Wistar rat Phase 1 (1M+1F) Phase 2 (3M+3F) Phase 3 (5M+5F)	IV	Phase 1: single dose Phase 2: single dose Phase 3: 14-day	Phase 1: 11.90, 35.68, 71.36, 107.05 Phase 2: 71.36 Phase 3: 0, 11.90, 35.68, 71.36	No
2-Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2-Week Recovery Period (PNET-11-21)	Han Wistar rat (10M+10F) Recovery: control and high dose group (5M+5F)	IV	14-day (plus 14-day recovery)	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes
Preliminary Intravenous Toxicity Study in Dogs (PNET-11-07)	Beagle dog Phase 1 (1M+1F) Phase 2 (2M+2F)	IV	Phase 1: 3-4 days Phase 2: 14-day	Phase 1: 3.57, 11.90, 23.78, 35.68 Phase 2:0, 23.78	No
2-Week Intravenous Toxicity Study in Dogs Followed by a 2-Week Recovery Period (PNET-11-22)	Beagle dog (3M+3F) Recovery: control and high dose group (2M+2F)	IV	14-day (plus 14-day recovery)	0, 1.19, 3.57, 11.90	Yes
4-Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2-Week Recovery Period (PNET-13-18)	Han Wistar rat (10M + 10F) Recovery: control and high dose group (5M+5F) TK groups: 3M+3F control group, 12M+ 12F treatment groups	IV	28 days (plus 14- day recovery)	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要（続き）

Title /Study No	Species (No sex /group) /System	Route	Duration	Doses (mg/kg/day)/ Concentrations	GLP
Repeated dose toxicity studies					
4- Week Intravenous Toxicity Study in Dogs with a 2-Week Treatment-free Period (PNET-13-27)	Beagle dog (3M+3F) Recovery: control and high dose group (2M+2F)	IV	28 days (plus 14-day recovery)	0, 1.19, 3.57, 11.90	Yes
Genotoxicity studies					
Ames Test (PNET-12-04)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 4520 µg/plate	Yes
Ames Test (PNET-15-36)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 4520 µg/plate	Yes
Ames Test (PNET-15-86)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 5000 µg/plate	Yes
Ames Test (PNET-16-08)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 5000 µg/plate	Yes
Ames Test (PNET-16-09)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 3000 µg/plate	Yes
Ames Test (PNET-16-55)	*In-vitro*	N.A	N.A	Up to 2000 µg/plate	Yes
Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes (PNET-12-05)	*In-vitro*: cultured human lymphocytes	N.A	N.A.	3.53 to 452 µg/mL	Yes
Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes (PNET-15-37)	*In-vitro*: cultured human lymphocytes	N.A	N.A	1.76 to 904 µg/mL	Yes
In vivo Micronucleus Assay (PNET- 13-49)	Sprague-Dawley (SD) rat	IV	Preliminary: 2 days repeat dose Main phase: 2 days repeat dose	Preliminary: 31.7, 47.6, 71.3, 107.0 Main study: 26.8, 53.5, 107.0	Yes
Reproductive and developmental toxicity studies					
Intravenous Fertility and Early Embryonic Development in Rats (PNET-13-64)	Han Wistar rat/ (24F + 24M)	IV	Repeat-dose 4 weeks premating plus mating period.	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes
Preliminary Intravenous Embryofoetal Development in Rats (PNET- 13-33)	Han Wistar rat/ (6F)	IV	Repeat-dose: Day 6 through Day 17 *post coitum*.	0, 11.90, 35.68, 71.36	No
Intravenous Embryo-foetal Development in rats (PNET-13-56)	Han Wistar rat / (24F)	IV	Repeat-dose: Day 6 through Day 17 *post coitum*.	0, 3.57, 11.90, 35.6	Yes

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要（続き）

Title /Study No	Species (No sex /group) /System	Route	Duration	Doses (mg/kg/day)/ Concentrations	GLP
Reproductive & Developmental Toxicity studies					
Intravenous Screening Study in Rabbits (PNET-13-30)	New Zealand White Rabbits/ (3F)	IV	Phase 1 & 2: repeat-dose 3 days Phase 3: Repeat-dose 4 days Phase 4: Repeat-dose 14 days	Phase 1: 3.57 Phase 2: 11.9 Phase 3: 22.6 Phase 4: 45.2	No
Preliminary Intravenous Embryo-foetal Development in rabbits (PNET-13-53)	New Zealand White rabbits/ (6F)	IV	Repeat-dose: from Day 6 through Day 19 *post coitum*	0, 11.3, 22.6, 45.2	No
Intravenous Embryo-foetal Development in rabbits (PNET-13-71)	New Zealand White rabbits/ (20F)	IV	Repeat-dose: from Day 6 through Day 19 *post coitum*	0, 2.83, 5.65, 11.3	Yes
Intravenous Pre- and Postnatal Toxicity Study in Rats, Including Maternal Function (PNET-15-85)	Han Wistar rat/ (24F)	IV	Repeat-dose: from implantation (Day 6 *post coitum*) through weaning (Day 20 *post partum*).	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes
Local Tolerance/Irritation/Sensitization/Anaphylaxis					
Blood Stability (NETU-10-13)	Human, Dog and Rat Whole Blood	*In vitro*	~ 240 minutes	500 ng/mL	No
1-week IV Local Tolerance Study (NETU-09-08)	Sprague Dawley/ (4F)	IV infusion	7-day repeat-dose	0.9 mg/mL in a volume of 2 mL/rat/day = 1.81 mg	No

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要（続き）

Title /Study No	Species (No sex /group) /System	Route	Duration	Doses (mg/kg/day)/ Concentrations	GLP
Local Tolerance/Irritation/Sensitization/Anaphylaxis					
2-week IV (Bolus) Local Tolerance Study Using Different Formulations and Two Prodrugs (NETU-10-05)	Sprague Dawley/ (4F)	IV bolus	14-day repeat	0.9 mg/mL in a volume of 2 mL/rat/day = 1.81 mg Formulation 1: NETU HCl in 10% Captisol and 8% Solutol HS 15 Formulation 2: NETU HCl in 10% Captisol and 8% Tween 80 and Formulation 3: NETU HCl in 40% Ethanol and 8% Tween 80.	No
Intravenous, Paravenous and Intrarterial Tolerance Study in Rabbits (PNET-14-12)	New Zealand White rabbits/ (4M)	IV, PV, IA.	Single dose	IV = 0.5 mL of 11.75 mg/mL IA = 0.5 mL of 11.75 mg/mL PV = 0.2 mL of 11.75 mg/mL	Yes
Acute Dermal Irritation Study in Rabbits (PNET-13-44)	New Zealand White rabbit/ (3F)	Dermal application	Single application (4 hr contact)	11.75 mg/mL	Yes
Delayed Dermal Sensitisation Study in Guinea pigs (Magnusson and Kligman Test) (PNET-13-46)	Dunkin-Hartley Guinea pigs/ (10F control group, 20F treatment group)	Induction 1: ID. Induction 2: Dermal application Challenge: Dermal application	Induction 1: single ID. injection Induction 2: single dermal application Challenge: Single dermal application	Induction 1: 20% 11.75 mg/mL with Freund´s complete adjuvant Induction 2: 100% 11.75 mg/mL Challenge: 100% 11.75 mg/mL	Yes
Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay (PNET-13-65)	*Ex-vivo*: Bovine corneas/ (3 per group)	N.A.	N.A	11.75 mg/mL	Yes
In vitro Hemolysis (NETU-09-18)	Human heparinized blood	*In vitro*	10 minutes	452, 362, 271, 226, 181, 113, 57.4, 28.2, 14.0, 7.1 µg/mL	No

表 2.6.6.1-1　本剤を用いた毒性試験概要（続き）

Title /Study No	Species (No sex /group) /System	Route	Duration	Doses (mg/kg/day)/ Concentrations	GLP
Other Toxicity Study					
Active Systemic Anaphylaxis Study in Guinea pigs (PNET-14-10)	Dunkin-Hartley Guinea pigs / (5M)	Induction: IP. Challenge: IV	Induction: repeat dose for 7-day Challenge: single iv dose	Induction: 47.0 mg/kg/day Challenge: 11.75 mg/kg/day	Yes
Passive Cutaneous Anaphylaxis Study in Guinea pigs (PNET-14-11)	Dunkin-Hartley Guinea pigs / (4M)	Induction: SC Anaphylactic antibodies assay: ID Challenge: IV	Induction: Repeat-dose, once weekly for 3 weeks. Anaphylaxis assay: single ID. Challenge: single IV	Induction: 29.4 mg/kg/day Challenge: 11.75 mg/mL	Yes
BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity assay (PNET-13-66)	*In vitro*: Balb/c 3T3 cells	N.A.	N.A.	904, 452, 226, 113, 56.5, 28.3, 14.1, 7.1 µg/mL.	Yes

HEK= human embryonic kidney cells, M= males, F= females, IV= intravenous, SC= subcutaneous, ID= intradermal
PV= paravenous, IA= intra-arterial, N.A= not applicable, TK= toxicokinetics

反復投与毒性試験

認められた主な毒性変化は，ラットを用いた本剤の 2 週及び 4 週間反復投与毒性試験の 35.68 mg/kg/day 群の雌雄でみられた肝細胞の軽度な小葉中心性肥大であった．また 4 週間反復投与試験においては，肝細胞の小葉中心性肥大に関連した細胞質の好酸性の増加が用量依存的に認められ，その程度は 35.68 mg/kg/day 群の雄では中等度，11.90 mg/kg/day 群の雄及び 35.68 mg/kg/day 群の雌では軽度であり，この変化は肝臓重量の増加に相関していた．しかしながら，これらの組織学的変化は，壊死や炎症といった変化を伴っておらず，毒性学的に意義はないと判断された．

遺伝毒性試験

本剤の遺伝毒性試験として，Ames 試験，染色体異常試験及び小核試験を実施し，いずれの試験においても本剤は遺伝毒性を示さないことが確認された．

その他，遺伝毒性不純物に関する検討及び Ames 試験を実施した．

生殖発生毒性試験

本剤はラットの受胎能に影響を及ぼさなかった．

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では，35.68 mg/kg/day 群で後肢の異常回転肢，胎児の死亡及び骨格検査における恥骨の未骨化が認められ，無毒性量（NOAEL）は 11.90 mg/kg/day であった．ウサギでは，5.65 及び 11.3 mg/kg/day 群で有意な吸収胚及び死亡胎児数の増加が認められ，NOAEL は 2.83 mg/kg/day であった．

ラットを用いた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は，35.68 mg/kg/day 群の母体（F0 の雌）に体重及び摂餌量の減少がみられ，同腹仔体重及び平均仔体重の低下及びそれに伴う仔の損失の増加と離乳前身体発達の軽度遅延が認められた．F2 世代には，体重に関連する影響は認められなかった．よって，出生前及び出生後の発達に関する F0 世代及び F1 世代の NOAEL は 11.90 mg/kg/day と考えられた．繁殖成績は雌雄ともに影響はなかった．

局所忍容性に関する試験

ヒト全血を用いた溶血性試験において溶血は観察されず，ラットを用いた反復投与による局所忍容性試験において本剤の良好な忍容性が確認された．ウサギを用いた静脈内，動脈内及び傍静脈投与による忍容性試験では，傍静脈投与において軽度の所見がみられたものの良好な忍容性が確認された．ウシ角膜を用いた眼刺激性試験，ウサギを用いた急性皮膚刺激性試験のいずれにおいても本剤は刺激性を示さなかった． モルモットを用いた遅延性皮膚感作性試験において本剤は遅発性皮膚感作性を示さなかった．

その他の毒性試験

光毒性試験において，Photo-irritation factor は 2.50，Mean Photo Effect は 0.288 であったことから，OECD ガイドラインの基準に基づき本剤は光毒性物質に分類された [1]．

モルモットを用いた能動的及び受動的アナフィラキシー試験で抗原性は認められなかった．

2.6.6.2　単回投与毒性試験

本剤における単回投与毒性試験は実施していない．

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1　Non-Pivotal 試験（用量設定試験）

2.6.6.3.1.1　ラットを用いた静脈内投与予備試験（PNET-11-06）

本剤をラットの静脈内に投与し，本剤の毒性を検討した．試験は 3 フェーズに分割して実施され，第 1 フェーズは予備フェーズとして本剤 11.90，35.68，71.36 mg/kg/day 及び 107.05 mg/kg/day を雌雄 1 例ずつ単回投与，第 2 フェーズは確認フェーズとして本剤 71.36 mg/kg/day を雌雄 3 例ずつ単回投与，最終的に第 3 フェーズで，本剤 0（媒体），11.90，35.68 及び 71.36 mg/kg/day を雌雄 5 例ずつに 2 週間反復投与した．

当該試験では，一般症状，体重，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，器官重量及び剖検が実施された．

第 1 フェーズでは 107.05 mg/kg/day 群で投与直後に 1 例が死亡した．死亡前には痙攣が観察された．第 2 フェーズでは，71.36 mg/kg/day の用量まで死亡例は認められなかった．第 3 フェーズでは，11.90 mg/kg/day 群の 1 例が投与 2 日に死亡したが死因は確定できなかった．また，35.68 mg/kg/day 群の 1 例では，尾に潰瘍が認められたため，投与 7 日に安楽殺した．

第 1 フェーズにおいて，107.05 mg/kg/day 群の 1 例で，軽度な立毛と頻回呼吸が認められた．第 2 フェーズでも同様に，71.36 mg/kg/day 群の雌雄に投与後 1 時間から 4 時間までの間に立毛が認められた．第 3 フェーズでは，71.36 mg/kg/day 群に投与初日より 3 日間，投与直後の嗜眠，呼吸困難及び腹臥姿勢が認められた．これらの症状は，その後の観察期間で消失した．更に，71.36 mg/kg/day 群の一部では，痂皮，擦傷，尾部の潰瘍及び尾先端部の欠損が観察された．

71.36 mg/kg/day 群の両性において，投与 8 日から体重減少及び摂餌量減少が観察された．血液学的，血液生化学的及び尿検査では，投与期間中の毒性変化は認められなかった．71.36 mg/kg/day 群の雌雄で，肝臓の絶対及び/又は相対重量のわずかな増加が認められた．投与期間終了時の体重は，同系統及び週齢の正常範囲内であった．

以上より，本剤の 11.90 及び 35.68 mg/kg/day の用量における静脈内反復投与では毒性学的な変化は認められなかった．71.36 mg/kg/day の用量では軽度な体重減少と軽度な肝臓重量の増加及び投与部位の変化が認められた．

2.6.6.3.1.2　　ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与毒性試験（PNET-11-21）

本剤 0（媒体），3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day をラットの静脈内に 2 週間反復投与し，本剤の毒性を検討した．各群，雌雄それぞれ 10 例のラットで構成され，回復群として 2 週間の回復期間で媒体群及び 35.68 mg/kg/day 群に雌雄それぞれ 5 例を設定した．更に，トキシコキネティクス測定のためのサテライト群を設定した．

検査として，一般症状，体重，摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，剖検，器官重量測定，病理組織学的検査及びトキシコキネティクス測定を実施した．

サテライト群において，35.68 mg/kg/day 群の雄が投与 3 日に死亡したが，死因は不明であった．

一般症状として，媒体群を含む投与群の数例で投与部位の痂皮，擦傷及び尾部の潰瘍が認められた．回復期間中に投与部位の症状は軽減していた．

11.90 mg/kg/day 群と 35.68 mg/kg/day 群の雄ラットにおいて，軽度な体重減少が認められた．回復期間では，雌雄の 35.68 mg/kg/day 群とも媒体群と同様の体重増加を示した．雌雄の 35.68 mg/kg/day 群において有意な摂餌量減少が認められたが，回復期間中に摂餌量の変化は認められなかった．眼科学的検査においては，特記すべき毒性変化は認められなかった．

血液学的検査では，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群の多数の雌において，好中球，単球，好塩基球及び好酸球の減少ないし増加及びペルオキシダーゼ陰性大型細胞の明らかな増加が認められた．これらの変化は，回復期間終了後には認められなかった．更に，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群の雌では，アラニンアミノトランスフェラーゼ，コレステロール及び血中タンパクの増加，総ビリルビン，グルコース及び尿素の減少が観察された．35.68 mg/kg/day 群の雄でクレアチニンの増加が観察された．これらの血液生化学的検査所見は，本剤との関連性を否定することはできないものの，明確な有害作用ではないと考えられた．回復期間終了後も特記すべき有害作用は認められなかった．

尿検査では，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群の雄にケトン尿の増加，全用量群の雌にタンパク尿の増加が観察された．回復期間終了後，これらの変化は認められなかった．

雌雄とも投与期間終了時の体重に変動はなかった．35.68 mg/kg/day 群の雌雄で肝臓重量の増加が認められ，後述する病理組織学的変化との相関性が認められた．

回復期間終了後，35.68 mg/kg/day 群の雌で肝臓重量に軽度な増加が認められたが，雄では軽度の減少が認められた．

トキシコキネティクス評価は第 2.6.6.3.2 項に示した．

剖検時の肉眼観察では，投与起因性変化は認められなかった．病理組織学的検査では，35.68 mg/kg/day 群の雌雄で，肝臓における細胞質の好酸性増加を伴う小葉中心性肥大が認められた．この変化は，肝臓重量の増加と相関していた．その他の観察されたすべての変化は，媒体群

及び投与群で同様の発生率を示したため，投与手技に関連したもの，又は偶発性変化であると判断した．回復期間終了後の検査では本剤に起因する変化は認められなかった．

以上より，本剤 3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day をラットに 2 週間反復静脈内投与した際の主な毒性変化は，35.68 mg/kg/day 群で認められた肝臓への影響であった．この変化は，2 週間の回復期間による回復性が確認された．なお，本剤の投与部位に投与起因性病変は認められず，本剤の良好な局所忍容性が示唆された．全身的影響に対する NOAEL は 11.90 mg/kg/day，局所的影響に対する NOAEL は 35.68 mg/kg/day 以上と考えられた．

2.6.6.3.1.3　　イヌを用いた静脈内投与予備試験（PNET-11-07）

本剤の反復静脈内投与時の毒性をイヌで 2 フェーズ構成の試験で検討した．第 1 フェーズは，最大耐量（MTD）を定義するために設定され，雌雄 1 頭ずつに 3～4 日間連続で漸増用量にて投与した．その結果を基に，雌雄 2 頭ずつに 2 週間反復投与する第 2 フェーズの用量を決定した．

第 1 フェーズの用量は，初回投与量を 3.57 mg/kg/day として，11.90，23.78 及び 35.68 mg/kg/day までの漸増用量とした．第 2 フェーズの用量選択判断のために，血液学的及び血液生化学的検査を各用量で実施した．第 1 フェーズで得られた結果に基づき，第 2 フェーズの用量は 23.78 mg/kg/day に決定した．

第 2 フェーズの検査として，一般症状，体重，摂餌量，身体検査，血液学的検査，凝固検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した．

死亡例はなく，毒性学的に意義のある一般症状は雌雄ともに観察されなかった．23.78 mg/kg/day 群の雌雄にわずかな体重減少が観察された．投与群では投与期間中に摂餌量の減少（雄で最大 60%，雌で最大 80%）が観察されたが，媒体群もまた摂餌量の 40%までの減少が観察された．

身体検査，血液学的検査，凝固検査，血液生化学的検査，尿検査及び器官重量に毒性変化は観察されなかった．

肉眼所見では，投与部位の皮下組織に赤色から暗赤色調の領域が認められた．盲腸粘膜の赤色調が，第 1 フェーズの 1 例，及び媒体群を含む第 2 フェーズのほとんどの動物で認められた．

イヌでの第 1 フェーズにおける体重及び摂餌量への影響から，35.68 mg/kg/day の用量が MTD と考えられた．23.78 mg/kg/day での 2 週間反復静脈内投与では，雌雄に摂餌量減少に関連したわずかな体重減少が認められた．剖検時，媒体群を含む投与群の複数例に，投与部位の皮下組織に赤色から暗赤色調の領域が認められた．

2.6.6.3.1.4　　イヌを用いた 2 週間反復静脈内投与試験（PNET-11-22）

本剤 0（媒体），1.19，3.57 及び 11.90 mg/kg/day をイヌに 2 週間反復静脈内投与し，本剤の毒性を検討した．各群，雌雄それぞれ 3 例で構成され，媒体群と 11.90 mg/kg/day 群に，2 週間の回復期間で雌雄それぞれ 2 例を設定した．更に，本剤，ネツピタント（NETU）及びその代謝物 M1；NETU の脱メチル体（M1），代謝物 M2；NETU の N-オキシド体（M2）及び代謝物 M3；NETU のヒドロキシメチル体（M3）のトキシコキネティクス測定を実施した．

