2.6.6 毒性試験の概要文

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 1
2.6.6.1 まとめ 4
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 11
2.6.6.3.1 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： Sprague Dawley ラットを用いた 14 日間持続静脈内投与毒性試験 11
2.6.6.3.2 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）： Sprague Dawley ラットを用いた 4 週間持続静脈内投与毒性試験 12
2.6.6.3.3 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： 雄カニクイザルを用いた 5 日間持続静脈内投与毒性試験及び 3 日間回復性試験 13
2.6.6.3.4 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： カニクイザルを用いた 14 日間持続静脈内投与用量設定毒性試験 14
2.6.6.3.5 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： カニクイザルを用いた 4 週間持続静脈内投与毒性試験 15
2.6.6.3.6 LD（遊離型）/CD（一水和物）： カニクイザルを用いた 14 日間持続静脈内投与毒性試験 16
2.6.6.3.7 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 13 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 17
2.6.6.4 遺伝毒性試験 18
2.6.6.4.1 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）を用いたネズミチフス菌又は大腸菌の復帰突然変異試験 18
2.6.6.4.2 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）：ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験 19
2.6.6.4.3 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）：ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験 20
2.6.6.4.4 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）： Sprague Dawley ラットを用いた連続静脈内投与による in vivo 小核試験 21
2.6.6.5 がん原性試験 22
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 22
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 23
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 23
2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能 23
2.6.6.7 局所刺激性試験 23

2.6.6.7.1 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： ビーグル犬を用いた 2 日間皮下投与忍容性試験 29
2.6.6.7.2 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 2–5 日間持続皮下投与局所刺激性試験 29
2.6.6.7.3 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 2 週間持続皮下投与忍容性試験 30
2.6.6.7.4 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 14 日間持続皮下投与毒性試験 30
2.6.6.7.5 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 28 日間持続皮下投与局所刺激性試験 31
2.6.6.8 その他の毒性試験 33
2.6.6.8.1 不純物の特性解析及び安全性の評価 33
2.6.6.8.1.1 一般不純物 33
2.6.6.8.1.1.1 レボドパの安全性確認 38
2.6.6.8.1.1.2 ビーグル犬を用いたホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）及び類縁物質（配合剤）の皮下投与による 13 週間反復投与試験 38
2.6.6.8.1.2 ヒドラジン 39
2.6.6.8.1.2.1 ヒドラジン一水和物の復帰突然変異試験 39
2.6.6.8.1.2.2 ヒドラジン一水和物処理による DNA 修復経路に関する検討 40
2.6.6.8.1.2.3 ヒドラジンを用いた FE1 細胞の in vitro 導入遺伝子突然変異試験 41
2.6.6.8.1.2.4 ヒドラジン一水和物の in vitro ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（L5178Y/TK +/-マウスリンフォーマ試験） 41
2.6.6.8.1.2.5 ヒドラジン一水和物の Big Blue ®トランスジェニック C57BL/6 マウスを用いた cll 座での in vivo 突然変異試験 42
2.6.6.8.1.3 製造工程由来不純物 / 分解物に関する細菌を用いた変異原性試験 43
2.6.6.8.2 その他 43
2.6.6.8.2.1 [redacted]（[redacted]）の一日許容曝露量（PDE）値の導出 43
2.6.6.8.2.2 ビーグル犬の皮下投与試験に使用したホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）の pH 7.4 製剤の適合性 / 安定性 44
2.6.6.8.3 光毒性試験 45
2.6.6.9 考察及び結論 45
2.6.6.9.1 全身毒性 45

2.6.6.9.1.1 一般状態 45
2.6.6.9.1.2 プロドラッグの代謝に由来するリン酸塩 47
2.6.6.9.2 皮下投与部位の忍容性 48
2.6.6.9.3 製品品質 50
2.6.6.9.3.1 遺伝毒性不純物 50
2.6.6.9.4 非臨床リスク評価 50
2.6.6.9.4.1 ヒドラジン 50
2.6.6.9.4.2 安全域 58
2.6.6.10 図表 59
2.6.6.11 参考文献 59

表一覧

表 2.6.6-1. ホスレボドパ・ホスカルビドパ水和物の毒性試験の一覧 7
表 2.6.6-2. イヌを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパ持続皮下投与における局所刺激性試験のまとめ 26
表 2.6.6-3. イヌを用いた 13 週間投与試験に用いた原薬に含まれる不純物とヒトでの最大投与量との比較 37
表 2.6.6-4. ビーグル犬の皮下投与試験に使用したホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）の pH 7.4 製剤の適合性 / 安定性 44
表 2.6.6-5. ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LCIG 投与により予想される最大 1 日ヒドラジン曝露量の比較 53
表 2.6.6-6. 投与期間と 1 日投与量を元に算出したヒドラジンの発がんリスク 55
表 2.6.6-7. 最大臨床用量で予想されるホスレボドパ / ホスカルビドパの安全域 59

2.6.6.1 まとめ

ホスレボドパ・ホスカルビドパ水和物（ABBV-951）は，レボドパ / カルビドパのプロドラッグであるレボドパ 4'一リン酸（LDP4'，A-1591706，ホスレボドパ）及びカルビドパ 4'一リン酸（CDP4'，A-1610308，ホスカルビドパ）から成る。ホスレボドパ / ホスカルビドパは，アルカリホスファターゼを介した酵素変換を受け，速やかに薬理学的に活性なレボドパ（A-21236，LD）及びカルビドパ（A-39432，CD）に変換される。したがって，ホスレボドパ / ホスカルビドパの全身作用は LD/CD の作用と一致する。非臨床試験に用いた動物種及びヒトにおける LD/CD の毒性プロファイルは十分に確立されており，また，進行期パーキンソン病の治療において既承認の LD 含有経口製剤又は LD/CD 経腸投与製剤（LCIG，duodopa）により安全かつ有効な LD の治療濃度も確立されている[1]。

ホスレボドパ / ホスカルビドパの新たな特徴は投与経路であり，標準治療と比較して良好なリスク・ベネフィットを有することが示されている。2012 年から 2020 年 8 月までに公表された LD 及び CD に関する申請概要及び公表文献をもとに，LD/CD の非臨床プロファイルを更新した。過去に評価された LD/CD の非臨床安全性プロファイルに変更が生じる新たな知見は得られていない[1]。毒性試験の概要文では，LD/CD のプロドラッグであるホスレボドパ / ホスカルビドパの皮下投与による毒性試験の結果を要約する。LCIG の申請概要で詳細に考察された LD 及び / 又は CD の成績と比較し，要約した[1]。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に対するドパミン作動性の薬理作用に基づくと，ラット，カニクイザル及びイヌは，安全性評価に用いるのに薬理学的に適切な動物種であると考えられる。全身毒性の評価として，ラット及びカニクイザルに持続静脈内投与し，臨床的に意義のある LD 及び CD の血漿中曝露量における安全性評価を実施した。ラット及びカニクイザルにおいては，臨床投与経路である持続皮下投与における被験物質の毒性評価は技術的な問題により実施できなかった。一方，イヌは，持続皮下投与によりホスレボドパ / ホスカルビドパを 3 ヵ月間投与することが技術的に可能であり，また，臨床製剤を用いた投与部位の忍容性評価ができることから，有用なモデルであると考えられた。さらに，イヌの皮下投与試験は，薬理学的に忍容性のある用量まで漸増することで全身毒性を評価することができ，イヌで得られた全身毒性の所見はラット及びサルにおける毒性評価を補完するものであった。

初期の第 I 相臨床試験は，200/50，200/20 及び 200/10 mg/mL の 3 つの異なる比率でホスレボドパ / ホスカルビドパを配合した臨床製剤を用いて評価された。200/50 mg/mL 製剤を用いた最長 28 日間の反復投与毒性試験は，初期臨床試験の開始を裏付けるため実施した。ホスカルビドパは，生体内に広範に分布するアルカリホスファターゼにより速やかに代謝される。CD は血液脳関門を容易に通過しない薬物で，LD からドパミンへの変換に重要な酵素である芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素（以下「DOPA 脱炭酸酵素」）を阻害する。ドパミンは血液脳関門を通過しないが，LD は血液脳関門を容易に通過するため，末梢において LD の変換が CD により阻害されると，末梢での LD の濃度が上昇し，それに伴って LD の中枢神経系への移行が上昇し，最終的に脳内で LD からドパミンへの変換が増加する。LD：CD の 4：1 の比率は経口剤及び経腸剤に有効であることが確認されている。[1] ホスレボドパ / ホスカルビドパを皮下投与した第 I 相臨床

試験から，20：1 の比率が LD の目標血漿中濃度の維持に有効であることが示された（2.7.2.2.1 項）。この結果を踏まえ，後の試験（例：イヌを用いた 13 週間皮下投与試験）ではこの比率を用いた。CD の一日投与量を最小にすることは，CD の分解不純物であるヒドラジンの曝露を低下させる点で有用であった。