一般症状，体重測定，摂餌量，摂水量，身体検査，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査，凝固検査，血液生化学検査，尿検査，便検査，トキシコキネティクス測定，剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した．

一般症状，摂水量，便検査，身体検査及び眼科学的検査における本剤の影響はなかった．

11.90 mg/kg/day 群の雄 1 例において体重減少が認められ，雌では媒体群を含む全群にわずかな体重の減少が認められたが，回復期間を通じて雌雄とも媒体群と同等の体重推移であった．投与第 1 週から 3.57 及び 11.90 mg/kg/day 群の雄で，摂餌量のわずかな減少が観察されたが，雌では投与に起因する摂餌量の変化は観察されず，雌雄とも回復期間を通じて摂餌量に影響はみられなかった．

心電図検査において，投与に起因する異常所見は認められなかった．一部，投与 2 週における投与直後，雄の 11.90 mg/kg/day 群において QT 間隔及び QRS 群に有意差がみられたが，心電図検査データはすべて生理学的基準内に留まり，補正 QT 間隔に有意な変動はみられなかった．

血液学的及び凝固系パラメータに変化は認められず，血液生化学的検査でも，毒性学的意義のある変化は認められなかった．雄の一部に尿量減少が認められたが，用量依存性は認められず，その他関連する変化が認められなかったため，この所見は偶発性変化であると考えられた．

剖検時体重及び器官重量において，顕著な変動は観察されず，投与に起因した肉眼的及び組織学的所見は認められなかった．回復期間終了後も同様に投与起因性の肉眼的変化は認められなかった．

トキシコキネティクス測定より，本剤は投与後速やかに NETU に代謝されることが示された．また，M1 の蓄積性及び M2 と M3 のわずかな蓄積性が示唆された（第 2.6.6.3.2 項）．

以上より，全身性及び局所影響の NOAEL は 11.90 mg/kg/day であると考えられた．

2.6.6.3.2　Non-Pivotal 試験におけるトキシコキネティクス評価

2.6.6.3.2.1　ラットを用いた 2 週反復静脈内投与毒性試験（PNET-11-21）

本剤のトキシコキネティクスについて，雌雄ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験にて 3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day の用量で評価した．トキシコキネティクスデータにより，全動物が本剤，NETU 及びその代謝物 M1，M2，M3 に曝露することが示された．

Pro-NETU /NETU の血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）比は，すべてのグループで 5%未満であり，本剤が NETU に速やかに代謝されたことが明らかとなった．

すべての動物は NETU に曝露されていたが，雌の曝露が雄よりも高い傾向にあった．

また，すべての用量群において NETU の血漿中での蓄積が示唆された．同様に代謝物についても，3.57 mg/kg/day 群の M2 を除いてすべての用量群における血漿中の蓄積性が示唆された．

2.6.6.3.2.2　イヌを用いた 2 週間反復静脈内投与試験（PNET-11-22）

本剤，NETU 及びその代謝物 M1，M2，M3 のトキシコキネティクスについて，1.19，3.57 及び 11.90 mg/kg/day の用量で実施されたイヌを用いた 2 週間反復投与試験にて評価した．

本剤の投与 0 時間から最終濃度検出時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC_{last}）と最高血漿中濃度（C_{max}）の値は，用量依存性に増加した．本剤の短い半減期（$T_{1/2}$）から（平均 $T_{1/2}$ < 1.5 時間）は，本剤は NETU に速やかに代謝されることが示された．本剤の反復投与による蓄積性はみられなかった．

一方で，本剤の 2 週間反復投与後，NETU の $T_{1/2}$ と AUC_{last} は投与初日よりも高値となり，反復投与後の NETU の蓄積が示唆された．C_{max} に顕著な変化はなかった．

本剤の代謝物 M1 について，投与初日及び反復投与後における M1 の蓄積が確認された．

代謝物 M2 及び M3 は，代謝物 M1 の曝露よりも低値であったが，代謝物 M2 と M3 ともに蓄積性があると考えられた．

以上より，すべての投与群における本剤の曝露が確認され，本剤が NETU へ速やかに代謝されること，NETU，代謝物 M1 の蓄積と代謝物 M2 及び M3 のわずかな蓄積が認められた．

2.6.6.3.3 Pivotal 試験

2.6.6.3.3.1 ラット 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験（PNET-13-18）

ラットにおける本剤の毒性について，4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験により毒性及び回復性について評価した．

3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day の用量で，各用量群に雌雄それぞれ 10 例，回復群として媒体群及び 35.68 mg/kg/day 群のみに雄雌それぞれ 5 例を設定した．更にトキシコキネティクス測定のサテライト群を設定した．

検査として，一般症状，体重，摂餌量，摂水量，眼科学的検査，血液学的検査，凝固検査，血液生化学的検査，トキシコキネティクス測定，剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した．

35.68 mg/kg/day 群の雌 1 例と媒体群の雄 1 例が死亡したが，死因は不明であった．更に，サテライトの 35.68 mg/kg/day 群の雄 1 例が安楽殺されたが剖検は行われなかった．

一般症状として，尾部の痂皮が 35.68 mg/kg/day 群の雌雄で観察された．35.68 mg/kg/day 群の一部の雌では回復期間にも痂皮が認められた．

35.68 mg/kg/day 群で摂餌量のわずかな減少が観察されたが，回復期間中に摂餌量の変化はなかった．

体重，摂水量，眼科学的検査及び尿検査に関連する変化は観察されなかった．

血液学的検査において認められた軽微な変化は，用量依存性がなく，雌雄一貫した変化ではなかったため，投与起因性変化ではないと判断した．なお，回復期間終了後も有意な変化は認められなかった．凝固系パラメータに関連する変化は認められなかった．

血液生化学検査において，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群にビリルビンの低値が認められ，35.68 mg/kg/day 群では回復期間終了時にも雌雄ともに低値が認められたが，低値であるため毒性学的意義のない変化と判断した．35.68 mg/kg/day 群の雌でコレステロールの増加がみられたが，雄には認められていないことから投与起因性変化ではないと判断した．雄におけるナトリウムの増加とカリウムの減少，雌におけるアラニンアミノトランスフェラーゼ及びカリウムの増加は，軽微又は用量依存的ではなかったため，毒性学的意義はないと考えられた．

剖検時の肉眼的観察では，投与起因性の変化は認められなかった．

病理組織学的検査において，35.68 mg/kg/day 群の雌雄及び 11.90 mg/kg/day 群の雄に肝臓における用量依存性変化が認められた．これらの変化は，細胞質における好酸性の増加を伴う小葉中心性肥大であり，35.68 mg/kg/day 群の雄で中等度，11.90 mg/kg/day 群の雄及び 35.68 mg/kg/day 群の雌で軽度であった．この病理組織学的変化は，35.68 mg/kg/day 群の雌雄及び 11.90 mg/kg/day 群の雄で観察された肝臓重量の増加と相関していた．しかしながら，回復期間終了後は肝臓重量に有意差が認められず，肝臓の病理組織学的変化において肝細胞壊死や炎症が認められなかったため，有害作用とは判断しなかった．その他の投与起因性変化として，雄の 35.68 mg/kg/day 群で胸腺皮質に極めて軽度な萎縮が認められた．この変化は，投与による軽度な非特異的ストレス効果を反映していると考えられ，壊死や炎症が認められなかったため，有害作用とは判断しなかった．胸腺重量の減少が認められたものの，回復期間終了後には回復し，組織学的観察でも投与

起因性変化は認められなかった．媒体群を含め 35.68 mg/kg/day 群の精巣及び雌性生殖器の病理組織学的検査において異常は検出されなかった．

以上より，本剤の全身性及び局所的影響の NOEL は 11.90 mg/kg/day，NOAEL は 35.68 mg/kg/day であった．

2.6.6.3.3.2　イヌ 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験（PNET-13-27）

イヌを用いた 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復試験により本剤の毒性及びその回復性について評価した．0（媒体），1.19，3.57 及び 11.90 mg/kg/day の用量で，各用量群とも雌雄それぞれ 3 例，媒体群と 11.90 mg/kg/day 群のみに回復群として雌雄それぞれ 2 例を設定した．加えて，本剤，NETU 及び NETU の代謝物 M1，M2，M3 の全身曝露も測定した（トキシコキネティクス評価は第 2.6.6.3.4 項に示した）．

一般症状，眼科学的検査，体重，摂餌量，心電図検査，呼吸，血液学的検査，凝固検査，血液化学的検査，尿検査，便検査及びトキシコキネティクス測定を実施した．その後，剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した．なお，心臓組織を採取し，本剤及び代謝物の分析に使用した．

死亡例は認められず，投与部位を含む投与起因性の一般症状は観察されなかった．投与期間を通じて，11.90 mg/kg/day 群の雌雄に体重変動が認められた．体重変動は主に雄の投与 2 週と雌の投与 1～2 週に観察され，摂餌量減少と関連していた．しかしながら，これらの変化については明らかな有害作用とは判断せず，更に 2 週間の回復期間で回復性が確認された．

眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査，血液化学的検査，凝固検査，呼吸，便検査及び尿検査において，投与起因性変化は認められなかった．

投与期間終了時及び回復期間終了時剖検においても，投与起因性の肉眼所見は認められなかった．

胸腺重量の有意な低値がすべての雌で認められたが，雄では認められなかった．これらの重量減少は軽度かつ用量依存性がなく，既知のストレス性変化であることから，本剤に起因する変化ではないと考えられた．11.90 mg/kg/day 群の雄 3 例と雌 1 例において，投与起因性変化としてリンパ球減少を特徴とする胸腺皮質の軽度萎縮が認められた．加えて，11.90 mg/kg/day 群の雌雄それぞれ 1 例ずつに，ごく軽度なリンパ球の多巣性の壊死の増加が認められた．これらの変化は，非特異的なストレス性変化を反映しているものと考えられた．なお，回復期間後，胸腺重量の変動及び病理組織学的変化は認められなかった．

以上より，本剤を 1.19，3.57 及び 11.90 mg/kg/day の用量で 4 週間イヌに静脈内投与した際に，有害作用は認められなかった．よって，本剤の全身性及び局所の NOAEL は 11.90 mg/kg/day，NOEL は 3.57 mg/kg/day と考えられた．

2.6.6.3.4　Pivotal 試験におけるトキシコキネティクス評価

2.6.6.3.4.1　ラット試験 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験（PNET-13-18）

本剤，NETU 及びその代謝物 M1，M2，M3 のラットにおける動態プロファイルを，0（媒体），3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day の用量で実施された 4 週間反復静脈内投与試験にて評価した．

投与初日及び 28 日の投与前，投与直後，投与後 5，15，30 分及び 1，2，4，24 時間に血液サンプルを採取し，また，脳内濃度については，投与後 24 時間の最終採血後（投与 29 日）本剤を投与した後に脳組織を採取した．

媒体群において，投与初日及び投与 28 日ともに血漿中及び脳組織中の本剤，NETU 及びその代謝物 M1，M2，M3 は検出されなかった．

本剤について，投与初日の C_{max} は 3 用量ともに投与終了直後であり，消失相における分布容積（V_z），クリアランス（CL）及び半減期（$T_{1/2}$）から，本剤が投与後速やかに NETU に代謝され，かつ速やかに消失することが示唆された．投与 28 日の C_{max} と AUC_{last} は，投与初日と比較して増加していたことから，全用量での蓄積が示唆された．

NETU について，投与初日及び投与 28 日において投与された全動物の C_{max} は投与終了後から投与後 5 分時点（T_{max}）であり，本剤が NETU に投与後速やかに代謝されることが確認された．また，雌は雄よりも AUC が高い傾向であった．投与初日の AUC_{last} 及び C_{max} は用量依存的な増加が認められ，V_z，CL 及び $T_{1/2}$ も用量依存的であった．投与 28 日では，投与初日と同様に C_{max} 及び AUC_{last} は用量依存的な増加がみられ，3.57 及び 11.90 mg/kg/day 群では，反復投与によるわずかな蓄積が示唆された．

M1 は，雌雄とも全用量で血漿中に確認され，雄は雌よりも高曝露であった．反復投与により，雌雄とも全用量において代謝物の蓄積が示唆された．

M2 は，雌雄とも全用量で血漿中に確認され，投与初日における M2 の曝露は M1 及び NETU より低値であった．反復投与により，M2 のわずかな蓄積性が示唆された．

M3 は，雄の全用量，雌の 11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群の血漿中で確認され，M3 の曝露は M1 及び M2 よりも低値であった．反復投与による M3 の蓄積性が示唆され，雌でより顕著であった．

脳内濃度について，本剤は 11.90 mg/kg/day 群の雄における投与後 1 時間を除いて，雄雌ともすべての脳組織サンプルで定量限界以下であった．なお，定量された 11.90 mg/kg/day 群の雄においても本剤脳内濃度は極めて低値であった．

NETU は，すべての用量群の脳組織において確認され，雌は雄よりも高値であった．

M1 は，すべての用量群の脳組織において確認され，雌雄で同等かつ用量依存的な曝露の増加が確認された．

M2 は，雌雄ともすべての用量で定量限界以下であった．

M3 は，すべての用量群の脳組織において確認され，雌雄で同等の脳内濃度を示したが M1 よりも低値であった．

2.6.6.3.4.2　イヌ試験 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験（PNET-13-27）

イヌにおける本剤，NETU 及びその代謝物 M1，M2，M3 の全身曝露について，本剤を 0（媒体），1.19，3.57 及び 11.90 mg/kg/day の用量で実施された 4 週間反復静脈内投与試験にて評価した．

本剤は，雌雄とも全用量の血漿中に存在し，速やかに NETU に代謝されていた．すべての投与動物において，用量比例した本剤の曝露が確認された．本剤の短い $T_{1/2}$ から，本剤の速やかな NETU への代謝が示唆された．

NETU は，V_z，CL 及び $T_{1/2}$ に顕著な性差は認められず，これらに用量依存性がなかったことから，静脈内投与後，広く分布して緩やかに排出されるという動態が示唆された．また，NETU は反復投与後の蓄積性が示唆された．

M1 の C_{max} は雌雄で同等であり，AUC_{last} は雄で雌よりもわずかに曝露が高かった．M1 は反復投与後の蓄積性が認められた．

M2 及び M3 は C_{max} 及び AUC_{last} とも雌雄で同等であり，反復投与後の蓄積性が認められた．

NETU の心臓組織内濃度は全用量で検出されたが，測定値は最大血中濃度よりも低値であった．

M1 は，全用量の心臓組織で検出され，最大血漿中濃度よりも高値であったことから，代謝物 M1 の心臓組織への蓄積性が示唆された．回復期間終了後，心臓組織の M1 は定量限界付近であった．

M3 の心臓組織内濃度は，3.57 及び 11.90 mg/kg/day 群で検出され，血漿中濃度よりも高値であった．1.19 mg/kg/day 群では，M3 の濃度は定量限界以下であった．

本剤及び M2 は，すべての用量群において心臓組織から検出されなかった．

回復期間終了後の，心臓組織における代謝物 M1 及び M3 は定量限界付近であり，体内からのほぼ完全な消失が示唆された．

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 *In vitro 試験*

2.6.6.4.1.1 Ames 試験

2.6.6.4.1.1.1 細菌を用いた遺伝子突然変異試験（PNET-12-04）

本剤の遺伝子突然変異誘発性を，ネズミチフス菌及び大腸菌を用いて検討した．試験株はサルモネラ菌株 TA1535，TA1537，TA98，TA100 及び大腸菌株 WP2*uvrA* の計 5 菌株を使用した．実験は，肝 S9mix の代謝活性存在下及び非存在下の両方で検討された．

プレート法を使用して，本剤 4520 µg /プレートを最大濃度として，以下 4 濃度（2260，1130，565 及び 283 µg/プレート）で検討した．また，S9 代謝活性化の存在下及び非存在下のいずれにも TA100 菌株に 141 µg/プレートの追加濃度を設定した．結果として，細胞毒性が S9 代謝の非存在下及び存在下の両方で最高濃度の TA100 試験株で観察された．

本剤は S9 代謝活性化の存在下及び非存在下において，すべての菌株及び全濃度で復帰コロニー数の 2 倍以上の増加を誘発しなかった．

よって，本剤は本実験条件下で，復帰突然変異を誘発しないことが確認された．

2.6.6.4.1.1.2 細菌を用いた不純物の遺伝子突然変異試験（PNET-15-36）

不純物 不純物 F*を含有する本剤（バッチ BR2A：0.41%）を用いた突然変異誘発性をネズミチフス菌及び大腸菌を用いて検討した．試験株はサルモネラ菌株 TA1535，TA1537，TA98，TA100 及び大腸菌株 WP2*uvrA* の 5 株を使用した．実験は肝 S9mix の代謝活性の存在下及び非存在下の両方で検討された．

プレート法を使用して，本剤を 4520，2260，1130，565，283，141，71 及び 35 µg/プレートの濃度で検討した．本剤は，S9 代謝の非存在下又は存在下のいずれでも，すべての菌株及び濃度において，復帰コロニー数の 2 倍以上の増加を誘発しなかった．

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

不純物　不純物 F*を 0.41%含有する本剤は本実験条件下で，復帰突然変異を誘発しないことが確認された．

2.6.6.4.1.1.3　遺伝毒性不純物

遺伝毒性不純物の試験として，不純物 D*　（PNET-15-86），不純物 A*　（PNET-16-08），不純物 B*　（PNET-16-09），不純物 C*　（PNET-16-55）の遺伝子突然変異試験が実施された．遺伝毒性評価の詳細な説明は，第 3.2.S.3.2 項に記載した．

2.6.6.4.1.2　染色体異常試験

2.6.6.4.1.2.1　染色体異常試験（PNET-12-05）

本剤における，S9 代謝活性化の非存在下及び存在下での培養ヒトリンパ球の染色体異常誘発能について検討した．細胞を S9 代謝の存在下及び非存在下で，それぞれ 3 時間処理し，約 1.5 細胞周期に相当する 24 時間で細胞を回収した．この実験で陰性結果が得られたため，S9 代謝活性化非存在下で 24 時間処理による実験を実施した．両実験とも 452，226，113，56.5，28.3，14.1，7.06 及び 3.53 µg/mL の濃度を使用したが，3 時間処理では細胞毒性は観察されなかった．

各実験には，媒体及び陽性対照物質（マイトマイシン C とシクロホスファミド）を使用し，濃度は染色体異常のスコアリングのため細胞毒性（有糸分裂指数が 50%低下する濃度）に基づき設定した．異常のスコアリングのために選択された最高濃度は，中等度の毒性を惹起する濃度であった．したがって，スコアリング用に設定された濃度は，3 時間処理では 452，226 及び 113 µg/mL，24 時間処理では 56.5，28.3 及び 14.1 µg/mL であった．

S9 代謝活性化存在の有無に関わらず，すべての濃度又は処理時間においても構造異常を有する細胞の発生率（ギャップの有無を含む）の有意な増加は認められなかった．一方で，陽性対照群であるマイトマイシン C 及びシクロホスファミドでは，異常を伴う細胞の発生率の有意な増加（ギャップの有無を含む）が確認された．

以上より，本剤はヒトリンパ球に構造的染色体異常を誘発しないと考えられた．

2.6.6.4.1.2.2　不純物の染色体異常試験（PNET-15-37）

不純物　不純物 F*を含有する本剤（[redacted]）の S9 代謝活性存在下及び非存在での培養ヒトリンパ球の染色体異常誘発能について検討した．

短時間処理として，細胞を S9 代謝活性化の存在下及び非存在下でそれぞれ 3 時間処理し，約 1.5 細胞周期に対応する 24 時間後に細胞を回収した．長時間処理として，細胞を S9 代謝活性化非存在下にて 24 時間連続処理後，細胞を回収した．評価濃度は 904, 603, 401, 56.5, 28.3 及び 14.1 µg /mL で実施した．各実験には，媒体群及び陽性対照物質群（マイトマイシン C 及びシクロホスファミド）を用いた．

ギャップの有無を問わず，異常を有する細胞の発生率の有意な増加は，短時間及び長時間処理ともにすべての用量で認められなかった．一方で，陽性対象物質であるマイトマイシン C 及びシクロホスファミドでは，異常を有する細胞（ギャップを有無を含む）の発生率に有意な増加が認められた．