ラット，サル及びイヌにおけるホスレボドパ / ホスカルビドパ投与による主要な毒性学的変化は，摂餌量減少，体重増加量 / 体重の減少及び中枢神経系（以下「CNS」）に関連した一般状態の変化（活動性低下，攻撃性，常同行動を含む）であった（2.6.6.3 項）。これらの変化は，既存の LD/CD 非臨床データ [1] 及びカニクイザルを用いた 2 週間持続静脈内投与試験で得られた結果と一致していた（2.6.6.3.6 項）。

局所刺激性試験は，ホスレボドパ / ホスカルビドパの製剤及び投与経路の新規性を考慮し評価した。イヌを用いた一連の試験を，2 日から 13 週間の投与期間で複数の用量を用いて評価した（2.6.6.7 項及び 2.6.6.3.7 項）。13 週間反復投与試験では，1 試験は反復投与毒性試験における毒性評価を目的として実施し（2.6.6.3.7 項），もう 1 試験は原薬及び製剤中の不純物の安全性評価を目的として実施した（2.6.6.8.1.1.2 項）。反復投与試験において皮下カテーテル留置は，対照群でも認められている処置による炎症反応を含めたさまざまな技術的な課題があったが，被験物質に関連した投与部位の毒性を評価することは可能であった。皮下のカテーテル留置に関連した炎症の増悪が一部の症例で認められたが，投与部位の所見，剖検及び病理組織学的検査では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した特異的な影響は認められなかった。例外的に，ホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したイヌの皮下投与部位に色素沈着マクロファージが認められたが，毒性学的意義のある所見ではなく，マクロファージ内に取り込まれた原薬による変化と考えられた。

ホスレボドパ / ホスカルビドパの遺伝毒性試験は，in vitro 試験では，ホスレボドパ又は及びホスカルビドパ単独で，in vivo 試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ併用投与により評価した。細菌を用いた in vitro 変異原性試験において，ホスレボドパは，Aroclor™1254 誘導外因性ラット肝代謝活性化系（以下「S9」）存在下及び非存在下ともに陰性であった。一方，ホスカルビドパは，S9 非存在下で陽性，S9 存在下で陰性であったが，これは既存の CD の結果（S9 存在下及び非存在下で陽性）と一致していた。ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験において，S9 存在下及び非存在下で，ホスレボドパ及びホスカルビドパは，染色体異常誘発性を示さなかった。最後に，in vivo マウス小核試験において，ホスレボドパ / ホスカルビドパは陰性であった。ホスレボドパ及びホスカルビドパの所見は LD 及び CD で報告された所見と一致していること，並びに LD/CD のラットを用いた 2 年間強制経口投与がん原性試験において [1] 腫瘍形成反応が認められていないことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパの遺伝毒性リスクは無視できると考えられた。

がん原性試験及び生殖発生毒性試験はプロドラッグであるホスレボドパ / ホスカルビドパを用いて実施せず，既存の LD/CD 製剤による報告を用いてホスレボドパ / ホスカルビドパの非臨床リスクについて考察した。LD と CD の生殖発生毒性プロファイルは既に報告されており，LD

及び CD では，発がんリスク及び受胎能への影響は報告されていない。発生への影響として，ウサギでは内臓及び骨格の奇形が認められたが，ラットでは認められていない。

その他の毒性試験として，原薬及び製剤の不純物の特性解析及び安全性評価を目的とした試験を実施した。イヌを用いた反復投与毒性試験において最大 15 種類の一般不純物を検討し，安全性を評価した（2.6.6.8.1.1 項）。また，発がん性不純物であるヒドラジンについても，変異原性の機序の検討を目的とした一連の試験により評価した（2.6.6.8.1.2 項）。ヒドラジンの非臨床リスク評価は，ICH M7（R1）ガイドライン [2] におけるヒドラジンの特性解析結果に基づく変異原性発がん性物質とした場合の評価，及び社内成績に基づく非変異原性発がん性物質とした場合の評価の 2 つの方法により評価した（2.6.6.9.4.1 項）。いずれの方法でも，臨床上のリスク・ベネフィットは良好であると考えられた。

実施した毒性試験の要約を以下の表 2.6.6-1 に示す。すべての主要な毒性試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（以下「GLP」）規則及び医薬品規制調和国際会議（以下「ICH」）ガイドラインに従って実施した。用量設定試験及び探索的試験は，GLP の原則に従って実施したが，信頼性保証部門による監査を受けなかった。

表 2.6.6-1. ホスレボドパ・ホスカルビドパ水和物の毒性試験の一覧

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Single-Dose Toxicity	-	-	-	-	-	-	-
Repeat-Dose Toxicity	Rat Sprague Dawley	Intravenous (Continuous infusion)	2 weeks	0/0, 100/25, 250/62.5, 500/125	No	MPI Research	R&D/15/1291 (4.2.3.2-1)
	Rat Sprague Dawley	Intravenous (infusion)	4 weeks	0/0, 100/25, 250/62.5, 500/125	Yes	MPI Research	R&D/15/1302 (4.2.3.2-2)
	Male Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	5 days	0/0, 50/12.5, 100/25, 200/50	No	MPI Research	R&D/15/1363 (4.2.3.2-3)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	2 weeks	0/0, 50/12.5, 100/25, 200/50	No	MPI Research	R&D/15/1292 (4.2.3.2-4)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	4 weeks	0/0, 100/25, 200/50, 300/75	Yes	MPI Research	R&D/15/1293 (4.2.3.2-5)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	2 weeks	**A-21236/A-39432**: 0/0, 100/25, 200/50, 300/75	No	MPI Research	R&D/16/0490 (4.2.3.2-6)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	13 weeks or cycles of 7 days followed by 7-day washout for 13 weeks	0/0, 576/28.8 mg/day	Yes	Citoxlab	R&D/18/0060 (4.2.3.2-7)

表 2.6.6-1. ホスレボドパ・ホスカルビドパ水和物の毒性試験の一覧 （続き）

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing (Continuous)	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Genotoxicity	Salmonella typhimurium and E. coli	In vitro ±S9	Not applicable	**A-1591706**: 1.60 to 5000 µg/plate **A-1610308**: 1.60 to 5000 µg/plate	Yes	Covance	R&D/16/0076 (4.2.3.3.1-1)
	Human peripheral blood lymphocytes	In vitro -S9	24 hours	**A-1591706**: 194 to 238 µg/mL **A-1610308**: 10.6 to 18.8 µg/mL	Yes	Covance	R&D/16/0077 (4.2.3.3.1-2)
		In vitro ±S9	3 hours (with 21-hour recovery)	**A-1591706**: 141 to 250 µg/mL **A-1610308**: 141 to 250 µg/mL			
	Human peripheral blood lymphocytes	In vitro -S9	24 hours	**A-1591706**: 21.0 to 280 µg/mL **A-1610308**: 9.82 to 31.0 µg/mL	Yes	Covance	R&D/16/0698 (4.2.3.3.1-3)
		In vitro ±S9	3 hours (with 21-hour recovery)	**A-1591706**: 250 to 280 µg/mL **A-1610308**: 270 to 310 µg/mL			
	Rat, Male Sprague Dawley	Intravenous (infusion)	2 days	Phase A (including bioanalytical) and Phase B: 0/0, 125/31.25, 250/62.5, 500/125	Yes	Charles River	R&D/19/0121 (4.2.3.3.2-1)
Carcinogenicity	-	-	-	-	-		-
Reproductive and Developmental Toxicity	-	-	-	-	-		-
Local Tolerance	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 days	200/50 mg/mL	No	AbbVie	R&D/16/0051 (4.2.3.6-1)

表 2.6.6-1. ホスレボドパ・ホスカルビドパ水和物の毒性試験の一覧 （続き）

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing (Continuous)	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Local Tolerance	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 to 5 days	0/0, 2400/600 mg/day	Yes	AbbVie	R&D/16/0212 (4.2.3.6-2)
	Dog, Male Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 weeks	480/120, 1200/300 mg/day	No	AbbVie	R&D/16/0886 (4.2.3.6-3)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 weeks	0/0, 480/120, 1200/300 mg/day	No	Citoxlab	R&D/16/1374 (4.2.3.6-4)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	4 weeks	0/0, 480/120,1200/300 mg/day	Yes	Citoxlab	R&D/17/0113 (4.2.3.6-5)
Other Toxicity Studies							
Impurity Qualification	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	13 weeks	0, 50/2.5, 50/2.5 + impurities	Yes	Charles River	R&D/19/1129 (4.2.3.7.6-1)
Compatibility/ Stability	Not applicable	Mock Subcutaneous (infusion)	24 hours	0/0, 200/50 mg/mL at various infusion rates	No	Citoxlab	R&D/16/1419 (4.2.3.7.7-1)

No studies conducted; GLP = Good Laboratory Practice; S9 = metabolic activation

a. Unless otherwise specified **foslevodopa/foscarbidopa** was administered in units of mg/kg/day. For Repeat-Dose Toxicity LD/CD prodrug studies, the highest No-observed-adverse-effect level (NOAEL) for studies ≥ 7 days in duration is underlined.