以上より，　不純物 F*を含む本剤は，*in vitro* ヒトリンパ球の染色体異常を誘発しないことが確認された．

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.6.4.2 *In vivo 試験*

2.6.6.4.2.1 *In vivo* 小核試験（PNET-13-49）

本剤の *in vivo* 染色体異常誘発能を明らかにするため，SD ラットを用いて 0（媒体：5%グルコース），26.8，53.5 及び 107.0 mg/kg/day の静脈内投与による小核試験を実施した．また，陽性対照群には，マイトマイシン C を単回で腹腔内投与した．各群雄 5 例を設定し，107.0 mg/kg/day 群には 3 例のサテライト動物を追加した．最終投与から 24 時間後に全動物を安楽殺し，サテライト群の 3 例を用いて 107.0 mg/kg/day における曝露を確認した．なお，血液サンプルは投与前日，投与直後及び投与後 8 時間に採取した．

初回投与後，サテライト動物を含む 107.0 mg/kg/day 群に頻回呼吸と活動低下がみられ，サテライト群の 1 例にも痙攣と振戦が認められた．2 回目の投与直後，頻呼吸，活動低下，立毛及び背弯姿勢が観察されたが，これら症状は翌日に完全に回復した．更に，本剤を投与された全群で，体重増加に有意な減少が認められ，107.0 mg/kg/day 群で顕著であった．26.8 及び 53.5 mg/kg/day 群では一般症状は観察されなかった．サテライト群の 1 例が痙攣後死亡し，投与 2 日に投与されたストック動物と交換された．交換された動物も採血中に痙攣を示し，死亡した．

すべての投与群において小核多染性赤血球の発生率に顕著な増加はみられなかった．陽性対照物質であるマイトマイシン C では小核多染性赤血球の発生率の有意な増加が認められた．

以上より，本剤は小核誘発能を有しないことが確認された．

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

本剤において，がん原性試験は実施していない．

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1 ラットを用いた試験

2.6.6.6.1.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1.1 ラットを用いた静脈内投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（PNET-13-64）

本剤の交配前，交配中，交尾確認後から着床までの期間中の毒性学的影響を，ラットに本剤 0（媒体），3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day を静脈内投与し，検討した．各用量，雌雄それぞれ 24 例で構成し，雄では，交配前 4 週間，交配期間及び剖検前日まで投与した．雌では交配前 2 週間，交配期間及び交尾確認後 7 日間投与し，交尾確認後 15 日に剖検した．

評価項目として，体重，一般症状，摂餌量，性周期，交尾率，子宮内観察，剖検，器官重量及び精子検査を実施し，雄の媒体群及び 35.68 mg/kg/day 群の全例については精巣及び精巣上体の病理組織学的検査及び精子形成周期のステージ分類を実施した．

試験期間中に 2 例の死亡例が認められた．1 例は媒体群の雄で，交配前期間 15 日に死亡発見され，肺の暗色領域と胸腺の暗色調をみとめた．もう 1 例は 35.68 mg/kg/day 群の雌で，交尾確認後 5 日に食殺された（卵巣，子宮，子宮頸部及び膣を損失）．不妊動物数は，媒体群，3.57 mg/kg/day 群及び 35.68 mg/kg/day 群で各 2 例，及び 11.90 mg/kg/day 群で 3 例であった．片側のみの着床が，媒体群，3.57 及び 11.90 mg/kg/day 群の各 2 例，35.68 mg/kg/day 群の 1 例に認め

られた．妊娠 15 日に生存胎児を有していた雌動物数は，媒体群と 3.57 mg/kg/day 群で各 22 例，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群では各 21 匹であった．

投与に起因した一般状態の変化は雌雄ともに認められなかった．

投与手技に起因すると考えられる尾部の損傷，先端の欠損，潰瘍及び痂皮形成が雄にみられ，その他，偶発的な所見として，頭部の脱毛及び/又は痂皮，後肢の損傷，仙骨部の擦傷/痂皮などが散発的に認められた．

軽度な体重減少が，35.68 mg/kg/day 群の雄，11.90 mg/kg/day 群の雄及び 35.68 mg/kg/day 群の雌に認められた．交配前期間において，体重の増加抑制が用量 3.57 mg/kg/day 以上の投与群の雌に，雄では一過性に認められた．交尾確認後，11.90 mg/kg/day 群と 35.68 mg/kg/day 群の雌に体重増加抑制がみられたが，35.68 mg/kg/day の雌では，交尾確認後 10 日と 15 日に体重増加がみられた．

雌動物において，性周期，交配成績，剖検時体重，妊娠子宮重量及び体重増加に投与による影響は認められなかった．更に，黄体数，着床数，着床後死亡，胚の死亡及び生存数においても投与起因の変化はなかった．雄動物においては，35.68 mg/kg/day 群の剖検時体重，全投与群での前立腺の絶対重量，及び 35.68 mg/kg/day 群の精巣上体の絶対重量の減少が認められたが，媒体群と比較して顕著な差がないこと，反映する病理組織学的所見若しくは関連所見がみられなかったことから，毒性学的意義に乏しい変動と判断した．また，精子の運動性と精子濃度にも影響は見られず，35.68 mg/kg/day 群及び媒体群の雄における精巣及び精巣上体の病理組織学的検査では，投与に起因する変化は認められなかった．精子形成周期のステージ解析では規則的に重層化した精上皮が認められ，正常と判断された．

以上の結果から，本剤の一般毒性学的 NOAEL は，雌雄共に 35.68 mg/kg/day と考えられた．生殖能及び初期胚発生に対する NOAEL も雌雄共に 35.68 mg/kg/day と考えられた．

2.6.6.6.1.2　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.1.2.1　ラットを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する予備試験（PNET-13-33）

本剤を 0（媒体），11.90，35.68，71.36 mg/kg/day の用量で，各群 6 例の雌ラットに静脈内投与し，ラットにおける妊娠及び胚・胎児の発生に対する影響を検討した．

投与期間は妊娠 6 日から 17 日までとし，一般症状観察，体重及び摂餌量測定を実施した．全生存例について妊娠 20 日に帝王切開及び剖検を実施し，黄体数，着床数，早期及び後期の胚死亡，生存胎児数及び死亡胎児数，子宮重量，生存胎児体重，性別及び外表検査を実施した．

71.36 mg/kg/day 群の 5/6 例は，妊娠末期前の投与期間中に死亡した．35.68 mg/kg/day 群の雌 1 例は不妊であった．妊娠 20 日に，媒体群と 11.90 mg/kg/day 群の全例，35.68 mg/kg/day 群の 5 例並びに 71.36 mg/kg/day 群の 1 例に生存胎児が認められた．

71.36 mg/kg/day 群において，痙攣，運動失調，活動量の低下及び円背姿勢が観察された．更に，体重及び体重増加の有意な減少が，71.36 mg/kg/day 群の雌にのみ認められた．11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群では，妊娠末期体重，妊娠子宮重量及び体重増加量に媒体群と比較して有意差は認められなかった．

11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群の同腹仔データ，平均胎児体重及び胎児の性比に投与に起因した変化はみられなかった．死亡例の剖検では，被験物質投与に関連すると示唆される変化は認められず，動物の状態悪化に関連した変化のみで死因は明らかではなかった．帝王切開時剖検では，

投与に関連した変化は認められなかった．媒体群と投与群の胎児の外表検査では異常はみとめられなかった．媒体群の 1 胎児及び 35.68 mg/kg/day 群の 1 胎児に小型が認められた．

以上の結果より，主試験の高用量設定は 35.68 mg / kg / day 未満が妥当であると結論づけた．

2.6.6.6.1.2.2　ラットを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験（PNET-13-56）

本剤を 0（媒体），3.57，11.90，35.68 mg/kg/day の用量で雌ラットに静脈内投与し，胚・胎児の発生に対する影響を検討した．各投与群は 24 例の雌ラットを設定し，サテライト群として 3 例（媒体群）及び 6 例（3.57，11.90，35.68 mg/kg/day 群）の動物を追加した．

全例について，交尾確認後 6 日目から 17 日目までの妊娠期間中に静脈内投与し，一般症状観察，体重及び摂餌量測定を実施した．主群の全例について，交尾確認後 20 日目に帝王切開，剖検を実施し，黄体数，着床数，早期及び後期の胚死亡，生存及び死亡胎児数，子宮重量，胎児体重，性別及び胎児の外表検査を実施した．各腹の約半数の生存胎児について，それぞれ内臓又は骨格検査を実施した．

死亡例は認められなかった．妊娠 20 日に生存胎児が認められた主群の母動物数は，媒体群で 20 例，3.57 mg/kg/day 群で 23 例，11.90 mg/kg/day 群で 18 例，35.68 mg/kg/day 群で 24 例であった．

本剤投与に起因した症状は認められず，媒体群と比較して，投与群の母動物の体重に変化は認められなかった．35.68 mg/kg/day 群において体重増加抑制，摂餌量減少及び最終体重の有意な低値が認められたが，子宮重量，同腹仔数，平均胎児体重及び性比に差はみとめられなかった．

剖検では，母動物に投与起因性の変化は認められなかった．胎児の外表検査では，35.68 mg/kg/day 群に後肢の異常回転肢がみられ，1 胎児の死亡が認められた．骨格検査では，35.68 mg/kg/day 群の 6 胎児/3 腹で恥骨の未骨化がみられた．媒体群，3.57 mg/kg/day 群及び 11.90 mg/kg/day 群の胎児では形態異常は認められなかった．その他の所見の発現率は，媒体群と投与群に差は見られなかった．内臓検査では，投与に起因する変化は認められなかった．

トキシコキネティクスでは，全例に被験物質である本剤及び NETU，並びにその代謝物 M1，M2 及び M3 が検出された． 3 用量の全例に投与終了後直後に本剤と NETU ともに C_{max} を示し，その後本剤は速やかに NETU に変換されていた．NETU は反復投与における蓄積が確認された．

以上より，本試験における母体及び胚胎児発生に対する NOAEL は 11.90 mg/kg/day と考えられた．

2.6.6.6.1.3　出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

2.6.6.6.1.3.1　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（PNET-15-85）

ラットを用いて，着床（交配後 6 日）から離乳（出産後 20 日）の期間中，本剤を 0（媒体），3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day の用量で F0 動物 24 例に静脈内投与し，本剤の出産前及び出産後の性成熟への作用による妊娠/授乳期間中の悪影響及び受胎産物/子孫の発達/発育への影響を検討した．F0 雌に，仔（F1 世代）の出産から離乳まで哺育させ，その際，同腹仔から無作為に雌雄を 1 例ずつ選択し，交配し，F2 世代を得た後，交配後 21 日に安楽殺した．F1 世代には本剤を投与しなかった．

・　F0 世代

離乳時（分娩後 21 日）に仔と共に生存している F1 雌の数は，媒体群，3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群でそれぞれ 21，22，21 及び 21 例であった．

35.68 mg/kg/day の用量で本剤を投与された F0 動物で，痂皮，腫脹，落屑／擦傷，尾部の潰瘍（投与部位）などの一般症状が観察された．産後 4 日に尾部の黒色及び痂皮が認められ，先端部が欠損していたため，人道的な理由で 1 例安楽殺した．

交配後 12 日，15 日，20 日及び出産後 1 日，4 日，7 日における平均体重に有意な減少が認められた．

交配後 9 日，12 日及び 15 日に体重増加量の有意な減少が認められた．

交配後 15 日及び 20 日の摂餌量の有意な減少が認められた．

上記のような 35.68 mg/kg/day 群における母体毒性の発現により，着床数と累積仔数減少の頻度増加が認められた．産後 1 日から 21 日までの平均仔体重及び同腹仔体重は，媒体群よりも有意に低く，これらの影響は，離乳前の身体発達（耳介展開，聴覚性驚愕反射，眼瞼開存）の完了遅延とも関連していた．なお，妊娠期間，着床数，着床損失及び性比は，媒体群と同等であった．胎児の一般症状及び剖検所見に，投与との関連性は認められなかった．肉眼的観察では，母胎に投与起因性の変化は認められなかった．11.90 mg/kg/day 群の雌では，交配後 15 日及び 20 日の摂餌量の有意な減少のみが認められた．3.57 mg/kg/day 群では，雌の 1 例が交配後 19 日に死亡した．

・　F1 世代

第 2 世代を得るために，群ごとに合計 24 例の雄と 24 例の雌を無作為に抽出した．なお，投薬は行わなかった．

離乳時（分娩後 21 日）に仔と共に生存している F1 雌の数は，媒体群，3.57，11.90 及び 35.68 mg/kg/day 群でそれぞれ 21，22，21 及び 21 例であった．

発情周期，ペアリングによる交配能力によって評価される生殖機能は，媒体群と同様であった．同腹仔データ，性比，一般症状，膣開口，陰茎亀頭と包皮の分離及び運動活動に影響は認められなかった．Y 迷路試験では本剤の投与群が学習能力を有することが示された．
35.68 mg/kg/day 群では，離乳前の身体発達の遅れ（聴覚性驚愕反射）が認められた．

雌雄の最終体重，絶対及び相対器官重量に毒性学的意義のある変化はみられず，F2 又は F1 世代の剖検で毒性に起因する変化は認められなかった．

以上の結果より，本剤を 35.68 mg/kg/day の用量で投与された F0 世代の雌で，体重と摂餌量の減少をはじめとした母体毒性が観察され，それによる同腹仔体重及び平均仔体重の低下が認められ，仔の損失の増加と離乳前の身体発達の軽度遅延に関連していると考えられた．

F1 世代では，35.68 mg/kg/day 群に 28 日から試験終了までの期間中，F1 雄で体重減少が観察されたが，その一方で F1 雌では成熟期の最初の期間（28～49 日）にのみ体重減少がみられた．また，F1 雄では，35 日から 56 日までの期間中，体重の増加抑制がみられ，42 日と 56 日の 11.90 mg/kg/day 群及び 56 日の 3.57 mg/kg/day 群でも軽微な体重増加抑制が認められた．F2 世代に本剤に関連する影響は認められなかった．

以上より，本剤の F0 世代及び F1 世代母子の NOAEL は 11.90 mg/kg/day であり，雌雄とも繁殖への影響は認められなかった．

2.6.6.6.2　ウサギを用いた試験

2.6.6.6.2.1　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1.1　ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する予備試験（PNET-13-30）

主試験の用量設定のため非妊娠雌ウサギを用いて反復静脈内投与を行った．各 3 例の非妊娠ウサギに，3.57 mg/kg/day 及び 11.9 mg/kg/day をそれぞれ 3 日間，22.6 mg/kg/day を 4 日間，45.2 mg/kg/day を 2 週間投与した．

試験中に死亡例は認められなかった．短期間投与では一般症状及び体重に変化は認められなかった．2 週間の反復投与では，2 例に投与部位である耳の痂皮又は潰瘍が投与 4 日から投与終了時まで認められ，体重が漸次的に減少した．投与終了時の剖検では，投与部位の肥厚及び/又は複数の痂皮が観察されたが，局所以外に投与に起因した所見はなかった．

以上より，ウサギ胚・胎児発生に関する主試験の高用量は 45.2 mg/kg/day 未満が適切と考えられた．

2.6.6.6.2.1.2　ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する予備試験（PNET-13-53）

ウサギの胚胎児毒性試験の本試験における用量設定のため，妊娠ウサギに本剤を静脈内投与した際の影響を予備的に検討した．0（媒体），11.3，22.6 及び 45.2 mg/kg/day の用量でそれぞれ 6 例に，交配後 6 日から 19 日までの期間静脈内投与した．

検査として，体重，一般症状観察，剖検時に黄体数，着床数，早期及び後期の胚死亡数，生存及び死亡胎児数，子宮重量，胎児体重及び性別を記録し，胎児の外表検査を実施した．トキシコキネティクス評価のため，サテライト群を設定した．

死亡例は認められず，全例の妊娠が確認できた．

22.6 mg/kg/day 群の 1 例と 45.2 mg/kg/day 群の 2 例が，それぞれ妊娠 24 日，21 日，23 日で流産した．

22.6 mg/kg/day 以上の群で，投与部位である耳の痂皮，腫脹，発赤を認め，妊娠 9 日から試験終了まで体重の減少が認められた．45.2 mg/kg/day 群では妊娠 12 日から 23 日まで顕著な体重減少が認められ，最終体重，子宮重量及び絶対体重増加量の減少がみられた．

投与群の全例で有意差はないものの用量相関的な平均胎児体重の減少が認められた．特に 45.2 mg/kg/day 群では，生存胎児は 1 例であった．その他の投与群の帝王切開成績は，媒体群と同程度であった．

剖検にて，45.2 mg/kg/day の投与部位である左耳における暗色調，肥厚及び/又は痂皮が認められた．

媒体群における胎児の 2/47 例，11.3 mg/kg/day 群における胎児の 11/57 例，22.6 mg/kg/day 群における胎児の 6/45 例，45.2 mg/kg/day 群における胎児の 16/30 例に小型胎児がみられた．

11.3 mg/kg/day 群に 2 胎児，22.6 mg/kg/day 群に 1 胎児の死亡がみられた．22.6 mg/kg/day 群の 1 胎児では複数の形態異常（腹壁裂，頭蓋裂，右前肢の異常回転肢，右後肢の過屈曲及び左後肢の合指）が認められた．これらの所見は用量依存性がなく，偶発性変化であると考えられた．

投与の初日及び最終日の薬物動態パラメータから，動物が本剤，NETU 及び代謝物 M1，M2，M3 に曝露されたことが示された．

以上より， 22.6 mg/kg/day 以上で母動物の体重減少がみられたことから主試験の高用量は 11.3 mg/kg/day 以下が適切と判断した．

2.6.6.6.2.1.3　ウサギを用いた静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験（PNET-13-71）

本剤を 0（媒体），2.82，5.65，11.3 mg/kg/day の用量で各群 20 例の妊娠ウサギに交配後 6 日から 19 日まで静脈内投与した．トキシコキネティクス評価のため各 4 例の動物を追加した．

検査として，一般状態観察，体重及び摂餌量測定を実施した．交配後 29 日に帝王切開，剖検し，黄体数，着床数，子宮の重量，早期及び後期の死亡胚・胎児数，胎児生存率，胎児体重及び性別が記録された．すべての生存胎児について外表，内臓及び骨格検査を実施した．

試験中に死亡例は認められなかった．非妊娠動物が，媒体群に 3 例，2.82 及び 5.65 mg/kg/day 群にそれぞれ 1 例，11.3 mg/kg/day 群に 2 例認められた（妊娠動物数は媒体群 17 例，2.82 及び 5.65 mg/kg/day 群にそれぞれ 19 例，11.3 mg/kg/day 群 18 例）．媒体群の 1 例及び 2.82 mg/kg/day 群の 2 例に片側性着床が認められた．11.3 mg/kg/day 群の妊娠動物 18 例すべてに生存胎児が認められた．

毒性学的意義のある症状や投与による影響は認められず，媒体群と投与群間の体重と摂餌量に有意差は認められなかった．体重量増加抑制が妊娠 15 日でのみ，媒体群と比較して 11.3 mg/kg/day 群で認められた．最終体重，妊娠子宮重量及び絶対体重量増加に有意差は認められず，投与による影響は，剖検時に観察されなかった．早期/後期の吸収胚及び死亡胎児数の増加が投与群で観察され，5.65 及び 11.3 mg/kg/day 群で有意であった．群間の平均胎児体重と胎児の性比に関連する差は認められなかった．11.3 mg/kg/day 群では，媒体群と比較して小型胎児の数のわずかな増加が認められた．胎児の骨格検査では，投与に起因する所見は認められなかった．

交配後 6 日と交配後 19 日との間で得られた薬物動態パラメータは，交配後 6 日と 19 日で用量依存性は見られないものの，本剤の高い曝露が認められ，同様の傾向が，NETU とその代謝物 M1，M2，M3 でも観察された．また，反復投与による NETU 及びすべての代謝物の蓄積が示唆された．

以上より，本剤の母体の NOAEL は 11.3 mg/kg/day，胚・胎児発生の NOAEL は 2.83 mg/kg/day と考えられた．

2.6.6.7　新生児を用いた試験

本剤において，新生児を用いた試験は実施していない．

2.6.6.8　局所刺激性試験

2.6.6.8.1　ヒト，イヌ及びラット全血を用いた安定性試験（NETU-10-13）

ヒト，イヌ及びラットの全血を用いて，37°C で全血と本剤をインキュベート後，0，15，30，60，120，180 又は 240 分の安定性及び NETU 変換率を評価した．

その結果，本剤はいずれの種の全血中においても安定であることが確認された．また，本剤の一部が NETU に代謝されることが確認され，ヒトにおける NETU 変換率は，0，15，30，60，120，180 及び 240 分でそれぞれ，0.7%，0.9%，1.3%，2.2%，3.7%，4.9%及び 6.7%であった．

2.6.6.8.2　ラットを用いた 1 週間静脈内投与による忍容性確認試験（NETU-09-08）

本剤をラットに 1.81 mg/body/day の用量で 1 日 1 回，1 週間反復静脈内投与（尾静脈）した際の全身性及び局所忍容性を評価した．媒体群には 5%ブドウ糖媒体を投与した．

その結果，一般症状，体重，摂餌量及び血液学的検査において媒体群と投与群間に有意な差は認められなかった．

最終投与後の約 24 時間に剖検を実施し，投与部位の病理組織学的検査を行った．その結果，投与部位の軽度な炎症，フィブリン沈着及び単核細胞浸潤が認められたのみであり，かつ媒体群と投与群間に有意な差はなかったことから，投与手技に起因するものであると判断した．

以上より，本剤の本投与条件におけるラットでの忍容性が確認された．

2.6.6.8.3　ラットを用いた 2 週間反復静脈内投与による忍容性確認試験（NETU-10-05）

本剤をラットに 1.81 mg/body/day の用量で 1 日 1 回，2 週間反復静脈内投与（尾静脈）し，全身性及び局所忍容性を評価した．媒体群として，5%グルコース溶液群と 10%カプチゾール及び 8%Tween 80 群の二種を設定した．

その結果，本剤は全身的な忍容性は良好であり，試験中に投与に起因する所見は認められなかった．

投与部位においても媒体群とほぼ同様の良好な忍容性が確認された．

以上より，本剤の本投与条件におけるラットでの忍容性が確認された．

2.6.6.8.4　ウサギを用いた静脈内，傍静脈及び動脈内投与による忍容性確認試験（PNET-14-12）

ウサギの耳静脈内，傍静脈及び動脈内に本剤の凍結乾燥製剤をそれぞれ単回投与した際の局所忍容性を評価した．

本剤 11.8 mg/mL を，静脈内及び動脈内投与では 0.5 mL/部位，傍静脈投与では 0.2 mL/部位で投与した．媒体群は，同 3 経路に 5%グルコース+ 0.01% w/v エチレンジアミン四酢酸を同容量で投与した．投与の約 1 時間後に投与部位における反応を確認し，8 日間の観察期間終了後すべての動物について，剖検，肉眼観察及び投与部位の病理組織学的評価を行った．

すべての動物において，一般症状又は全身毒性は認められなかった．

静脈内投与では投与部位に反応は認められなかった．傍静脈及び動脈内投与した動物の一部で軽度から顕著な刺激性反応が認められたが，観察期間 6 日までに回復した．傍静脈投与した動物 1 例で，耳部の紅斑及び浮腫が認められた．本剤及び媒体を静脈内及び動脈内投与した動物では，剖検における肉眼的変化は観察されなかった．傍静脈投与における投与部位の病理組織学的検査では，痂皮形成，軽度な表皮過形成，慢性炎症像，限局性出血及び真皮の浮腫などの投与起因性変化が認められた．なお，静脈内投与した際においても投与手技に起因すると考えられる軽度な病理組織学的変化が認められたものの，刺激反応や肉眼所見は認められなかったことから忍容性に問題はないと考えられた．

以上より，ウサギを用いた検討で，臨床投与経路の静脈内投与における本剤の忍容性が確認された．

2.6.6.8.5　ウサギを用いた急性皮膚刺激性試験（PNET-13-44）

雌性ウサギの皮膚に本剤の凍結乾燥製剤を 4 時間塗布した際の皮膚刺激性を検討した．

予備試験に 1 例を割り当て，2 例を確認試験に用いた．本剤 11.8 mg/mL を 0.5 mL/部位の容量で動物の背部皮膚に 4 時間塗布し，4 時間の塗布終了から約 1，24，48 及び 72 時間に刺激性を評価した．同時に全身毒性の有無を確認する目的で一般症状を観察した．なお，皮膚の反応は，紅斑/痂皮形成及び浮腫形成の程度に従ってスコア化を実施した．

その結果，処置部位に浮腫は観察されなかった．2 例で発現した軽度な紅斑は，それぞれ塗布後 24 時間と 48 時間までに回復した．試験を通じて全身毒性及び体重の変化は認められなかった．

以上より，本剤は本投与条件においてウサギの皮膚に皮膚刺激性を示さなかった．

2.6.6.8.6　モルモットを用いた皮膚感作性及びマキシマイゼーション試験（PNET-13-46）

モルモットマキシマイゼーション法を用いて本剤の凍結乾燥製剤における遅延性皮膚感作性について検討した．

検討は 2 フェーズにて実施され，第 1 フェーズは用量設定試験，第 2 フェーズを本試験と位置づけた．感作性試験は，20 例の試験群と 10 例の媒体群にて実施し，モルモットに皮膚感作のためのフロイント完全アジュバント（以下アジュバント）乳剤を投与部位前部に，濃度 20%で調製された本剤を投与部位中央部に，アジュバント乳剤によって濃度 20%の本剤を投与部位後部に皮内投与した．1 週間後，投与部位に濃度 100%の本剤を局所塗布することにより，再感作処置を行った．媒体群には，5%グルコース及び 0.01%w/v エチレンジアミン四酢酸を使用し，同様の方法で処置した．再感作の 2 週間後，すべての動物に，媒体と濃度 100%の本剤の両方を局所塗布した．包帯を取り除いてから 24 時間後と 48 時間後に，処置部位の観察とスコアリングを行った．

いずれの動物においても変化は認められなかった．

以上より，本剤は本投与条件においてモルモットに感作反応を誘発しないことが示された．

2.6.6.8.7　ウシ角膜を用いた眼腐食性，刺激性及び透過性確認試験（PNET-13-65）

本剤の凍結乾燥製剤の腐食性/刺激性について，ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験にて検討した．

最終濃度 11.8 mg/mL の本剤をウシ角膜上に 10 分間の曝露後，2 時間のインキュベーションを行い検討した．また，陽性対照（100%v/v ジメチルホルムアミド溶液），媒体（5%グルコース+ 0.01% w/v エチレンジアミン四酢酸水溶液）についても同様に評価し，曝露後に得られた角膜上皮の不透明度の平均値を経時的に算出した．

その結果， 2 時間の曝露終了時における角膜の平均不透明度は 0.0 であり，肉眼的にも変化は観察されなかった．不透明度の決定後に実施した角膜の平均透過性についても，本剤処置による影響はなかった．

以上より，本剤は非眼腐食性及び非眼刺激性物と分類された．

2.6.6.8.8　ヒトのヘパリン加血を用いた *in vitro* 溶血性試験 （NETU-09-18）

ヒトのヘパリン添加全血を用いて，本剤及び NETU の溶血性試験を実施した．

本剤及び NETU をそれぞれ 7.1 µg/mL～452 µg/mL 及び 7.8 µg/mL～500 µg/mL の濃度範囲でヘパリン処置された全血に添加後，37°C のウォーターバスで 10 分間インキュベートし，遠心分離後の上清について 540 nm の吸光度により求められるヘモグロビンにて評価した．

その結果，本剤及び NETU は，それぞれ 452 µg/mL 及び 500 µg/mL の濃度まで溶血性を示さなかった．

2.6.6.9　その他の毒性試験

2.6.6.9.1　抗原性試験

2.6.6.9.1.1　モルモットを用いた能動的全身性アナフィラキシー試験（PNET-14-10）

本剤の凍結乾燥製剤を用いて，能動的全身性アナフィラキシー惹起能について，モルモットにて検討した．

4 群構成にてそれぞれ 5 例ずつ雄性モルモットを設定し，感作には生理食塩水，本剤の 47 mg/kg/day 及び 2 mg/kg/day の卵白アルブミン（陽性対照物質）を用いて 7 日間反復腹腔内投与を実施した．投与後 11 日間の休薬の後に，抗原投与には生理食塩水，本剤の 11.8 mg/kg/day 及び 1 mg/kg/day の卵白アルブミンをそれぞれ 1 回静脈内投与した．感作投与中，投与後約 30 分及び 1 時間に一般状態の観察を実施した．抗原投与後，アナフィラキシー徴候の有無について，投与後約 30 分，1 時間及び 24 時間に観察を実施した．

感作期間中及び抗原投与後の死亡例は認められず，本剤の投与群に一般症状は観察されなかったことから，本剤投与に起因するアナフィラキシー反応の症状はないと考えられた．なお，陽性対照物質においては明確なアナフィラキシー反応が確認された．

以上より，本剤は本試験条件において能動的アナフィラキシー反応を誘発しないと考えられた．

2.6.6.9.1.2　モルモットを用いた受動性アナフィラキシー試験（PNET-14-11）

本剤凍結乾燥製剤の受動性皮膚アナフィラキシー誘発能について，モルモットを用いて評価した．

感作には，3 群構成にてそれぞれ 4 例ずつ雄性モルモットを設定し，生理食塩水，本剤の 29.4 mg/kg/day 及び 1 mg/kg/day のウシ血清アルブミン（陽性対照物質）をアジュバントと共に調製し，週 1 回で 3 週間反復皮下投与した．

2 週間の休止期間の後，これら動物から採血し，受動性アナフィラキシー試験に使用する感作血清を採取した．受動性アナフィラキシー試験には 6 群構成にてそれぞれ 4 例ずつ雄性モルモットを設定し，生理食塩水と 3 つの感作群から得られた血清を 100%，50%，25%，12.5%の濃度にて 0.05 mL の容量で皮内投与した．残りの 3 群については，IgE 抗体の不活化処理後の血清を用いて同様の皮内投与を実施した．抗原投与として，約 4 時間後又は 24 時間後に本剤又は陽性対照物質の感作血清と青色色素を混合し，単回静脈内投与した．抗原投与の 30 分後，動物を安楽殺し，血清皮内投与部位を観察し青色色素の漏出により受動性アナフィラキシー反応を評価した．

感作期間中，投与部位に潰瘍，痂皮及び/又は腫脹が観察されたものの，死亡例又は全身毒性を示す一般症状は認められなかった．

感作血清を投与された動物に，本剤に起因する死亡，体重変化及びアナフィラキシー様症状を含む一般症状は観察されなかった．また，本剤投与群において，IgE の不活化有無によらず青色色素の漏出は認められなかった．

以上より，本剤は本実験条件において，受動性皮膚アナフィラキシー反応を誘発しないと考えられた．

2.6.6.9.2　光毒性試験

2.6.6.9.2.1　Balb/c 3T3 Cell を用いた光毒性試験（PNET-13-66）

本剤の凍結乾燥製剤を用いた *in vitro* 光毒性試験を実施した．

本剤の 7.1～904 µg/mL の濃度で，紫外線 A 波照射下又は非照射下（暗所）のいずれかの条件で本剤を 1 時間インキュベートした．ニュートラルレッドの取り込みは，約 18～22 時間後に実施した．この時点で，培養細胞を顕微鏡下で観察し本剤による形態変化と細胞毒性を評価した．陽性対照物質として，0.2 µg/mL のクロルプロマジンを使用した．

その結果，紫外線非照射下での 50%阻害濃度（IC_{50}）値は 25.7 µg/mL，紫外線照射下の IC_{50} 値は 10.3 µg/mL であり，Photo Irritation Factor は 2.50 及び Mean Photo Effect は 0.288 であった．

クロルプロマジンの Photo Irritation Factor は 31.9 であり，明らかな陽性反応が確認された．

OECD ガイドラインの基準に準拠し，本剤は光毒性物質と判定した [1]．

2.6.6.10　考察及び結論

安全性薬理試験において，本剤は，催痙攣及び抗痙攣作用を含む中枢神経系機能，呼吸器系機能及び腎・泌尿器系機能への毒性学的に問題となる影響はみられなかった．心血管系機能について，NETU の代謝物 M1 に起因すると考えられる軽微な影響が示唆されたものの，心電図における明らかな異常は認められなかった．高用量域で消化管運動の低下が認められたが，臨床用量域において問題となる可能性は低いと考えられた．以上から，安全性薬理試験において本剤の臨床使用における安全性上の問題点はないと考えられた．

反復毒性試験で発現した主な毒性変化は，ラットにおける肝重量の増加を伴う軽度な肝細胞の小葉中心性肥大及び細胞質の好酸性増加であったが，病理組織学的な壊死及び炎症を伴っていなかったことから毒性学的な有害作用とはみなさなかった．その他，特記すべき毒性所見はなく，反復投与試験において本剤の臨床使用における安全性上の問題はないと考えられた．

一連の遺伝毒性試験において，すべての試験で結果が陰性であったことから，ヒトでの遺伝毒性リスクはないと考えられた．

生殖発生毒性試験において，ラットの受胎能及び初期胚発生に影響はなかったものの，ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験において，胎児への影響がラットでは 35.68 mg/kg/day まで，ウサギでは 6.25 mg/kg/day まで確認された．これらの結果から，本剤はラット及びウサギの両種において胚・胎児発生に関する影響がみられていることから，妊娠している女性における生殖発生毒性の発現リスクを否定できないと考えた．

局所忍容性に関連する試験については，ヒト全血を用いた溶血性試験，ラットを用いた反復静脈内投与及びウサギを用いた静脈内・動脈内・傍静脈投与による忍容性確認試験，ウシ角膜を用いた眼刺激性試験，ウサギを用いた急性皮膚刺激性試験及びモルモットを用いた遅延性皮膚感作性試験を実施し，すべての試験において陰性又は良好な忍容性を示す結果が確認された．加えて，ラット及びイヌを用いた一連の反復投与毒性試験においても良好な局所忍容性が確認された．以上より，本剤は溶血性，眼及び皮膚刺激性及び皮膚感作性がなく，局所忍容性が高いことが示された．

その他試験として，光毒性試験が実施され，本剤は光毒性物質に分類された．モルモットを用いた能動的及び受動的アナフィラキシー試験において，本剤は抗原性を示さなかった．

2.6.6.11　図表

本文内の適切な箇所に記載した．

2.6.6.12　参考文献

1. COUNCIL REGULATION (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. 2008;L142:400-413.

アロカリス点滴静注　235 mg

第 2 部（モジュール 2）:
CTD の概要（サマリー）

2.6.7　毒性試験の概要表

大鵬薬品工業株式会社

目次

目次 2
2.6.7 毒性試験の概要表 4
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 12
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 13
2.6.7.3.1 Pro-NETU Cmax Data for pivotal studies 13
2.6.7.3.2 NETU Cmax Data for Pivotal Studies 14
2.6.7.3.3 M1 Cmax Data for Pivotal Studies 15
2.6.7.3.4 M2 Cmax Data for Pivotal Studies 16
2.6.7.3.5 M3 Cmax Data for Pivotal Studies 17
2.6.7.3.6 Pro-NETU AUC Data for Pivotal Studies 18
2.6.7.3.7 NETU AUC Data for Pivotal Studies 19
2.6.7.3.8 M1 AUC Data for Pivotal Studies 20
2.6.7.3.9 M2 AUC Data for Pivotal Studies 21
2.6.7.3.10 M3 AUC Data for Pivotal Studies 22
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチごとの一覧） 23
2.6.7.4.1 Drug Substance Toxicology 23
2.6.7.5 単回投与毒性試験 25
2.6.7.6 反復投与毒性試験：Non-Pivotal 試験 （用量設定試験） 25
2.6.7.6.1 Repeat dose toxicity – Non pivotal studies 25
2.6.7.7 反復投与毒性試験：Pivotal Studies 28
2.6.7.7.1 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats 28
2.6.7.7.2 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs 42
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 53
2.6.7.8.1 Bacterial Mutation Assay (Ames) 53
2.6.7.8.2 Chromosome Aberrations Assay 63
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 67
2.6.7.9.1 Micronucleus test in rats 67
2.6.7.10 がん原性試験 69
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：Non-pivotal（用量設定試験等） 69
2.6.7.11.1 Reproductive and developmental toxicity – Non pivotal studies 69
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 70
2.6.7.12.1 ICH-I in Rats 70
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 73
2.6.7.13.1 ICH-III in Rats 73
2.6.7.13.2 ICH-III in Rabbits 79

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 84
2.6.7.14.1 ICH-II in Rats 84
2.6.7.15 新生児を用いた試験 91
2.6.7.16 局所刺激性試験 91
2.6.7.16.1 Local tolerance 91
2.6.7.17 その他の毒性試験 94
2.6.7.17.1 Other toxicity studies 94

2.6.7 毒性試験の概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Single-Dose Toxicity								
None Conducted								
Repeat-Dose Toxicity (Non pivotal)								
Repeat-Dose	Rat/ Han Wistar	Intravenous	Phase 1 and 2: single dose Phase 3: 14 days	Phase 1: 11.90, 35.68, 71.36, 107.05 Phase 2: 71.36 Phase 3: 0, 11.90, 35.68, 71.36	No	[redacted], Italy	PNET-11-06	M 4.2.3.2.1
Repeat-Dose	Rat/ Han Wistar	Intravenous	2-week + 2-week recovery	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes	[redacted], Italy	PNET-11-21	M 4.2.3.2.2
Repeat-Dose	Dog/ Beagle	Intravenous	Phase 1: 3- 4 days Phase 2: 14 days	Phase 1: 3.57, 11.90, 23.78, 35.68 Phase 2: 0, 23.78	No	[redacted], Italy	PNET-11-07	M 4.2.3.2.3
Repeat-Dose	Dog/ Beagle	Intravenous	2-week + 2-week recovery	0, 1.19, 3.57, 11.90	Yes	[redacted], Italy	PNET-11-22	M 4.2.3.2.4
Repeat-Dose Toxicity (Pivotal)								
Repeat-Dose	Rat/ Han Wistar	Intravenous	4-week + 2-week recovery	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-18	M 4.2.3.2.5
Repeat-Dose	Dog / Beagle	Intravenous	4- week + 2-week recovery	0, 1.19, 3.57, 11.90	Yes	[redacted], France/ [redacted]. Italy	PNET-13-27	M 4.2.3.2.6

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Genotoxicity								
Ames Pro-NETU	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 4520 µg/ plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-12-04	M 4.2.3.3.1.1
Ames 不純物 F* Enriched Batch	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 4520 µg/ plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-15-36	M 4.2.3.3.1.2
Ames 不純物 D*	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 5000 µg/ plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-15-86	M 4.2.3.3.1.3
Ames 不純物 A*	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 5000 µg/ plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-16-08	M 4.2.3.3.1.4

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Ames 不純物 B*	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 3000 µg/ plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-16-09	M 4.2.3.3.1.5
Ames 不純物 C*	*Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	NA	Plate incorporation and pre-incubation modification assay ±S9	Up to 2000 µg/plate	Yes	[redacted], Italy	PNET-16-55	M 4.2.3.3.1.6
Chromosome Aberrations Pro-NETU	Cultured human lymphocytes	NA	-S9: 3 and 24 hours and +S9: 3 hours	3.53 to 452 µg/mL	Yes	[redacted], Italy	PNET-12-05	M 4.2.3.3.1.7
Chromosome Aberrations 不純物 F* Enriched Batch	Cultured human lymphocytes	NA	-S9: 3 and 24 hours and +S9: 3 hours	1.76 to 904 µg/mL	Yes	[redacted], Italy	PNET-15-37	M 4.2.3.3.1.8
Micronucleus Assay Pro-NETU	Rat / Sprague-Dawley	Intravenous	2 days	Preliminary: 31.7, 47.6, 71.3, 107.0 Main study: 26.8, 53.5, 107.0	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-49	M 4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity								
None Conducted								

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Reproductive and Developmental Toxicity								
ICH-I	Rat/ Han Wistar	Intravenous	Males treated 4 weeks prior and during pairing with females until the day before necropsy. Females treated 2 weeks prior and during pairing until mating. Subsequently, dosed from Day 0 until Day 7 *post coitum* and sacrificed on Day 15 p*ost coitum*	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-64	M4.2.3.5.1.1
ICH-III Pilot	Rat/ Han Wistar	Intravenous	Gestation days 6 - 17 p*ost coitum*	0, 11.90, 35.68, 71.36	No	[redacted], Italy	PNET-13-33	M4.2.3.5.2.1
ICH-III	Rat/ Han Wistar	Intravenous	Gestation days 6 - 17 *post coitum*	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-56	M4.2.3.5.2.2
ICH-III Pilot	Rabbit/ New Zealand White	Intravenous	Phase 1: 3 days Phase 2: 3 days Phase 3: 4 days Phase 4: 14 days	Phase 1: 3.57 Phase 2: 11.9 Phase 3: 22.6 Phase 4: 45.2	No	[redacted], Italy	PNET-13-30	M4.2.3.5.2.3
ICH-III pilot	Rabbit/ New Zealand White	Intravenous	Gestation days 6 – 19 (TK group only at day 6 and 19)	0, 11.3, 22.6, 45.2	No	[redacted], Italy	PNET-13-53	M4.2.3.5.2.4
ICH-III	Rabbit/ New Zealand White	Intravenous	Gestation days 6 – 19 (TK group only at day 6 and 19)	0, 2.83, 5.65, 11.3	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-71	M4.2.3.5.2.5