2.6.6.2 単回投与毒性試験

独立したホスレボドパ / ホスカルビドパの単回投与毒性試験は実施していない。単回投与時の全身毒性及び投与部位の忍容性について，2.6.6.3 項（反復投与毒性試験）及び 2.6.6.7 項（局所刺激性試験）に要約した一連の亜急性~亜慢性（2 日間~13 週間）試験により評価した。持続皮下投与試験では，単回投与としては投与できないため，これら試験はホスレボドパ / ホスカルビドパの単回投与毒性に直接適用されないが，急性毒性の評価は，短期間の点滴投与後に観察される作用を特徴づけることによって評価可能である。

ラットを用いた毒性試験

ラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験について，投与開始後 3 日間の一般状態観察から急性毒性を評価した。Sprague-Dawley ラット（雌雄各 6 例/群）にホスレボドパ / ホスカルビドパを 0/0，100/25，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日の用量で生理食塩液とともに 14 日間連日持続静脈内投与した（2.6.7.6 項）。250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群の雄ラットで，投与に関連した接触過敏及び異常発声過敏が最初の 3 日間に認められた。

ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験について，投与開始後 3 日間の一般状態観察から急性毒性を評価した。ホスレボドパ / ホスカルビドパを雌雄 Sprague Dawley ラット（各群雌雄各 10 例）に 100/25，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日の用量で 4 週間持続静脈内投与した（2.6.7.7.1 項）。一般状態として，活動性亢進，攻撃的行動，異常発声，接触又は音に対する過敏症，常同行動，活動性低下，円背位，粗毛がおもに雄で認められ，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群では試験の最初の 3 日から発現頻度が増加した。

ビーグル犬を用いた毒性試験

2 匹のビーグル犬（雌雄各 1 匹）にホスレボドパ / ホスカルビドパ（滅菌水に溶解し，最終溶液は NaOH で pH 7.4 に調整）を 200/50 mg/mL の用量で 1 mL/h の速度で 48 時間持続皮下注入した（2.6.6.7.1 項及び 2.6.7.16.1 項）。ホスレボドパ / ホスカルビドパのカテーテルの維持管理が不十分であった及び/又は忍容性が不良であったため，試験を早期に中止した（投与開始後 4 及び 33 時間）。このため，雄イヌは試験から除外し（嘔吐，流涎，活動性低下，強迫性行動（旋回），運動失調，爪先歩行，前肢屈曲異常及び側臥位），雌イヌは一般状態の悪化により安楽死させた。安楽死させた動物の注射部位の病理組織学的所見は投与手技と一致しており，有害ではなかった。

別の試験では，ビーグル犬（USP 滅菌注射用水［pH 7.4］）にホスレボドパ / ホスカルビドパを 2400/600 mg/日の用量で，200/50 mg/mL 製剤を 0.5 mL/h の速度で 2 日間又は 5 日間持続皮下投与した（2.6.6.7.2 項及び 2.6.7.16.2 項）。対照群（雌雄各 3 匹）には生理食塩液（pH 7.4）を 0.5mL/h の速度で 5 日間連続投与した。ホスレボドパ / ホスカルビドパに関連した一般状態の変化として，活動性低下，嘔吐及び便秘が認められ，摂餌量減少及び体重減少を伴った。雌雄の動物では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した投与部位周囲の軽度の皮膚腫脹もみ

られたが，毒性変化ではないと考えられた。有害ではないホスレボドパ / ホスカルビドパ関連の病理組織学的所見は，皮下組織における軽微から中等度の体液貯留のみであった。ホスレボドパ / ホスカルビドパ 200/50 mg/mL を 0.5 mL/h の速度で最長 5 日間持続皮下投与したとき，注入部位に局所不耐性は認められず，そのときの定常状態における血漿中 LD 濃度及び CD 濃度は，それぞれ 19.6 µg/mL 及び 5.83 µg/mL であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

ラット，カニクイザル及びイヌは，ホスレボドパ / ホスカルビドパの安全性評価に用いるのに適切な動物種である（2.4.3.2 項）。ラット及びサルにおいては，臨床投与経路である持続皮下投与を用いた被験物質の毒性評価は，技術的な問題により実施できなかったため，親化合物である LD 及び CD の臨床的に意義のある血漿中曝露量における全身毒性の評価は，最長 4 週間の持続静脈内投与により評価した。一方，イヌは，持続皮下投与によりホスレボドパ/ホスカルビドパを投与することが技術的に可能であり，また，臨床製剤を用いた評価が可能であったことから，投与部位の忍容性はイヌを用いた 13 週間持続皮下投与試験により評価した。さらに，イヌを用いた皮下投与毒性試験では，薬理学的活性を示し，かつ，忍容性の認められた用量まで漸増することにより全身毒性を評価し，本試験における全身毒性評価は，ラット及びサルを用いた評価を補完するものであった。