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
ICH-II	Rat/ Han Wistar	Intravenous	F0 generation from Day 6 *post coitum* to Day 20 *post partum*	0, 3.57, 11.90, 35.68	Yes	[redacted], Italy	PNET-15-85	M4.2.3.5.3.1
Pediatric Toxicity								
None Conducted								
Local Tolerance/Irritation/Sensitization/Anaphylaxis								
Blood Stability	Human, Dog and Rat Whole Blood	NA	~ 240 minutes	500 ng/mL	No	[redacted], China	NETU-10-13	M4.2.3.6.1
Local Tolerance	Rat/Sprague Dawley	Intravenous	7 days	2 mL/day of 0.9 mg/mL of Pro-NETU (= 1.81 mg Pro-NETU/ day) in 5% glucose solution	No	[redacted], China	NETU-09-08	M4.2.3.6.2

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Local Tolerance	Rat/Sprague Dawley	Intravenous	2 weeks	0.9 mg/mL in a volume of 2 mL/day (= 1.81 mg/rat/day Pro-NETU). Formulation 1: NETU HCl in 10% Captisol and 8% Solutol HS 15, Formulation 2: NETU HCl in 10% Captisol and 8% Tween 80, and Formulation 3: NETU HCl in 40% Ethanol and 8% Tween 80	No	[redacted], Italy	NETU-10-05	M4.2.3.6.3
Intravenous, Paravenous and Intra-arterial Tolerance Study	Rabbit/ New Zealand White	Intravenous, Paravenous, and Intra-arterial	Single dose	Intravenous = 0.5 mL of 11.8 mg/mL Pro-NETU solution Paravenous = 0.2 mL of 11.8 mg/mL Pro-NETU solution Intra-arterial = 0.5 mL of 11.8 mg/mL Pro-NETU solution	Yes	[redacted], Italy	PNET-14-12	M4.2.3.6.4
Acute Dermal Irritation Study in Rabbits	Rabbit/ New Zealand White	Dermal application	Single dose	11.8 mg/mL	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-44	M4.2.3.6.5

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Delayed Dermal Sensitisation Study in Guinea Pigs (Magnusson and Kligman Test)	Guinea pig/ Dunkin-Hartley	Preliminary tolerance phase and main study: Intradermal injection and topical application; Challenge: topical application	Single dose plus challenges	Preliminary tolerance phase: • Intradermal injection: 100, 50, 20, 10, 5 and 1% • Topical application: 100, 50, 20, 10 and 5% Main study: • Intradermal injection: 20% in vehicle or FCA* • Topical application: 100% Challenge phase: 100% *FCA= Freund's Complete Adjuvant	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-46	M4.2.3.6.6
Bovine Corneal Opacity/ Permeability Assay	Ex vivo: Bovine Corneas	NA	NA	11.8 mg/mL	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-65	M4.2.3.6.7
In vitro Hemolysis	Human Heparinized Blood	NA	10 minutes	452, 362, 271, 226, 181, 113, 57.4, 28.2, 14.0, 7.1 µg/mL	No	[redacted], China	NETU-09-18	M4.2.3.6.8

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location Section
Other Toxicity Studies								
Active Systemic Anaphylaxis Study in Guinea pig (ASA)	Guinea pig/ Dunkin-Hartley	Induction phase: IP; Challenge phase: Intravenous	Induction phase: 7 days, Rest period:11 days Challenge phase: single dose	Induction phase: 47.0 mg/kg Challenge phase: 11.8 mg/kg	Yes	[redacted], Italy	PNET-14-10	M4.2.3.7.1.1
Passive Cutaneous Anaphylaxis Study in Guinea pig	Guinea pig/ Dunkin-Hartley	Induction: Subcutaneous Anaphylactic antibodies assay: Intradermal Challenge: Intravenous	Single dose plus challenge dose	Induction phase: 29.4 mg/kg/day Challenge phase: 11.8 mg/mL	Yes	[redacted], Italy	PNET-14-11	M4.2.3.7.1.2
Balb/c 3T3 Cell Phototoxicity assay	*In vitro*: Balb/c 3T3 Clone A31	NA	1 hour	904, 452, 226, 113, 56.5, 28.3, 14.1, 7.1 µg/mL.	Yes	[redacted], Italy	PNET-13-66	M4.2.3.7.7.1

HEK= human embryonic kidney cells
NA= not applicable

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Fosnetupitant

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location Section
2-Week Toxicology	Rat	Intravenous	3.57, 11.90, 35.68	Yes	PNET-11-21	M4.2.3.2.2
2-Week Toxicology	Dog	Intravenous	1.19 , 3.57, 11.90	Yes	PNET-11-22	M4.2.3.2.4
4-Week Toxicology	Rat	Intravenous	3.57, 11.90, 35.68	Yes	PNET-13-18	M4.2.3.2.5
4-Week Toxicology	Dog	Intravenous	1.19 , 3.57, 11.90	Yes	PNET-13-27	M4.2.3.2.6
Reprotoxicity: ICH-III	Rat	Intravenous	3.57, 11.90, 35.68	Yes	PNET-13-56	M4.2.3.5.2.2
Reprotoxicity: ICH-III	Rabbit	Intravenous	2.83, 5.65, 11.30	Yes	PNET-13-71	M4.2.3.5.2.5

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

2.6.7.3.1 Pro-NETU Cmax Data for pivotal studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			4134	5811		
1.81						3297
2.83					30929	
3.57	7841	3042	11347	10932		
3.57		102.9*				
3.89						6431
5.65					51138	
5.88						9562
11.30					98138	
11.90	35550	5433	18630	13557		
11.90		46.2*				
35.68	71390	57290				
35.68		137.1*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.2 NETU Cmax Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			821	696		
1.81						389.7
2.83					915	
3.57	921	1046	3410	2540		
3.57		2723*				
3.89						840.8
5.65					1601	
5.88						1310
11.30					2435	
11.90	3393	2757	6861	4087		
11.90		3952*				
35.68	4703	4925				
35.68		4787*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.3 M1 Cmax Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			281	210		
1.81						11.98
2.83					105.8	
3.57	695	592	980	698		
3.57		457.6*				
3.89						26.12
5.65					124.1	
5.88						42.58
11.30					206.5	
11.90	1924	1140	6840	4202		
11.90		904.2*				
35.68	1977	1833				
35.68		1591*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.4 M2 Cmax Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			140	110		
1.81						83.91
2.83					88.4	
3.57	68	28	487	308		
3.57		22.63*				
3.89						172.0
5.65					267.8	
5.88						188.3
11.30					510.3	
11.90	140	107	700	728		
11.90		48.50*				
35.68	198	142				
35.68		118.5*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.5 M3 Cmax Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State C_{max} (ng/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			n.c.	n.c.		
1.81						27.66
2.83					70.0	
3.57	35	31	71	50		
3.57		22.26*				
3.89						54.05
5.65					103.8	
5.88						75.97
11.30					177.9	
11.90	132	81	262	164		
11.90		77.80*				
35.68	183	236				
35.68		171.9*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats
n.c.= not computable

2.6.7.3.6 Pro-NETU AUC Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			708	1060		
1.81						1483
2.83					15929	
3.57	438	204	1912	1786		
3.57		n.c.*				
3.89						2934
5.65					27382	
5.88						4349
11.30					50784	
11.90	1558	302	2858	2160		
11.90		n.c.*				
35.68	4385	3050				
35.68		n.c.*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats
n.c.= not computable

2.6.7.3.7 NETU AUC Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			6689	4853		
1.81						5205
2.83					4739	
3.57	10460	16609	20540	13468		
3.57		10036*				
3.89						12014
5.65					4586	
5.88						19647
11.30					8705	
11.90	35823	45422	85719	77957		
11.90		24504*				
35.68	43864	59329				
35.68		35815*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.8 M1 AUC Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			8070	5929		
1.81						999.8
2.83					628	
3.57	12689	10512	34325	23074		
3.57		3022*				
3.89						2326
5.65					782	
5.88						3749
11.30					1322	
11.90	38755	25603	176484	141875		
11.90		6744*				
35.68	41568	29870				
35.68		12144*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.9 M2 AUC Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			1298	907		
1.81						1115
2.83					391	
3.57	731	447	4888	3334		
3.57		150*				
3.89						2583
5.65					1268	
5.88						2554
11.30					2371	
11.90	2242	1226	12973	9502		
11.90		313*				
35.68	2610	2508				
35.68		813*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
*ICH-III in rats

2.6.7.3.10 M3 AUC Data for Pivotal Studies

Test Article: Fosnetupitant

Daily Dose (mg/kg)	Steady State AUC_{0-24} (ng·h/mL)					
	Rat[a]		Dog[a]		Pregnant Rabbit[a]	Human[b]
	Male	Female	Male	Female	Female	
1.19			-	-		
1.81						1593
2.83					437	
3.57	822	578	1643	842		
3.57		161.2*				
3.89						3454
5.65					775	
5.88						5198
11.30					1212	
11.90	2657	1817	6512	3738		
11.90		495*				
35.68	3592	4313				
35.68		1149*				

[a]Intravenous
[b]Study Number PNET-12-23 (assuming 60 kg Subjects; single dose).
Data are from the last TK collection after the last dose or during the last week of dosing, unless indicated.
- No noteworthy findings
*ICH-III in rats

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチごとの一覧）

2.6.7.4.1 Drug Substance Toxicology

Test Article: Fosnetupitant

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities	Study Number	Type of Study (Intravenous unless otherwise indicated)
PROPOSED SPECIFICATION:				
30005278	94.9	No major impurity	PNET-11-06	Preliminary 2-week rat
30005278	94.4	No major impurity	PNET-11-21	2-Week rat
30005278	94.9	No major impurity	PNET-11-07	Preliminary 2-week dog
30005278	94.4	No major impurity	PNET-11-22	2-Week dog
30005278	94.1	No major impurity	PNET-13-18	4-Week rat
32003228	96.7	No major impurity	PNET-13-27	4-Week dog
30005278	94.1	No major impurity	PNET-12-04	Ames test
30005278	93.6	No major impurity	PNET-12-05	Chromosome aberrations test
32003228	97.7	No major impurity	PNET-13-49	*In vivo* Micronucleus assay
32003228	97.7	No major impurity	PNET-13-64	Rat fertility and early embryonic development
32003228/30005278	96.7/94.6	No major impurity	PNET-13-33	Rat embryo-fetal development
32003068	97.8	No major impurity	PNET-13-56	Rat embryo-fetal development (main)
34003433	96.8	No major impurity	PNET-15-85	Rat pre- and postnatal development including maternal function
30005278/32003228	94.4/97.8	No major impurity	PNET- 13-30	Rabbit embryo-fetal development
30005278	94.6	No major impurity	PNET-13-53	Rabbit embryo-fetal development
32003228	97.8	No major impurity	PNET-13-71	Rabbit embryo-fetal development (main)

2.6.7.4.1 Drug Substance Toxicology（続き）

Test Article: Fosnetupitant

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities	Study Number	Type of Study (Intravenous unless otherwise indicated)
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-14-12	Intravenous, paravenous and intra-arterial tolerance study in rabbits
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-13-44	Rabbit acute dermal irritation study
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-13-46	Dermal sensitisation study in guinea pigs
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-13-65	Bovine corneal opacity/permeability (BCOP) assay
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-14-10	Active systemic anaphylaxis study in guinea pigs
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-14-11	Passive cutaneous anaphylaxis study in guinea pigs
116635/P40201A*	102.5	NA	PNET-13-66	Cell phototoxicity assay

NA: Not Applicable
*: Batch number of Pro-NETU lyophile

2.6.7.5 単回投与毒性試験

実施せず.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：Non-Pivotal 試験 （用量設定試験）

2.6.7.6.1 Repeat dose toxicity – Non pivotal studies

Test Article: Fosnetupitant

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender / No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Repeat dose toxicity – Non pivotal studies							
Rat/ Han Wistar	Intravenous	Phase 1 & 2: single dose Phase 3: 14 days	Phase 1: 11.90, 35.68, 71.36, 107.05 Phase 2: 71.36 Phase 3: 0, 11.90, 35.68, 71.36	Phase 1: M1 + F1/group Phase 2: M3 + F3/group Phase 3: M5 + F5/group	Not Determined	Pro-NETU 71.36 mg/kg/day: slight decrease in body weight, a slight increase in liver weight and some local injection site changes	PNET-11-06
Rat/ Han Wistar	Intravenous	2-week + 2-week recovery	0, 3.57, 11.90, 35.68	Treatment group: M10 + F10 Recovery (control + high dose): M5 + F5 TK: M15 + F15/ treated and M3 + F3/control	NOAEL 11.90 mg/kg/day for systemic effects and NOAEL 35.68 mg/kg/day for local effects	Slight toxic effects mainly affecting the liver in the high-dose group. However, completely reversible after the recovery period. Macroscopic observations: good local tolerability of the Test Article. Slight decreases in body weight and food consumption normalized after recovery period.	PNET-11-21

2.6.7.6.1 Repeat dose toxicity – Non pivotal studies（続き）

Test Article: Fosnetupitant

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender / No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Dog/ Beagle	Intravenous	Phase 1: 3-4 days Phase 2: 14 days	Phase 1: 3.57, 11.90, 23.78, 35.68 Phase 2: 0, 23.78	Phase 1: M1 + F1/group Phase 2: M2 + F2 /group	Not determined	Phase 1: MTD = 35.68 mg/kg/day, due to effects on body weight and food consumption. Phase 2: No mortality and no clinical signs of toxicological significance were observed. Pro-NETU at 23.78 mg/kg/day: slight reduction in body weight in both sexes, associated with decreased food intake.	PNET-11-07

2.6.7.6.1 Repeat dose toxicity – Non pivotal studies（続き）

Test Article: Fosnetupitant

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender / No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Dog/ Beagle	Intravenous	2-week + 2-week recovery	0, 1.19, 3.57, 11.90	Treatment group M3 + F3 Recovery (control + high-dose): M2 + F2	11.90 mg/kg/day for systemic and local effects	No mortality and no treatment-related clinical signs were observed. Decrease in body weight observed in males of the high-dose group (-12%). Female animals, including controls: slight decrease in body weight. Slight decrease in food consumption observed in mid- and high dose males starting from week 1. No treatment-related changes in food consumption observed in females groups. During recovery period: no effects observed in body weight and food intake in both sexes. No changes of toxicological significance were recorded at water consumption measurements, ophthalmoscopy, physical examinations and electrocardiographic evaluation. Clinical pathology evaluation and other examinations did not reveal any treatment-related changes. No remarkable changes were observed at *post mortem* in organ weights analysis and macroscopic and microscopic investigations.	PNET-11-22

2.6.7.7 反復投与毒性試験：Pivotal Studies

2.6.7.7.1 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats followed by a 2 Week Recovery Period

Study Number: PNET-13-18 Location in CTD: Section 4.2.3.2.5

GLP Compliance: Yes Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain: Rat/Wistar Hannover

Initial Age at the start of treatment: 6/8 weeks

Date of First Dose:

Main groups 27 June 2013

Satellite groups 25 June 2013

Duration of Dosing: 4 weeks

Duration of Postdose: 2 weeks

Method of Administration: intravenous

Vehicle/Formulation glucose 5%: water for injection, NaOH, HCl

Test Facility: [redacted] (Italy)

GLP Compliance: Yes

Special Features: None

No Observed Effect Level: The NOEL could be considered as 11.90 mg/kg/day for systemic and local effects for both sexes.

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase) Toxicokinetic groups	 10 5 3	 10 0 12	 10 0 12	 10 5 12	 10 5 3	 10 0 12	 10 0 12	 10 5 12
Noteworthy Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Unscheduled deaths	1 (Day 1)	0	0	1 (Day 11)	0	0	0	1 (Day 18)

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4). On Day 29 Brain was collected.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	11
Pro-NETU (204-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
C_{max} (ng/mL)	1839±1493	7841±4477	14140±8599	35550±4576	43560±10190	71390±40970
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	195	438	1283	1558	3584	4385
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	
Pro-NETU (204-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.083	0.017
C_{max} (ng/mL)	4355±1326	3042±2069	4718±2616	5433±6462	20560±9570	57290±18780
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	257	204	402	302	3547	3050

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	11
NETU (14-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
C_{max} (ng/mL)	922±67.5	921±412	3779±1313	3393±174	7059±2180	4703±1390
AUC_{0-24}(ng·h/mL)	8474	10460	14795	35823	43376	43864
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	
NETU (14-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.083	0.017	0.083	0.017	0.083	0.017
C_{max} (ng/mL)	1019±791	1046±305	2657±1529	2757±1604	7086±1119	4925±1047
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	11232	16609	19773	45422	52386	59329

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	11
Metabolite 1 (M1)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	24	24	24	24	24	Pre-dose
C_{max} (ng/mL)	177±30	695±215	400±61	1924±831	650±21	1977±260
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	2976	12689	6377	38755	10766	41568
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	
Metabolite 1 (M1)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	24	24	24	24	24	Pre-dose
C_{max} (ng/mL)	129±10	592±79	265±27	1140±409	417±37	1833±525
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	2080	10512	3865	25603	5782	29870

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	11
Metabolite 2 (M2)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.5	0.5	1	0.25	0.5	1
C_{max} (ng/mL)	60±14	68±16	166±32	140±2	460±75	198±47
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	123	731	1414	2242	3648	2610
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	
Metabolite 2 (M2)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	2
C_{max} (ng/mL)	36±15	28±10	75±18	107±12	224±69	142±61
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	51	447	473	1226	1207	2508

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	11
Metabolite 3 (M3)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	4	24	4	4	4	4
C_{max} (ng/mL)	14±1	35±7	45±10	132±39	77±8	183±34
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	197	822	926	2657	1750	3592
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57		11.90		35.68	
Number of Animals: Toxicokinetic groups	12		12		12	
Metabolite 3 (M3)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	n.c.	24	24	24	24	24
C_{max} (ng/mL)	n.c.	31±7	17±2	81±8	35±9	236±30
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	n.c.	578	275	1817	453	4313

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57 Day 29					11.90 Day 29					35.68 Day 29				
Number of Animals: Toxicokinetic groups	10					10					10				
	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3
Brain Conc (ng/g)	BLOQ	562	413	BLOQ	21	107*	1317	989	BLOQ	49	BLOQ	4557	3408	BLOQ	140
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	3.57 Day 29					11.90 Day 29					35.68 Day 29				
Number of Animals: Toxicokinetic groups	10					10					10				
	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3
Brain Conc (ng/g)	BLOQ	774	402	BLOQ	17	BLOQ	2284	1171	BLOQ	57	BLOQ	6849	3725	BLOQ	201

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
Conc (ng/g) = concentration (ng/g)
BLOQ = below the limit of quantification
n.c. = not computable
* = value of one animal detected

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase)	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5
Clinical Observations - Main groups Treatment Phase Scab/s on the tail (no. of animals) Recovery phase Scab on the tail (no. of animals)	 0 0	 0 n/a	 0 n/a	 5 0	 0 0	 0 n/a	 0 n/a	 3 2

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
* $p<0.05$ ** $p<0.01$

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase)	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5
Bw (ga) – Treatment Phase – Main groups Bw (ga) – Recovery phase – Main groups	- -	- n/a	- n/a	- -	- -	- n/a	- n/a	- -
Food Consumption (g/animal/daya) - Main groups (Treatment Phase) - Day 8 - Day 15	 - 23.36	 - -	 - -	 - 21.63* (-7%)	 16.64 16.95	 - -	 - -	 14.03** (-16%) 14.04** (-17%)
Food Consumption (g/animal/daya) - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-
Water Consumption (g/animal/daya) - Main groups (Treatment Phase) - Day 23 (week 4)	 -	 -	 -	 -	 25.49	 29.58** (+16%)	 -	 28.91** (+13%)
Water Consumption (g/animal/daya) - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
Bw= Body weight
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
* p<0.05 ** p<0.01
a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).

b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase)	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5
Ophthalmoscopy – Main groups	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology a –Main groups (Treatment Phase) Hematology a - Main groups (Recovery phase)	- -	- n/a	- n/a	- -	- -	- n/a	- n/a	- -
Serum Chemistry a- Main groups (Treatment Phase) - Total Bilirubin (mg/dl)	-	-	-	-	0.042	-	0.016** (-62%)	0.011** (-74%)
Serum Chemistry a - Main groups (Recovery phase) - Total Bilirubin (mg/dl)	0.036	n/a	n/a	0.010** (-72%)	0.038	n/a	n/a	0.020 (-47%)

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
* $p<0.05$ ** $p<0.01$
a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).
b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase)	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5
Urinalysis - Main groups (Treatment Phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-
Terminal body weight - Final sacrifice - Main groups (Treatment Phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights - Main groups (Treatment Phase)								
Absolute organ weight a- Final sacrifice								
- Liver (g)	-	-	-	-	7.404	-	-	8.553* (+16%)
- Thymus (g)	0.5866	-	-	0.4367** (-26%)	-	-	-	-
Relative organ weight b- Final sacrifice								
- Liver (%)	3.433	-	-	3.874** (+13%)	3.393	-	-	4.174** (+23%)
- Thymus (%)	0.1733	-	-	0.1387* (-20%)	-	-	-	-

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.

n/a = not applicable

- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).

b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) Main groups (Recovery phase)	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5	 10 5	 10 0	 10 0	 10 5
Terminal body weight - Recovery sacrifice - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-
Organ Weights - Recovery sacrifice - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-
Gross Pathology - Final sacrifice (incidence) - Main groups (Treatment Phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology - - Recovery sacrifice - Main groups (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
  * $p<0.05$ ** $p<0.01$
a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).
b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.
c = Entries flagged with a - (minus) are significantly higher than control at the 0.05 level using the Kolmogorov-Smirnov one-tailed test.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals:								
Main groups (Treatment Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Main groups (Recovery phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Histopathology c - Final sacrifice - Main groups (Treatment Phase)								
Liver - Number of animals examined:	9	10	10	10	10	10	10	9
-Inflammatory cell foci	0	1	2	1	0	1	2	1
-Hepatocytic Hypertrophy	0	0	-10	-10	0	0	0	-8
-Chronic Inflammation	0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus - Number of animals examined:	9	10	10	10	10	n/a	n/a	9
-Congestion	0	0	2	0	0			0
-Atrophy	0	0	0	5	0			0

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
* $p<0.05$ ** $p<0.01$
a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).
b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.
c = Entries flagged with a - (minus) are significantly higher than control at the 0.05 level using the Kolmogorov-Smirnov one-tailed test.

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4 Week Intravenous Toxicity Study in Rats Followed by a 2 Week Recovery Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of Animals:								
Main groups (Treatment Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Main groups (Recovery phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Histopathology - Recovery sacrifice - Main groups (Recovery phase)								
Liver - Number of animals examined:	5	n/a	n/a	5	5	n/a	n/a	5
-Inflammatory cell foci	0			0	1			0
-Hepatocytic Hypertrophy	0			0	0			0
-Chronic Inflammation	0			0	0			0
Thymus - Number of animals examined:	5	n/a	n/a	5	0	n/a	n/a	0
-Congestion	0			0				
-Atrophy	0			0				

Satellite groups were used for toxicokinetics on Day 1 and Day 28 of the study (week 4), and for brain collection on Day 29.
n/a = not applicable
- No noteworthy findings + = Mild ++ = Moderate +++= Marked
* $p<0.05$ ** $p<0.01$
a = For controls, group mean values are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance, when present, is based on actual data (not on the percent differences).
b = Group mean relative organ weights are shown for the controls. Relative weights different from the control group are indicated for treated groups. Statistical significance is based on actual data.
c = Entries flagged with a - (minus) are significantly higher than control at the 0.05 level using the Kolmogorov-Smirnov one-tailed test.

2.6.7.7.2 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Study Number: PNET-13-27

Location in CTD: Section 4.2.3.2.6

GLP Compliance:Yes

Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain: Dog/Beagle

Duration of Dosing: 4 weeks

Test Facility: [redacted]

Initial Age at the start of treatment: 7 months

Duration of Postdose: 2 weeks

Date of First Dose:

Male groups: 07-Aug-2013

Female groups: 08-Aug-2013

Method of Administration: intravenous

Vehicle/Formulation glucose 5%: water for injection, NaOH, HCl

Special Features: None

No Observed AdverseEffect Level: The NOAEL was considered as 11.90 mg/kg/day for systemic and local effects for both sexes.

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1.19	3.57	11.90	0 (Control)	1.19	3.57	11.90
Number of Animals: Main Groups (Treatment phase) (Recovery phase)	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2
Noteworthy Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Unscheduled deaths	-	-	-	-	-	-	-	-

- = no noteworthy findings

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Pro-NETU (204-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0
C_{max} (ng/mL)	2273±1308	4134±822	5667±2311	11347±591	10968±2232	18630±2541
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	435±293	708±16	956±304	1912±110	1969±499	2858±310
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Pro-NETU (204-NETU)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0	0.05±0
C_{max} (ng/mL)	1741±1157	5811±3629	5121±1943	10932±5132	8112±1721	13557±1003
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	346±238	1060±577	899±416	1786±874	1311±315	2160±27

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)		1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:		3		3		3	
NETU		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
(14-NETU)	T_{max} (h)	0.05±0	0.53±0.67	0.25±0	0.20±0.26	0.18±0.12	1±0.87
	C_{max} (ng/mL)	655±2	821±82	1627±203	3410±268	5490±1875	6861±2333
	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	2662±631	6689±2874	8077±632	20540±1819	30998±6474	85719±62550
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)		1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:		3		3		3	
NETU		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
(14-NETU)	T_{max} (h)	0.05±0	0.18±0.12	0.27±0.23	0.18±0.12	0.27±0.23	0.20±0.26
	C_{max} (ng/mL)	555±88	696±221	1975±2142	2540±781	5206±1829	4087±433
	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	2635±954	4853±2530	6904±3174	13468±5431	23997±5189	77957±18044

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 1 (M1)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	6±2.83	4.13±5.48	13.3±9.24	3.5±3.97	18.67±9.24	0.33±0.29
C_{max} (ng/mL)	87±7	281±37	273±46	980±27	1153±233	6840±4810
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	1626±278	8070±3107	5563±1353	34325±7061	21343±2995	176484±154579
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 1 (M1)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	8±0	4±3.46	13.3±9.24	5.5±4.33	13.3±9.24	17.33±26.63
C_{max} (ng/mL)	94±52	210±85	239±183	698±321	753±130	4202±1372
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	1656±851	5929±2589	4508±3593	23074±14466	15309±3644	141875±20729

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 2 (M2)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	2±0	1±0	1.67±0.58	2±0	1.33±0.58	1.5±0.87
C_{max} (ng/mL)	88.5±3.54	140±42	330±134	487±112	1391±423	700±230
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	755±14.14	1298±242	1858±580	4888±1630	8698±4230	12973±10733
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 2 (M2)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	2.67±1.15	2±0	1.7±0.58	1.67±0.58	1.17±0.76	1.67±0.58
C_{max} (ng/mL)	87±46	110±58	225±146	308±184	950±139	728±193
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	771±373	907±626	1323±1136	3334±1724	5352±1432	9502±4018

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 3 (M3)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	-	-	6±3.46	2.67±1.15	17.33±11.55	1.42±1.01
C_{max} (ng/mL)	-	-	32±10	71±5	134±60	262±35
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	-	-	356±190	1643±46	2228±346	6512±1874
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	1.19		3.57		11.90	
Number of Animals:	3		3		3	
Metabolite 3 (M3)	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
T_{max} (h)	-	-	8±0	5.33±2.31	6.67±2.31	1.17±0.76
C_{max} (ng/mL)	-	-	31±20	50 ±27	67±13	164±50
AUC_{0-24} (ng·h/mL)	-	-	504±602	842±475	1187±213	3738±1302

- = not computable

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	1.19 Day 30					3.57 Day 30					11.90 Day 30				
Number of Animals:	3					3					3				
Heart (ventricles) Conc (ng/g)	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3
	BLOQ	196	638	BLOQ	BLOQ	BLOQ	534	1674	BLOQ	31	BLOQ	1949	18993	BLOQ	238
Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Females)	1.19 Day 30					3.57 Day 30					11.90 Day 30				
Number of Animals:	3					3					3				
Heart (ventricles) Conc (ng/g)	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3	204-NETU	14-NETU	M1	M2	M3
	BLOQ	114	302	BLOQ	BLOQ	BLOQ	454	1381	BLOQ	38.1	BLOQ	2501	20983	BLOQ	244

Main groups animals were used for toxicokinetics on Day 28 up to 48 hours after the last administration, then heart was collected and analysed.
Conc (ng/g) = concentration (ng/g) as mean group values
BLOQ = below the limit of quantification

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1.19	3.57	11.90	0 (Control)	1.19	3.57	11.90
Number of Animals: Main Groups (Treatment phase) (Recovery phase)	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2
Clinical observations	No treatment-related changes							
Body weight (absolute) %1 Day 1- 28 Recovery	 +9.1 -	 +3.9 n/a	 +5.1 n/a	 +1.5 -	 +8.6 -	 +1.3 n/a	 +4.3 n/a	 -3.4 -
Group Mean body weight change (g) Day 1- 28 Recovery	 +360 +470	 +310 n/a	 +300 n/a	 +10 +310	 +410 +190	 +30 n/a	 +170 n/a	 **-290***** +590
Food consumption(%)2 Day 8- 15 Recovery	 148.5 -	 **-20%** n/a	 - n/a	 **-43%** -	 182.7 -	 - n/a	 - n/a	 **-22%*** -

- = No noteworthy findings n/a = not applicable
Statistical significance = * p≤0.05, *** p≤0.001
In bold = treatment-related changes
[1]: Results are expressed as percent differences from pretest values.
[2]: For control animals group means are expressed in g/animal/day whereas for treated groups changes are expressed in percentage compared to pretest phase. Statistical significance, when present is based on actual data (not based on the percent difference).

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1.19	3.57	11.90	0 (Control)	1.19	3.57	11.90
Number of Animals: Main Groups (Treatment phase) (Recovery phase)	 3 2	 3 -	 3 -	 3 2	 3 2	 3 -	 3 -	 3 2
Opthalmology	No treatment-related findings							
Electrocardiography	No treatment- related findings in Heart rate , QT, PR, QRS, RR and JT intervals							
Clinical Chemistry	No treatment-related findings							
Urinalysis	No treatment-related findings							

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1.19	3.57	11.90	0 (Control)	1.19	3.57	11.90
Number of Animals: Main groups (Treatment Phase) (Recovery phase)	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2
Terminal body weight (Treatment phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weight [3] Treatment Phase - Kidney Absolute (g) Relative % to body weight to brain weight	 - 	 - 	 - 	 - 	 31.386 0.4572 48.1787	 - 	 - 	 27.250 0.4517 38.4349* (-20%)
- Lung Absolute (g) Relative % to body weight to brain weight	 - 	 - 	 - 	 - 	 60.667 0.8831 93.1272	 - 	 - 	 51.4 0.8511 72.5601* (-22%)
- Ovary Absolute (g) Relative % to body weight to brain weight	 - 	 - 	 - 	 - 	 0.631 0.0094 0.9781	 - 	 0.868* 0.0135 1.2653	 0.418 0.0069 0.5899* (-40%)
- Thymus Absolute (g) Relative % to body weight to brain weight	 - 	 - 	 - 	 - 	 9.04 0.1316 13.8749	 **5.522* (-39%)** **0.0848* (-36%)** **7.6136** (-45%)**	 **5.791* (-36%)** **0.0894* (-32%)** **8.4533* (-39%)**	 **5.247* (-42%)** **0.0868* (-34%)** **7.4222** (-47%)**
Terminal body weight (Recovery phase)	-	n/a	n/a	-	-	n/a	n/a	-
Organ weight	No treatment-related findings							

3 Group mean are shown. For treated groups percent differences from controls are shown.
Statistical significance = * p≤0.05, ** p≤0.01
- = no animal affected
In bold = treatment-related changes
n/a = not applicable

Repeat-Dose Toxicity

Report Title: 4-Week Intravenous Administration Toxicity Study in Dogs with a 2-week Treatment-Free Period

Test Article: Fosnetupitant [redacted] [redacted]

	Males				Females			
Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1.19	3.57	11.90	0 (Control)	1.19	3.57	11.90
Number of Animals: Main Groups (Treatment phase) (Recovery phase)	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2	 3 2	 3 0	 3 0	 3 2
HistoPathology Treatment Phase								
Number of animals examined:	3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus								
Atrophy	-	-	-	**3+**	-	-	-	**1+**
Necrosis	-	-	-	**1+/-**	-	-	-	**1+/-**
HistoPathology (Recovery phase)								
Number of animals examined:	2	n/a	n/a	2	2	n/a	n/a	2
	No treatment-related findings							

n/a = not applicable
- = no animal affected
+/-= minimal; + = mild
In bold = treatment-related changes

2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 Bacterial Mutation Assay (Ames)

2.6.7.8.1.1 Bacterial Mutation Assay (Ames) of Pro-NETU

Report Title: Bacterial Mutation Assay. Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-12-04 Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.1

GLP Compliance: Yes Date of Treatment: April 13, 2012

Test for Induction of	Reverse gene mutation			No. of Independent Assays	1		
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*			No. of Replicate Cultures	3		
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system			No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable		
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)			For Positive Controls	Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)		
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours						
Cytotoxic Effects	Toxicity was observed only with TA100 tester strain at the highest dose level, both in the absence and presence of S9 metabolism.						
Genotoxic Effects	No mutagenesis						
Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate) 0	285	565	1130	2260	4520
Without Activation	Pro-NETU	-	-	-	-	-	-
With Activation	Pro-NETU	-	-	-	-	-	-

2.6.7.8.1.2 Bacterial Mutation Assay (Ames) of 不純物 F* -enriched batch

Report Title: Fosnetupitant bacterial mutation assay.

Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-15-36

Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.2

GLP Compliance: Yes

Date of Treatment: June 30, 2015

Test for Induction of	Reverse gene mutation	No. of Independent Assays	1
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	No. of Replicate Cultures	3
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)	For Positive Controls	Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours		
Cytotoxic Effects	Toxicity was observed only with TA100 tester strain at the highest dose level, both in the absence and presence of S9 metabolism.		
Genotoxic Effects	No mutagenesis		

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate) 0	313	625	1250	2500	5000
Without Activation	[redacted]-enriched batch	-	-	-	-	-	-
With Activation	[redacted]-enriched batch	-	-	-	-	-	-

-: concentration tested, no noteworthy findings

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.8.1.3 Bacterial Mutation Assay (Ames) of 不純物 D*

Report Title:不純物D*bacterial mutation assay　　Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-15-86　　Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.3

GLP Compliance: GLP　　Date of Treatment: October 30, 2015

Test for Induction of	Reverse gene mutation	No. of Independent Assays	1
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	No. of Replicate Cultures	3
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)	For Positive Controls Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)	
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours		
Cytotoxic Effects	Toxicity, as indicated by thinning of background lawn, reduction in the number of revertant colonies and/or microcolony formation, was observed with TA1535, TA1537 and TA100, at higher dose levels, both in the absence and presence of S9 metabolism. A slighter toxic effect was observed with WP2*uvrA* and TA98 tester strains, showing thinning of the background lawn and/or reduction in revertant numbers at the highest or two highest dose levels, both in the absence and presence of S9 metabolism.		
Genotoxic Effects	No mutagenesis		

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

Genotoxicity

Report Title:不純物 D* bacterial mutation assay

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-15-86

Metabolic Activation	Test Article	Tester strain	Concentration (μg/plate) 0	7.81	15.6	31.3	62.5	125	156	313	250	500	625	1000	1250	2000	2500	5000
±	不純物 D*	TA1535	-				-	-			-	-		-		-		
-	不純物 D*	TA1537	-	-	-	-	-	-			-							
+	不純物 D*	TA1537	-		-	-	-	-			-	-						
±	不純物 D*	TA98	-							-			-		-		-	-
-	不純物 D*	WP2*uvrA*	-							-			-		-		-	-
+	不純物 D*	WP2*uvrA*	-						-	-			-		-		-	-
-	不純物 D*	TA100	-		-	-	-	-			-	-						
+	不純物 D*	TA100	-			-	-	-			-	-		-				

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.8.1.4 Bacterial Mutation Assay (Ames) of [redacted](不純物 A*)

Report Title: [redacted] (不純物A*) bacterial mutation assay　　Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-16-08　　Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.4

GLP Compliance: GLP　　Date of Treatment: February 25, 2016

Test for Induction of	Reverse gene mutation	No. of Independent Assays	1
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	No. of Replicate Cultures	3
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)	For Positive Controls	Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours		
Cytotoxic Effects	Severe to moderate toxicity was observed with all tester strains, at higher dose levels, in the absence and presence of S9 metabolism.		
Genotoxic Effects	An increase in the number of revertant colonies was observed at concentrations up to the moderately toxic ones, with TA1535 and TA100 tester strains, in the presence of S9 metabolism, and with TA98, both in the absence and presence of S9 metabolic activation.		

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

Genotoxicity

Report Title: 不純物 A* bacterial mutation assay

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-16-08

Metabolic Activation	Test Article	Tester strain	Concentration (μg/plate) 0	78.1	156	313	625	1250	2500	5000
-	不純物 A*	TA1535	-		-	-	T	T	*	*
+	不純物 A*	TA1535	-		-	+	+T	T	*	
±	不純物 A*	TA1537	-	-	-	-	T	MIC	*	
-	不純物 A*	TA98	-		-	-	+T	MIC	*	
+	不純物 A*	TA98	-		-	-	T	T	*	
-	不純物 A*	WP2*uvrA*	-		-	-	-	-	T	*
+	不純物 A*	WP2*uvrA*	-		-	-	-	-	T	
-	不純物 A*	TA100	-		-	-	T	T	*	
+	不純物 A*	TA100	-	-	-	-	T	+T	*	

+: concentration tested, mutagenicity present
-: concentration tested, no noteworthy findings
T: thinning of the background lawn
*: total lack of the background lawn
MIC: microcolony
NT: not tested

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.8.1.5 Bacterial Mutation Assay (Ames) of 不純物 B*

Report Title: 不純物 B* bacterial mutation assay. Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-16-09 Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.5

GLP Compliance: GLP Date of Treatment: March 22, 2016

Test for Induction of	Reverse gene mutation	No. of Independent Assays	1
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	No. of Replicate Cultures	3
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)	For Positive Controls	Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours		
Cytotoxic Effects	Severe to moderate toxicity was observed with all tester strains, at higher dose levels, in the absence and presence of S9 metabolism.		
Genotoxic Effects	不純物 B* induced reverse mutation in *Salmonella typhimurium* tester strain in the absence or presence of S9 metabolism, with the exception of TA1537, at higher dose levels.under the reported experimental conditions.		