カニクイザルを用いた 14 日間反復投与毒性試験（非 GLP 試験）により，LD/CD の持続静脈内投与による毒性を評価した。この LD/CD 比較試験は，他の動物種を用いた既存の LD/CD の毒性試験成績を，カニクイザルを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパのピボタル試験（GLP 試験）にブリッジングするために用いた。

反復投与試験では標準的な毒性評価を実施した。特に明記しない限り，これらには死亡，一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査，凝固検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査が含まれる。すべての試験で実施していないその他の評価項目（例：心電図）については，個々の試験の要約に記載した。

2.6.6.3.1 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： Sprague Dawley ラットを用いた 14 日間持続静脈内投与毒性試験

（R&D/15/1291 [4.2.3.2-1 項]）

Sprague Dawley ラット（各群雌雄各 6 例）に生理食塩液に溶解したホスレボドパ / ホスカルビドパを 0/0，100/25，250/62.5，500/125 mg/kg/日の用量で 14 日間連日持続静脈内投与した（非 GLP 試験，2.6.7.6 項）。1，7 及び 14 日目に各動物から経時的に血液を採取し，ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD のトキシコキネティクスを評価した。定常状態における血漿中濃度（以下「C_{ss}」）は，投与後 24 時間及び 336 時間に採取した試料から得られた平均濃度として算出した。

投与ラインの閉塞により安楽死させた対照群の雌 1 例を除くすべてのラットが計画剖検まで生存した。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した変化として，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群で対照群と比較して摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められた。500/125 mg/kg/日群では対照群と比較して，平均体重が 6%–13%減少したことに基づき，これらの変化を最大耐量とした。投与に関連した変化として，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群の雌雄で接触に対する過敏症及び異常発声が認められた。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した臨床検査値の変化として，250/62.5 mg/kg/日以上の群で軽度の赤血球系パラメータの減少がみられ，これに伴って軽微から軽度の網状赤血球数及び平均赤血球容積の減少が認められた。500/125 mg/kg/日群の雄で軽度のナトリウム減少及び軽度のリン増加が認められた。

投与に関連した臓器変化は，500/125 mg/kg/日群の雌雄ラットの胸腺のみに認められた。雌雄ともに胸腺重量の平均値が減少し，これに関連した病理組織学的変化として軽微から軽度のリンパ球減少が認められた。

以上，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 500/125 mg/kg/日までの用量で投与した結果，問題となる毒性変化は認められなかった。したがって，無毒性量（以下「NOAEL」）は 500/125 mg/kg/日と判断され，この用量での LD 及び CD の C_{ss} は，それぞれ 15.5 及び 2.33 µg/mL であった。

2.6.6.3.2 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）： Sprague Dawley ラットを用いた 4 週間持続静脈内投与毒性試験

（R&D/15/1302 [4.2.3.2-2 項]）

雌雄の Sprague Dawley ラットにホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）を 4 週間持続静脈内投与し，毒性及びトキシコキネティクスを評価した（GLP 試験）（2.6.7.7.1 項）。各群雌雄各 10 例からなる 3 群に，ホスレボドパ / ホスカルビドパを，それぞれ 100/25，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日の用量で投与した。14 日間持続静脈内投与毒性試験において顕著な体重増加抑制が認められたことに基づく最大耐量を本試験の最高用量とした（2.6.6.3.1 項）。対照群として，雌雄各 10 例に溶媒（0.9%塩化ナトリウム注射液［生理食塩液］，USP，pH 7.4 ± 0.5）を同一条件下で投与した。溶媒又は被験物質は，28.8 mL/kg/日（1.2 mL/kg/hr）の投与速度で投与した。

被験物質投与に関連した死亡は認められなかった。ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した所見として，250/62.5 mg/kg/日群の雄及び 500/125 mg/kg/日群の雌雄で対照群と比較して摂餌量減少及びそれに伴う体重減少が認められ，500/125 mg/kg/日群では統計学的に有意な減少が認められた。これらの変化は一過性であり，主に投与の 1 週目に発現したことから，毒性ではないと考えられた。一般状態の変化として，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群では，活動性亢進，攻撃的行動，異常発声，接触又は音に対する過敏症，常同行動，活動性低下，鼻周囲の赤色物，

円背位，粗毛及び削痩の発現頻度増加が認められたが，変化の程度及び散発性から毒性ではないと判断した。

被験物質投与に関連した毒性ではない臨床病理学的変化として，対照群と比較して250/62.5 mg/kg/日以上の雌雄で，軽微から軽度のヘモグロビン濃度（最大 10%）及びヘマトクリット（最大 8%）の減少が，250/62.5 mg/kg/日の雄及び 500/125 mg/kg/日の雌雄で，平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン量の軽度の減少が，500/125 mg/kg/日の雌で網状赤血球数の軽度の減少が，500/125 mg/kg/日の雌雄でリンパ球数の軽微から軽度の減少（最大 35%）がそれぞれ認められた。リンパ球数の減少は，病理組織学的所見において胸腺における軽微なリンパ球の枯渇と関連していた。その他，毒性ではない変化として，250/62.5 mg/kg/日以上の雌雄で尿中リン排泄量（リンクレアチニン比及びリン分画排泄率）の減少，500/125 mg/kg/日群の雄で血清中リン濃度の軽度増加，250/62.5 mg/kg/日以上の群の雌で尿量の軽度増加が認められた。500/125 mg/kg/日群の雄では対照群と比較して軽微から軽度の尿素窒素及びカリウム濃度の増加並びに軽微なナトリウム濃度の減少が認められた。

被験物質に関連した臓器変化は胸腺のみであり，胸腺重量の減少が 250/62.5 mg/kg/日以上（250/62.5 mg/kg/日群の雄で 28.24%減少，500/125 mg/kg/日群の雄で 42.94%減少）及び500/125 mg/kg/日の雌で 39.88%減少［対照群の平均胸腺重量と比較］）に認められた。胸腺重量の変化に関連した毒性ではない病理組織学的変化として，250/62.5 mg/kg/日群の雄及び500/125 mg/kg/日群の雌雄に血中リンパ球数の軽微な減少を特徴とする軽微な皮髄境界の消失を伴う皮質及び髄質における軽微なリンパ球の枯渇が認められた。

ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の平均曝露量（濃度-時間曲線下面積［以下「AUC」］及び C_{ss}）は，すべての用量を通して雌雄ともほぼ用量に比例していた。すべての用量群でのホスレボドパ/LD の比は，AUC で約 0.0762–0.176，C_{ss} で約 0.0755–0.132 であった。また，すべての用量群でのホスカルビドパ/CD の比は，AUC で約 0.0960–0.198，C_{ss} で約 0.100–0.163 であった。

4 週間持続静脈内投与したとき，NOAEL は 500/125 mg/kg/日と判断し，この用量でのホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の推定平均 C_{ss} は，それぞれ 1.65，0.352，18.9 及び 2.70 µg/mL であった。

2.6.6.3.3 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： 雄カニクイザルを用いた 5 日間持続静脈内投与毒性試験及び 3 日間回復性試験

（R&D/15/1363 [4.2.3.2-3 項]）

雄カニクイザルにホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価した（非 GLP 試験，2.6.7.6 項）。各群雄 2 例からなる 3 群のカニクイザルに，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 50/12.5，100/25 及び 200/50 mg/kg/日の用量，並びに 12 mL/kg/日（0.5 mL/kg/hr）の投与速度で 5 日間持続静脈内投与し，その後 3 日間の休薬期間を設け，投与期間中に認められた変化の回復性又は進行性を評価した。本試験における評価項目は，死亡，

一般状態，体重，摂餌量，並びにホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の血漿中濃度であった。

試験期間中にホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した死亡は認められなかった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与により，100/25 及び 200/50 mg/kg/日群で 3 日目に一過性の体重減少がみられたが，4 日目には回復した。ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した一般状態の変化として，200/50 mg/kg/日群の 1 例に活動性亢進が，100/25 及び 200/50 mg/kg/日群の両群に常同行動（かじり行動）がみられた。100/25 及び 200/50 mg/kg/日群では，活動性低下及び / 又は円背位も認められた。一過性の体重減少及び一般状態の変化は毒性ではないと考えられた。また，ホスレボドパ / ホスカルビドパ 200/50 mg/kg 投与時の血漿中 LD 及び CD の C_{ss} はそれぞれ 5.72 及び 2.22 µg/mL であった。

3 日目までの体重への影響の程度及び 6 日目から 8 日目までに認められた一般状態の変化に基づき，200/50 mg/kg までの用量のホスレボドパ / ホスカルビドパの忍容性は良好であり，毒性ではないと考えられた。