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

Genotoxicity

Report Title:不純物 B* bacterial mutation assay

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-16-09

Metabolic Activation	Test Article	Tester strain	Concentration (μg/plate) 0	31.3	62.5	93.8	125	188	250	375	500	750	1000	1500	3000
±	不純物 B*	TA1535	-	-	-		-		-		+T		+T		
±	不純物 B*	TA1537	-	-	-		-		-		T		T		
±	不純物 B*	TA100	-	-	-		-		+		+T		+T		
-	不純物 B*	TA98	-	-	-		-		-		-		+T		
+	不純物 B*	TA98	-	-	-		-		-		T		T		
±	不純物 B*	WP2*uvrA*	-			-		-		-		-		-	T

+: concentration tested, mutagenicity present
-: concentration tested, no noteworthy findings
T: thinning of the background lawn
*: total lack of the background lawn
MIC: microcolony
NT: not tested

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.8.1.6 Bacterial Mutation Assay (Ames) of 不純物 C*

Report Title:不純物 C* bacterial mutation assay. Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-16-55 Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.6

GLP Compliance: GLP Date of Treatment: November 08, 2016

Test for Induction of	Reverse gene mutation	No. of Independent Assays	1
Strains	Test cells: *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA98, TA100 and *Escherichia coli* WP2*uvrA*	No. of Replicate Cultures	3
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	Not Applicable
Vehicles For Test Article	DMSO (Dimethylsulfoxide)	For Positive Controls	Distilled water, DMSO (sodium azide, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methylmethanesulphonate, 2-aminoanthracene)
Treatment:	Plate incorporation and preincubation version of Ames test. Incubation of plates at 37˚C for 72 hours		
Cytotoxic Effects	Severe toxicity was observed with all tester strains at higher dose levels, both in the absence and presence of S9 metabolism. No increases in the number of revertant colonies were noticed with any tester strain, at any dose level, in the absence or presence of S9 metabolic activation		
Genotoxic Effects	No mutagenesis		

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

Genotoxicity

Report Title: 不純物 C*bacterial mutation assay

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-16-55

Metabolic Activation	Test Article	Tester strain	Concentration (μg/plate) 0	1.5	3.9	7.81	15.6	31.3	62.5	125	250	500	1000	2000
-	不純物 C*	TA1535	-			-	-	-	-	-	-			
+	不純物 C*	TA1535	-					-	-	-	-	-	-	
-	不純物 C*	TA1537	-		-	-	-	-	-	-				
+	不純物 C*	TA1537	-			-	-	-	-	-	-			
±	不純物 C*	WP2*uvrA*	-			-	-	-	-	-	-			
±	不純物 C*	TA98	-						-	-	-	-	-	-
-	不純物 C*	TA100	-	-	-	-	-	-	-					
+	不純物 C*	TA100	-		-	-	-	-	-	-				

-: concentration tested, no noteworthy findings

* 新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.7.8.2 Chromosome Aberrations Assay

2.6.7.8.2.1 Chromosome aberrations assay of Pro-NETU

Report Title: Fosnetupitant chromosome aberrations in human lymphocytes cultured *in vitro*　　Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-12-05　　Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.7

GLP Compliance: GLP　　Date of Treatment: June 18, 2012

Test for Induction of	Clastogenic activity	No. of Independent Assays	2
Strains	Human lymphocyte	[redacted]	[redacted]
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	1000 cells
Vehicles For Test Article	1% DMSO	For Positive Controls	Mitomycin-C and Cyclophosphamide in injectable grade distilled water

Main experiment: 1

Treatment time: 3 hours

Sampling time: 24 hours

Treatment	Dose µg/mL	Presence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)	Absence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)
Untreated	-	0.0 (95)	0.0 (129)
Solvent	1%	0.5 (100)	0.0 (100)
Test Article	113	0.0 (97)	0.0 (124)
Test Article	226	0.5 (87)	0.0 (109)
Test Article	452	0.0 (93)	0.0 (84)
Mitomycin C	0.500	-	18.0 *** (78)
Cyclophosphamide	18.0	20.5*** (49)	-

Genotoxicity *in vitro*

Report Title: Fosnetupitant chromosome aberrations in human lymphocytes cultured *in vitro*

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-12-05 [redacted]

Main experiment: 2

Treatment time: 24 hours

Sampling time: 24 hours

Treatment	Dose µg/mL	Presence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)	Absence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)
Untreated	-	-	0.5 (113)
Solvent	1%	-	0.0 (100)
Test Article	14.1	-	1.0 (85)
Test Article	28.3	-	0.5 (63)
Test Article	56.5	-	0.0 (26)
Mitomycin C	0.300	-	20.0 *** (45)

% CA : Percentage of cells bearing aberrations (excluding gaps)
Rel.MI : Mitotic Index relative to solvent controls (percent)
- : Not tested or not selected for the scoring of aberrations
* : Statistically significant at P<0.05
** : Statistically significant at P<0.01
*** : Statistically significant at P<0.001

2.6.7.8.2.2 Chromosome aberrations assay of 不純物 F *-enriched batch

Report Title: ProNetupitant Phosphate Chromosome aberration in human lymphocytes cultured *in vitro*　　Test Article: Fosnetupitant

Study Number: PNET-15-37　　Location in CTD: Section 4.2.3.3.1.8

GLP Compliance: GLP　　Date of Treatment: July 1, 2015

Test for Induction of	Clastogenic activity	No. of Independent Assays	2
Strains	Human lymphocyte	[redacted]	[redacted]
Metabolizing System	Rat liver metabolizing system	No. of Cells Analyzed/Culture	1000 cells
Vehicles For Test Article	1% DMSO	For Positive Controls	Mitomycin-C and Cyclophosphamide in injectable grade distilled water

Main experiment: 1

Solvent: DMSO

Treatment time: 3 hours

Sampling time: 24 hours

Treatment	Dose µg/mL	Presence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)	Absence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)
Solvent	1%	0.0 (100)	0.0 (100)
Test Article	401	0.0 (104)	0.0 (116)
Test Article	603	0.0 (110)	0.3 (98)
Test Article	904	0.0 (87)	0.0 (27)
Cyclophosphamide	18.0	24.7 *** (23)	-

% CA : Percentage of cells bearing aberrations (excluding gaps)
Rel.MI : Mitotic Index relative to solvent controls (percent)
- : Not tested or not selected for the scoring of aberrations
* : Statistically significant at P<0.05, ** : Statistically significant at P<0.01, *** : Statistically significant at P<0.001

＊ 新薬承認情報提供時に置き換えた

Genotoxicity *in vitro*

Report Title: ProNetupitant Phosphate Chromosome aberration in human lymphocytes cultured *in vitro*

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-15-37　　[redacted]

Main experiment: 2

Solvent: DMSO

Treatment time: 24 hours

Sampling time: 24 hours

Treatment	Dose µg/mL	Presence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)	Absence of S9 metabolism % CA (Rel. MI)
Solvent	1%	-	0.0 (100)
Test Article	14.1	-	0.0 (129)
Test Article	28.3	-	0.0 (127)
Test Article	56.5	-	0.0 (75)
Mitomycin C	0.450	-	30.5 *** (51)

% CA : Percentage of cells bearing aberrations (excluding gaps)
Rel.MI : Mitotic Index relative to solvent controls (percent)
- : Not tested or not selected for the scoring of aberrations
* : Statistically significant at P<0.05, ** : Statistically significant at P<0.01, *** : Statistically significant at P<0.001

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 Micronucleus test in rats

Report Title: Micronucleus Test in Rat

Study Number: PNET-13-49　　Location in CTD: Section 4.2.3.3.2.1

GLP Compliance: GLP　　Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain:	Sprague-Dawley SD rats	[redacted]	
Test for Induction of Micronuclei in Bone Marrow Cells		Treatment Schedule: Repeated dose - Test Article: 0h, 24h - Positive control : Single dose	
Sampling Time:	24 hours after the last administration	No. of Independent Assays: 1	
		Test Facility: [redacted] (Italy)	
Age	7-8 weeks	Method of Administration: Intravenous	
Cells Evaluated	Erythrocytes	Vehicle for test article	5% glucose in distilled water
Positive Control	Mitomycin-C	Vehicle for positive control	Sterile water of injectable grade
Special features	Formulation analysis (content check and stability) - Blood sampling for plasma analysis of Pro-NETU (204-NETU), NETU and 3 metabolites		
No. of Cells Analyzed/Animal	At least 2000 polychromatic erythrocytes	Date of Dosing: November 19-20, 2013	
Cytotoxic Effects	No inhibitory effect on erythropoiethic cell division in any group treated with the Test Article		
Clinical Signs:	High dose group: immediately after dosing: tachypnea, hypoactivity, piloerection, hunched posture – Signs recovered with the exception of piloerection and hunched posture. Body weight loss Intermediate dose group: Body weight loss		
Genotoxic Effects	No relevant increase of the incidence of micronucleated PCEs following treatment with the Test Article		

Genotoxicity *in vivo*

Report Title: Micronucleus test in rat

Test Article: Fosnetupitant (Alternative name: 204-NETU)　　Study Number: PNET-13-49 [redacted]

Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Animals (M)	PCE /(PCE+NCE) % over the mean negative control value	Incidence of MN PCEs/1000 cells Range Min SE	Min	Max
Vehicle Control	0	5	100	0.9 ± 0.4	0.0	2.5
Pro-NETU	26.8	5	91	1.1 ± 0.5	0.0	3.0
Pro-NETU	53.5	5	93	1.9 ± 0.5	0.5	3.0
Pro-NETU	107.0	5	101	1.7 ± 1.1	0.0	6.0
Mitomycin-C	2.00	5	94	18.2 ± 3.8***	8.5	28.5

PCE: polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes;
Chi squared test: *** incidence significantly greater than control value at $p < 0.001$

2.6.7.10 がん原性試験

実施せず.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：Non-pivotal（用量設定試験等）

2.6.7.11.1 Reproductive and developmental toxicity – Non pivotal studies

Test Article: Fosnetupitant

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses mg/kg	No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Han Wistar	Intravenous	Gestation days 6-17	0, 11.90, 35.68, 71.36	6/ group	Severe clinical signs were observed in the highest dose group where five out of six high dose females were found dead during treatment, prior to the end of the gestation period. No significant changes were noted in the mid- and low dose groups. On the basis of the results obtained in this study, it is concluded that the high dose level to be used in the main study should not exceed 35.68 mg/kg/day in terms of Pro-NETU.	PNET-13-33
Rabbit/ New Zealand White	Intravenous	No pregnant	3.57, 11.9, 22.6, 45.2	3/ group	The high dose level for preliminary reproductive toxicity study in rabbits should not exceed 45.2 mg/kg/day of Pro-NETU.	PNET-13-30
Rabbit/ New Zealand White	Intravenous	Gestation days 6-19	0, 11.3, 22.6, 45.20	6/ group	Pro-NETU induces slight to moderate signs of maternal and developmental toxicity at all dose levels more evident at 45.2 mg/kg/day. Therefore, the high dose level for the subsequent main study should not exceed 11.3 mg/kg/day.	PNET-13-53

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

2.6.7.12.1 ICH-I in Rats

Report Title: Intravenous Fertility and Early Embryonic Development to Implantation Study in Rats

Study Number: PNET-13-64 Location in CTD: Section 4.2.3.5.1.1

Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain:	Rat/Wistar Hannover	Duration of Dosing:	M: 4 weeks prior to pairing, throughout pairing and up to the day before necropsy for a total 6/7 weeks F: 2 weeks prior to pairing, through Day 7 of gestation	[redacted]	[redacted]
Initial Age at the start of treatment:	M:8-9 weeks F: 10-11 weeks	Day of mating:	Day 0 of gestation		
		Day of C-section:	Day 15 of gestation	Test Facility:	[redacted], Italy
Date of First Dose:		Method of Administration:	intravenous	GLP Compliance:	Yes
Male groups: Female groups:	19-12-2013 02-01-2014	Vehicle/Formulation:	5% glucose in purified water		
Special Features: None					
No Observed Adverse Effect Level:	F0 Males:35.68 mg/kg/day F0 Females: 35.68 mg/kg/day				

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous fertility and early embryonic development to implantation study in rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-64 [redacted]

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Males				
No. Evaluated	24	24	24	24
No. Died or Sacrificed Moribund	1	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations Prostate: reduced size	-	-	-	+
Organ Weights (%)[a] Prostate	1.1461 g	-5	-11*	-12*
Body Weight (%)[b]	365.21 g	-2	-5	-6**
Food Consumption (%)[b]	23.62 g	-2	-7*	-9*
Mean No. Days Prior to Mating	3.2	3.0	2.9	3.1
No. of Males that Mated	23	24	24	23
No. of Fertile Males	22	22	21	21

- No noteworthy findings. + Mild ++Moderate +++Marked *(6) (7)* * - p<0.05 ** - p<0.01

a - Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.

b - After 4 weeks of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous fertility and early embryonic development to implantation study in rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-64 [redacted]

Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Females				
No. Evaluated	24	24	24	24
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Premating Body Weight (%)[a]	230.87 g	+2	0	-1
Gestation Body Weight (%)[a]	294.86 g	+2	0	0
Premating Food Consumption (%)[a]	16.66 g	0	-7	-3
Gestation Food Consumption (%)[a]	23.54 g	+1	-2	+4
Mean No. Estrous Cycles/14 days	2.1	2.3	2.4	2.4
Mean No. Days Prior to Mating	3.2	3.0	2.9	3.1
No. of Females Sperm-Positive	24	24	24	24
No. of Pregnant Females	22	22	21	21
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea	13.32	13.64	13.19	13.00
Mean No. Implantations	12.50	12.77	12.48	12.29
Mean % Preimplantation Loss	6.02	6.08	5.03	5.76
Mean No. Live Conceptuses	11.82	12.27	11.81	11.76
Mean No. Resorptions	-	-	-	-
No. Dead Conceptuses	0.68	0.50	0.67	0.52
Mean % Postimplantation Loss	6.13	4.39	5.42	4.33

- No noteworthy findings. + Mild ++Moderate +++Marked *(6) (7)* * - p<0.05 ** -p<0.01

[a] – At the end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 ICH-III in Rats

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in Rats with toxicokinetics

Study Number: PNET-13-56 Location in CTD: Section 4.2.3.5.2.2

GLP Compliance: GLP Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain:	Rat/Wistar Hannover	Duration of Dosing:	From day 6 to Day 17 *post coitum*	[redacted]	[redacted]
Initial Age at the start of treatment:	F:12 weeks	Day of mating:	Day 0 *post coitum*		
		Day of C-section:	Day 20 *post coitum*	Test Facility:	[redacted], Italy
Date of First Dose:	Females : 31-10-2013	Method of Administration:	intravenous		
		Vehicle/Formulation:	5% glucose		
Special Features: None					
No Observed Adverse Effect Level:	11.90 mg/kg/day				

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of animals – Main groups	24	24	24	24
– Satellite groups	3	6	6	6

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in the Rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-56 [redacted]

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data	3.57		11.90		35.68	
	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc
Pro-NETU (204-NETU)						
T_{max} (h)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
C_{max} (ng/mL)	29.27±43.88	102.9±128.1	120.0±75.34	46.2±27.48	168.5±76.02	137.1±119.4
AUC (0-tlast) (ng·h/mL)	n.c	n.c	n.c	n.c	n.c	n.c
	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc
NETU						
T_{max} (h)	0.25	0.25	0.25	3	0.25	0.25
C_{max} (ng/mL)	727.4±139.5	2723±561.0	3386±1461	3952±557.7	3809±420.1	4787±246.8
AUC (0-tlast) (ng·h/mL)	3971	10036	12774	24504	17366	35815

pc = post coitum
n.c. = not computable

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in the Rats

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-13-56　　[redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of animals – Main groups	24	24	24	24
– Satellite groups	3	6	6	6

Dose (mg/kg/day) Toxicokinetic Data (Males)	3.57		11.90		35.68	
M1	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc
T_{max} (h)	8	8	8	0	8	3
C_{max} (ng/mL)	72.56±22.91	457.6±172.0	243.1±184	904.2±88.49	222.2±49.02	1591±323.0
$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	356	3022	991	6744	1250	12144
M2	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc
T_{max} (h)	0.25	0.25	0.25	3	0.25	3
C_{max} (ng/mL)	16.37±2.08	22.63±6.79	104.9±48.96	48.50±4.346	139.6±27.54	118.5±17.03
$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	2.05	150	327	313	604	813
M3	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc	Day 6 pc	Day 17 pc
T_{max} (h)	n.c.	0.25	8	0	8	0.25
C_{max} (ng/mL)	0	22.26±1.105	5.523±9.567	77.80±7.691	13.03±3.203	171.9±8.591
$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	0	161.2	13.8	495	32.6	1149

pc = post coitum
n.c. = not computable

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in the Rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-56 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of animals – Main groups	24	24	24	24
Dams/Does: No. Pregnant	20	23	18	24
No. of Not pregnant	4	1	6	0
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
No. with Unilateral implantation	0	0	0	2
No. with Unilateral Total Resorption	0	0	0	0
Clinical signs/observations Necropsy observation Body weighta(g)				
- Day 6 *post coitum*	252.87	-0.6%	-0.4%	-0.8%
- Day 9 post coitum	260.82	+0.2%	-0.8%	-3.3%
- Day 12 post coitum	276.12	-0.2%	-1.1%	-6.3% *
- Day 15 post coitum	290.11	-0.4%	-1.1%	-7.6% **
- Day 20 post coitum	349.97	+0.2%	+0.9%	-4.8%

- = No noteworthy findings.
* = - $p<0.05$ ** = - $p<0.01$
a = For control group, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in the Rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-56 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of animals – Main groups	24	24	24	24
Food consumption[a](g)				
Day 6 *post coitum*	21.85	+0.5%	+1.5%	+0.7%
Day 9 *post coitum*	21.88	-0.7%	-4.3%	-15.5%**
Day 12 *post coitum*	22.68	-0.4%	-10.6%	-27.8% **
Day 15 *post coitum*	22.70	+0.1%	-11.5%	-27.9% **
Day 20 *post coitum*	24.39	+1.2%	-11.8%	-11.1%

Mean No. Corpora Lutea	12.90±1.52	12.78±2.26	13.17±1.76	12.79±2.73
Mean No. Implantation	12.25±1.41	12.22±2.45	12.72±1.87	12.08±2.84
Mean % Preimplantation Loss	4.72±7.09	4.76±9.21	3.38±5.43	6.51±11.23

* = - p<0.05 ** = - p<0.01 by Dunnett's test

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

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous- Embryo-Foetal Development study in the Rats

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-56 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	3.57	11.90	35.68
Number of animals – Main groups	24	24	24	24

Litters:				
No. Litters Evaluated	20	23	18	24
No Live Foetuses	11.80±1.44	11.70±2.90	12.50±1.89	11.75±2.95^
Mean No. Resorption (total)	0.45±0.60	0.52±0.95	0.22±0.43	0.38±0.65
No. of Litters with Dead Foetuses	0	0	0	1
Mean % Post-implantation Loss	3.60±4.92	5.30±10.13	1.73±3.37	3.36±5.91
Mean Foetal Body Weight (g)	3.72±0.20	3.78±0.21	3.86±0.21	3.70±0.27
Foetal Sex Ratios (males %)	49.40±15.56	53.18±18.77	55.77±9.78	47.13±11.07
Foetal Malformations:				
- External examination				
Hindlimb malrotated				
No. Foetuses (%)	0	0	0	1 (0.4%)
No. Litters (%)	0	0	0	1 (4.2%)
- Skeletal examination				
Pubis no ossification				
No. Foetuses (%)	0	0	0	6 (4.0%)
No. Litters (%)	0	0	0	3 (12.5%)
- Visceral examination	-	n/a	n/a	-

^ = Including dead foetuses.
- = No noteworthy findings
n/a = not applicable

2.6.7.13.2 ICH-III in Rabbits

Report Title: Intravenous Embryo-Fetal Development study in rabbits

Study Number: PNET-13-71 Location in CTD: Section 4.2.3.5.2.5

GLP Compliance: GLP Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain:	Rabbit/New Zealand White	Duration of Dosing:	From day 6 to day 19 *post coitum*	[redacted]	[redacted]
Initial Age at the start of treatment:	17-22 weeks	Day of mating:	Day 0 *post coitum*		
		Day of C-section:	Day 29 *post coitum*	Test Facility:	[redacted], Italy
Date of First Dose:		Method of Administration:	intravenous	GLP Compliance:	Yes
Main groups:	10-12-2013	Vehicle/Formulation:	5% glucose		
Satellite groups:	08-01-2014				

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 11.3 mg/kg/day maternal toxicity
2.83 mg/kg/day embryo-foetal development

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	2.83	5.65	11.3
Number of animals	– Main groups	20	20	20	20
	– Satellite groups	4	4	4	4

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous Embryo-Fetal Development study in rabbits

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-13-71 [redacted]

Dose (mg/kg) Toxicokinetic Data	2.83		5.65		11.3	
	Day 6 pc	Day 19 pc	Day 6 pc	Day 19 pc	Day 6 pc	Day 19 pc
Pro-NETU (204-NETU)						
T_{max} (h)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
C_{max} (ng/mL)	15278	30929	43203	51138	109870	98138
$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	8099	15929	22123	27382	56367	50784
NETU (14-NETU)						
T_{max} (h)	0.017	0.75	0.017	0.017	0.017	0.017
C_{max} (ng/mL)	353	915	552	1601	948	2435
$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	1467	4739	2480	4586	3511	8705

pc = post coitum
n.c. = not computable

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous Embryo-Fetal Development study in rabbits

Test Article: Fosnetupitant　　Study Number: PNET-13-71 [redacted]

		0 (Control)	2.83	5.65	11.3
Number of animals	– Main groups	20	20	20	20
	– Satellite groups	4	4	4	4

Dose (mg/kg)		2.83		5.65		11.3	
		Day 6 pc	Day 19 pc	Day 6 pc	Day 19 pc	Day 6 pc	Day 19 pc
M1	T_{max} (h)	8	0.75	8	8	8	8
	C_{max} (ng/mL)	57.1	105.8	65.9	124.1	128.1	206.5
	$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	313	628	423	782	811	1322
M2	T_{max} (h)	1	0.75	1	1	1	1
	C_{max} (ng/mL)	31.5	88.4	83.7	267.8	149.3	510.3
	$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	15.5	391	45.7	1268	435	2371
M3	T_{max} (h)	8	2.5	4.5	5.67	8	4.5
	C_{max} (ng/mL)	19.3	70.0	26.4	104	41.9	178
	$AUC_{(0\text{-}tlast)}$ (ng·h/mL)	85.4	437	171.8	775	278.3	1212

pc = post coitum
n.c. = not computable

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous Embryo-Fetal Development study in rabbits

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-71 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	2.83	5.65	11.3
Number of animals – Main groups	20	20	20	20
Dams/Dose:				
No. Pregnant	17	19	19	18
No. of Not pregnant	3	1	1	2
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
No. with Unilateral implantation	1	2	0	0
No. with Unilateral Total Resorption	0	0	0	0
Clinical signs/observations	-	-	-	-
Body weight a(kg)				
- Day 6 *post coitum*	3.45	+1.2%	+2.6%	+3.5%
- Day 9 *post coitum*	3.52	+1.1%	+2.8%	+3.1%
- Day 12 *post coitum*	3.58	+1.4%	+2.5%	+3.1%
- Day 15 *post coitum*	3.67	+1.1%	+2.2%	+1.1%
- Day 19 *post coitum*	3.71	+1.3%	+3.2%	+1.9%
Body weight gain per day a (g)				-
- Day 6 *post coitum*	31.17	-0.3	+2.3	+21.4
- Day 9 *post coitum*	20.90	+11.7	+37.9	+7.3
- Day 12 *post coitum*	21.64	+11.6	-27.4	-15.3
- Day 15 *post coitum*	29.25	-17.8	-5.0	-71.4*
- Day 19 *post coitum*	11.10	+27.7	+68.8	+49.2
Food consumption a (g/animal/day)				
- Day 6 post coitum	201.94	+4.3%	+7.3%	+8.4%
- Day 9 post coitum	197.51	+6.0%	+13.0%*	+7.9%
- Day 12 post coitum	205.99	+6.2%	+7.9%	+2.5%
- Day 15 post coitum	177.40	+8.8%	+8.1%	-8.0%
- Day 19 post coitum	186.41	-1.1%	-0.1%	-4.9%

- No noteworthy findings; * - $p<0.05$ by Dunnett's test;

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

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous Embryo-Fetal Development study in rabbits

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-13-71 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	2.83	5.65	11.3
Number of animals – Main groups	20	20	20	20
Necropsy Observations	-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea Mean No. Implantations Mean % Pre-implantation Loss	9.47±2.29 8.06±1.64 13.45±10.65	9.05±1.93 7.68±2.24 15.71±12.86	9.79±2.15 8.53±2.63 13.50±18.95	10.83±2.33 9.61±2.00* 11.02±10.14
Litters: No. Litters Evaluated	17	19	19	18
No Live Foetuses	7.94±1.56	7.11±2.21	7.42±2.17	8.94±1.89
Mean No. Resorption (total)	0.12±0.33	0.58±0.96	1.11±1.15*	0.67±0.77*
No. of Litters with Dead Foetuses	0	0	1	1
Mean % Post-implantation Loss	1.24±3.51	7.54±12.22	11.52±12.25	6.55±7.72
Mean Foetal Body Weight (g)	41.91±3.82	42.95±6.41	43.31±5.33	39.73±4.38
Fetal Sex Ratios (males %)	45.79±11.53	58.41±22.33	45.95±20.27	43.57±17.19
Fetal Malformations				
- External examination *Ablepharia*				
No. Foetuses (%)	1 (0.74%)	0	0	0
No. Litters (%)	1 (5.88%)	0	0	0
Hindlimb malrotated				
No. Foetuses (%)	0	1 (0.74%)	0	0
No. Litters (%)	0	1 (5.26%)	0	0
Paw malrotated				
No. Foetuses (%)	0	0	1 (0.70%)	0
No. Litters (%)	0	0	1 (5.26%)	0
- Skeletal examination	-	n/a	n/a	-
- Visceral examination	-	n/a	n/a	-

- No noteworthy findings; n/a = not applicable; * - $p<0.05$ by Kruskall-Wallis/William's test

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

2.6.7.14.1 ICH-II in Rats

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Study Number: PNET-15-85 Location in CTD: Section 4.2.3.5.3.1

GLP Compliance: GLP Test Article: Fosnetupitant [redacted]

Duration of Dosing: F0 generation from Day 6 *post coitum* to Day 20 *post partum*

Day of Mating: 0 pc (G)

Test Facility: [redacted] (Italy)

Species/Strain: Rat/Wistar Hannover Initial Age: 12-13 weeks

Method of Administration: Intravenous route Date of First Dose: 21 December 2015

Vehicle/Formulation: 5% glucose (in softened water by reverse osmosis) Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level in F0 and F1 generation: 11.90 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)/Group	0 (Control)/1	3.57/2	11.90/3	35.68/4
Number of F0 females allocated to groups	24	24	24	24
Dams:				
No. Pregnant	24	24	23	24
No. of Not pregnant	0	0	1	0
No. Unilateral implantation	0	2	1	0
Total litter loss	0	0	0	1
Humane kill, pregnant	0	0	0	1
Found dead, pregnant	0	1	0	0
Total resorption	0	0	0	1
Mean Duration of Gestation (mean days)	22.3	22.3	22.0	21.9*
No. with live pups on Day 21 *post partum*	24	23	23	21

- No noteworthy findings. * - p<0.05 ** - p<0.01 ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous
G = Gestation day pc = *post coitum* day pp = *post partum*

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)/Group	0 (Control)/1	3.57/2	11.90/3	35.68/4
Number of F0 females allocated to groups	24	24	24	24
Dams:				
Clinical signs/observations (%)				
- Scab	-	-	-	54.2
- Swelling	-	-	-	16.7
- Piloerection	-	-	-	37.5
- Ulceration	-	-	-	20.8
- Pale	-	-	-	12.5
- Abrasion/tail desquamation	-	-	-	4.2
Body weight (g) [a]				
- Day 12 pc	248.89	-	-	-5*
- Day 15 pc	263.40	-	-	-6**
- Day 20 pc	315.24	-	-	-7**
Body weight (g) [a]				
- Day 1 pp	246.95	-	-	-9**
- Day 4 pp	258.29	-	-	-8**
- Day 7 pp	268.80	-	-	-5*
Body weight gain per day (g) [a]				
- Day 9 pc	2.295	-	-	-101**
- Day 12 pc	4.038	-	-	-56**($)
- Day 15 pc	4.837	-	-	-28*($)
Food consumption (g/animal/day)[a]				
- Day 15 pc	21.03	-	-12**	-28**
- Day 20 pc	23.79	-	-8**($)	-20**($)

- No noteworthy findings. * - p<0.05 ** - p<0.01 ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)/Group	0 (Control)/1	3.57/2	11.90/3	35.68/4
Number of F0 females allocated to groups	24	24	24	24
Litter data of F0 generation				
Number of litters evaluated[a]	24	23	23	23
- Pre-birth loss	7.8	-	-	+38
- Litter weight (g) - Day 1 pp	68.4	-	-	-14*
- Mean pup weight (g) - Day 1 pp	6.8	-	-	-16*
- Litter weight (g) - Day 4 pp	103.2	-	-	-22*
- Mean pup weight (g) - Day 4 pp	10.3	-	-	-23*
- Litter weight (g) - Day 7 pp	135.5	-	-	-20*
- Mean pup weight (g) - Day 7 pp	15.21	-	-	-22*
- Litter weight (g) - Day 14 pp	252.7	-	-	-16*
- Mean pup weight (g) - Day 14 pp	28.26	-	-	-15*
- Litter weight (g) - Day 21 pp	402.7	-	-	-16*
- Mean pup weight (g) - Day 21 pp	44.88	-	-	-15*
- Cumulative loss% - Day 4 pp	1.5	-	-	+747
- Pup Sex Ratios on Day 21 pp	42.38	45.96	53.33	50.69
Necropsy Observations				
Thymus Abnormal size (reduced) – (number of females affected)	0	2	4	2

- No noteworthy findings. * - p<0.05 ** - p<0.01 ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)/1	3.57/2	11.90/3	35.68/4
Litter data of F1 generation				
Number of litters evaluated [a]	24	23	23	23
Pre-weaning clinical signs of F1 pups - Missing pups - Found dead pups	 3 1	 - -	 3 -	 24 4
Pre-weaning development of F1 pups (days)				
- Pinna detachment - Startle response to sound - Eye opening	2.83 13.96 14.88	-	-	3.36* 15.10* 15.76*
Necropsy of F1 pups	-	-	-	-
Daily Dose (mg/kg) – Not dosed	Control	2	3	4
Number of F1 selected animals – Males – Females	24 24	24 24	24 24	24 24
F1 Males – Mortality Found dead	 0	 1	 0	 0
F1 Females				
- No. of Not pregnant	3	1	2	3
- No. With Total Resorption	0	0	1[b]	0
- No. With Unilateral implantation	2	2	1[b]	1
- Killed humanely	0	1	0	0
- No. of pregnant females	21	23	22	21
- No. With live pups on *post partum* Day 21	21	22	21	21

- No noteworthy findings. * - $p<0.05$ ** - $p<0.01$ ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

[b] = Same female

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg) – Not dosed	Control	2	3	4
Number of F1 selected animals – Males	24	24	24	24
– Females	24	24	24	24
Clinical Observations – F1 Males and F1 Females	-	-	-	-
F1 Males				
Body weight (g)[a]				
- Day 28	84.61	-	-	-14**
- Day 35	133.24	-	-	-11**
- Day 42	181.04	-	-	-10**
- Day 49	226.79	-	-	-10**
- Day 56	276.46	-	-	-10**
- Day 63	310.44	-	-	-8**
- Day 70	340.06	-	-	-8**
- Day 78	364.27	-	-	-7**
- Day 85	385.85	-	-	-7**
F1 Females				
Body weight (g)[a]				
- Day 28	76.81	-	-	-11*
- Day 35	115.25	-	-	-9**
- Day 42	143.78	-	-	-7**
- Day 49	163.98	-	-	-5*

- No noteworthy findings. * - $p<0.05$ ** - $p<0.01$ ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg) – Not dosed		Control		2		3		4	
Number of F1 selected animals	– Males	24		24		24		24	
	– Females	24		24		24		24	
F1 Males									
Body weight gain per day (g) [a]									
	- Day 35	6.946		-		-		-7**	
	- Day 42	6.829		-		-7*		-7*	
	- Day 49	6.536		-		-		-11**	
	- Day 56	7.096		-8*		-8*		-8*	
F1 Females									
Body weight gain per day (g)[a]		-		-		-		-	
Preputial Separation (days)		41.29		42.13		42.58		43.42*	
Vaginal opening		32.29		32.96		33.50		33.83	
Motor activity (COUNT)		M	F	M	F	M	F	M	F
		1055.9	1404.1	1492.7**	1678.1	1263.8	1555.8	1304.7	1441.1
Y-Maze test (sec)		M	F	M	F	M	F	M	F
	Time 1	23.3	20.5	16.9*	9.9	22.8	7.8	26.5	8.2
	Time 2	9.5	20.3	7.7	12.1	10.7	9.3	14.0	10.1
	Time 3	11.4	24.6	11.1	13.0	9.0	13.0*	9.5	11.6
	Time 4	10.7	23.2	10.1	12.8	8.0	10.8	10.8	12.0

- No noteworthy findings. * - p<0.05 ** - p<0.01 ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

M = Male F= Females

Reproductive and developmental toxicity

Report Title: Intravenous pre- and postnatal toxicity study in rats including maternal function

Test Article: Fosnetupitant Study Number: PNET-15-85 [redacted]

Daily Dose (mg/kg) – Not dosed	Control	2	3	4
Number of F1 selected animals – Males	24	24	24	24
– Females	24	24	24	24
Mean No. Days Prior to Mating	2.83	2.75	2.33	3.88
No. of Males that Mated	24	24	24	24
No. of Fertile Males	21	23	22	21
No. of Females Sperm-Positive	24	24	24	24
F1 Females				
Mean No. Corpora Lutea	12.1	12.5	12.9	12.7
Mean No. Implantations	12.1	12.5	12.9	12.7
% Preimplantation Loss	0.0	0.3	0.0	0.0
Terminal body weight (g) – Males	388.1	-	-6*	-7**
Terminal body weight (g) – Females	-	-	-	-
Absolute organ weight – F1 Males and F1 Females	-	-	-	-
Relative organ weight – F1 Males and F1 Females	-	-	-	-
Macroscopic observations of F1 animals	-	-	-	-
F2 GENERATION				
Pre-weaning development of F2 pups (days)				
– Startle response to sound	13.52	15.55	15.38	16.05 (+18.7) *
Necropsy of F2 pups	-	-	-	-

- No noteworthy findings. * - p<0.05 ** - p<0.01 ($) = Modified t test if group variances are inhomogeneous

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

G = Gestation day pc = *post coitum* pp = *post partum*

2.6.7.15　新生児を用いた試験

実施せず.

2.6.7.16　局所刺激性試験

2.6.7.16.1　Local tolerance

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings
Blood Stability Study (NETU-10-13)				
Human, Dog and Rat Whole Blood	*In vitro*	500 ng/mL	NA	Pro-NETU was stable up to 240 minutes in whole blood of human, dog and rat. Pro-NETU was partially converted into NETU; the percentages converted in whole human blood at 0, 15, 30, 60, 120, 180 or 240 minutes were 0.7%, 0.9%, 1.3%, 2.2%, 3.7%, 4.9% and 6.7%, respectively. There was no remarkable species difference.
Local Tolerance Study (NETU-09-08)				
Rat/Sprague Dawley	Intravenous	0.9 mg/mL in a volume of 2 mL/rat/day = 1.81 mg Pro-NETU	Females/4 group	No significant injection-site irritation was observed following 7 consecutive days of Intravenous administration of 2 mL of 0.9 mg/mL (1.81 mg) Pro-NETU to rats.
Local Tolerance Study (NETU-10-05)				
Rat/Sprague Dawley	Intravenous	0.9 mg/mL in a volume of 2 mL/rat/day = 1.81 mg Pro-NETU	Females/4 group	Data showed that formulation 3 (NETU HCl in 40% Ethanol and 8% Tween 80) had the poorest tolerability profile of the test articles presenting moderate local reactions, namely dark discoloration of the tail and microscopic lesions (i.e., necrosis of the vessels wall and thrombosis) at the injection sites. Formulations 1 (NETU HCl in 10% Captisol and 8% Solutol HS 15), 2 (NETU HCl in 10% Captisol and 8% Tween 80) and Pro-NETU were characterized by a good local tolerability profile with a spectrum of changes at the injection site comparable to both controls and the reference drug Fosaprepitant dimeglumine.
Intravenous, Paravenous and Intra-arterial Tolerance Study (PNET-14-12)				

2.6.7.16.1 Local tolerance（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings
Rabbit/ New Zealand White	Intravenous, Intra-arterial, Paravenous Lyophilize reconstituted in 5% glucose in sterile distilled water plus ethylene diamine tetra acetic acid 0.01% w/v	0.5 mL/animal (Intravenous and Intra-arterial routes) 0.2 mL/animal (Paravenous route)	Males/4 group	No signs of systemic toxicity were observed. A slight to well defined irritation was observed *in vivo* in the ears of the animals dosed with the test article by the intra-arterial and Intravenous routes, completely reversible within 5 to 7 days of dosing. No macroscopic or microscopic changes were observed during the *post mortem* examination in the ears injected by Intravenous and intra-arterial routes. A slight to well defined erythema and/or oedema was seen *in vivo* at sites treated with the test article by paravenous route (non- intended route). Treatment-related changes were seen in the ears of all rabbits treated by paravenous route (non- intended route) at microscopic examination (i.e., chronic inflammation, epidermal hyperplasia and/or ulceration of cutis, necrosis and haemorrhage).
Skin Irritation Study (PNET-13-44)				
Rabbit/ New Zealand White	Epidermal	11.8 mg/mL	Females/3 group	No oedema was observed at the treatment site. Slight erythema presented initially in two animals resumed to normal by 24 and 48 hours post-exposure, respectively. There was no indication of a systemic effect of treatment. No changes in body weight were observed throughout the study. These results indicate that the test article, Pro-NETU Lyophile, has no irritant effect on the skin of the rabbit following a 4 hour dermal exposure period.

2.6.7.16.1 Local tolerance（続き）

Test Article: Fosnetupitant, Netupitant

Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings
Delayed Dermal Sensitisation Study in Guinea pig (Magnusson and Kligman Test) (PNET-13-46)				
Guinea pig/ Dunkin-Hartley	Intradermal injection and topical application (preliminary tolerance phase and main study); topical application (challenge)	Preliminary tolerance test • Intradermal injection: 100, 50, 20, 10, 5 and 1% • Topical application: 100, 50, 20, 10 and 5% Main study Induction • Intradermal injection: 20% in vehicle or FCA* • Topical application: 100% Challenge phase: 100% * FCA = Freund's Complete Adjuvant	Females 20 test group; Females 10 control group	At the challenge with Pro-NETU, no response was apparent in any animal of the test or control group. No reaction to the vehicle alone was observed in any animal. These results indicate that the reconstituted test article, Pro-NETU lyophile, does not elicit a sensitisation response in the guinea pig, since no reaction was observed at challenge.
Cornea Opacity and Permeability Study (PNET-13-65)				
Bovine Corneal Opacity/Permeability Assay	Ex vivo: Bovine cornea	11.8 mg/mL	NA	Pro-NETU did not induce changes in cornea opacity and permeability. The test article should be classified as non-corrosive or irritant to the eye.
In vitro Hemolysis Study (NETU-09-18)				
Human Heparinized Blood	*In vitro*	Pro-NETU: 452, 362, 271, 226, 181, 113, 57.4, 28.2, 14.0, 7.1 µg/mL NETU: 500, 400, 300, 250, 200, 125, 63.5, 31.2, 15.5, 7.8 µg/mL	NA	Pro-NETU and NETU did not show any hemolytic effect at concentrations up to 452 µg/mL and 500 µg/mL.

NA: Not Applicable

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 Other toxicity studies

Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings
Active Systemic Anaphylaxis Study (PNET-14-10)					
Guinea pig / Dunkin-Hartley	Intraperitoneal (induction) and Intravenous (challenge)/ Lyophilize reconstituted in 5% glucose in sterile distilled water plus ethylene diamine tetra acetic acid 0.01% w/v Ovalbumin dissolved in physiological saline	Induction: 7 days Challenge: single dose	47.0 mg/kg (induction) 11.8 mg/animal (challenge) 2 mg/kg (induction Reference item)* 1 mg/kg(challenge Reference item)* * Reference Item: Ovalbumin (Sigma-Aldrich S.r.l.)	Males /5 group (induction and challenge phases)	Reference group: strong signs of anaphylaxis such as insistent scratching of the nose, dyspnoea followed by a greyish colour of mucosae, spasms of vomiting, sneezing persistent matted fur and pronation. 3/5 animals showed convulsions and died within 5 min. Recovery in surviving animals between 30 min and 24h. Necropsy: abnormally coloured lungs or abnormal areas in all treated and control groups. Considered to be a post-agonal finding and not treatment-related. Significant reduction in body weight in animals with partial recovery during the rest period. No signs of anaphylactic response to the test article in treated animals at challenge.

2.6.7.17.1 Other toxicity studies（続き）

Test Article: Fosnetupitant

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings
Passive Cutaneous Anaphylaxis Study (PNET-14-11)					
Guinea pig / Dunkin-Hartley	Subcutaneous (induction) and Intravenous (challenge)/ Lyophilize reconstituted in 5% glucose in sterile distilled water+ ethylene diamine tetra acetic acid 0.01% w/v Bovine serum albumin dissolved in physiological saline 20 mg of Evans blue added to the formulations at challenge	Induction: once weekly for 3 consecutive weeks Challenge: Single dose	29.4 mg/kg (induction) 11.8 mg/animal (challenge) 1 mg/kg (induction Reference item)* 10 mg/ animal (Challenge Reference item)* * Reference Item: Ovalbumin (Sigma-Aldrich S.r.l.)	Males /4 group (induction and challenge phases)	Induction: no mortality or clinical signs of systemic toxicity observed. Ulcerations, scabs and/or swelling were observed at injection sites. Challenge: no mortality, body weight effects or treatment-related clinical signs observed with either the vehicle or the test and reference items in animals treated with serum obtained from immunised animals. Signs of anaphylaxis (repeated pawing or rubbing of nose, persistent matted fur, dyspnoea, sneezing and hunched posture) seen in reference group only. No spots observed in the animals treated with serum obtained from animals immunised with either the vehicle or test article. Extended spots observed in animals injected with serum obtained from animals immunised with bovine serum albumin (reference). No spots observed in animals treated with the inactivated IgE serum obtained from the vehicle or test article groups.
Phototoxicity Study (PNET-13-66)					
Murine fibroblasts	*In vitro*	1 hour	7.1 - 904 µg/mL	NA	Main Assay: IC_{50}(-Irr)= 25.7 µg/mL. IC_{50}(+Irr)= 10.3 µg/mL Photo irritation factor = 2.50 and the Mean photo effect = 0.288. Chlorpromazine (reference): Photo irritation factor = 31.9. Pro-NETU is classified as phototoxic.

NA: Not Applicable
IC_{50} : Half maximal (50%) inhibitory concentration