2.6.6.3.4 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： カニクイザルを用いた 14 日間持続静脈内投与用量設定毒性試験

（R&D/15/1292 [4.2.3.2-4 項]）

カニクイザルにホスレボドパ / ホスカルビドパを 14 日間持続静脈内投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価した（非 GLP 試験，2.6.7.6 項）。雌雄各 2 例からなる 3 群のサルにホスレボドパ / ホスカルビドパをそれぞれ 50/12.5，100/25 及び 200/50 mg/kg/日の用量で，12 mL/kg/日（0.5 mL/kg/hr）の投与速度で投与した。対照群として雌雄各 2 例に，溶媒である 0.9%塩化ナトリウム注射液（生理食塩液［USP］）を同一条件下で投与した。1，7 及び 14 日目にホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD のトキシコキネティクスを評価した。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した変化として，100/25 mg/kg/日以上の用量で，軽微で一過性の体重減少，並びに毒性ではないが用量依存的な一般状態の変化として，活動性亢進，常同行動，散発的な食欲不振及び消化管/尿路への影響（水様便，ケージ受け皿内の茶色に変色した尿/物質）が認められた。毒性ではない血液生化学的検査値の変化として，100/25 及び/又は 200/50 mg/kg/日群で軽度の重炭酸塩増加並びに軽度から中等度のリン減少がみられた。器官重量並びに肉眼的評価及び病理組織学的評価において，投与に関連した変化は認められなかった。

LD の C_{ss} 及び $AUC_{0\text{-}336h}$ は，ホスレボドパの投与量比をわずか上回って増加し，50/12.5，100/25 及び 200/50 mg/kg/日投与群でそれぞれ平均 0.79，2.05，5.05 µg/mL 及び 260，687，1696 µg•h/mL であった。CD の C_{ss} 及び $AUC_{0\text{-}336h}$ は投与量に比例して増加し，同投与群で平均 0.43，0.87，1.82 µg/mL 及び 143，295，617 µg•h/mL であった。ホスレボドパ及びホスカルビドパの C_{ss} は，いずれの投与群においても LD 及び CD の C_{ss} の約 10 分の 1 であった。

すべての用量で毒性変化が認められなかったことから，NOAEL は 200/50 mg/kg と判断し，この用量での LD 及び CD の C_{ss} はそれぞれ 5.05 及び 1.82 µg/mL であった。

2.6.6.3.5 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： カニクイザルを用いた 4 週間持続静脈内投与毒性試験

（R&D/15/1293 [4.2.3.2-5 項]）

カニクイザル（雌雄各 4 例/群）に溶媒（注射用 0.9%塩化ナトリウム［生理食塩水］，USP，pH 7.4）又はホスレボドパ / ホスカルビドパを 100/25，200/50 及び 300/75 mg/kg/日の用量（生理食塩液中）で 4 週間持続静脈内投与した（GLP 試験，2.6.7.7.2 項）。1，8，15，22 及び 29 日目（投与終了前）にホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD のトキシコキネティクス測定用の血液を採取し，分析した。本試験では，2.6.6.3 項に示した標準的な毒性評価項目に加え，眼科学的検査及び心電図検査を実施した。

300/75 mg/kg/日群の雌 1 例は，ホスレボドパ / ホスカルビドパの過剰な薬理作用と考えられる，興奮性亢進，常同行動及び活動性亢進が繰り返し認められたことから，19 日目に安楽死させた。300/75 mg/kg/日群の雄では，6 日目まで一過性で毒性ではない平均体重の減少（投与前日と比較した群平均 8%の減少）がみられ，試験終了時には軽微な体重減少（投与前日と比較した群平均 3.2%の減少）が認められた。

低用量（100/25 mg/kg/日）群で認められた一般状態の変化は，ケージ受け皿内に褐色物質が散発的に認められたという毒性ではない変化のみであった。200/50 mg/kg/日では，一般状態の変化として，試験期間を通して自発運動の増加（被験物質の過剰な薬理作用）及びケージ受け皿内に褐色物質が認められた。また，常同行動（雄 1 例で投与期間中の最初の 2 週間のみ，雌 1 例で試験期間中継続），攻撃行動（雄 1 例で試験期間中継続），円背位（雄で試験期間中散発的に認められた）及びわずかな活動性低下（雄）も認められた。これらの一般状態の変化は，変化の程度及び一過性の変化であったことから，毒性変化ではないと考えられた。300/75 mg/kg/日群では，一般状態の変化として，活動性亢進（雌雄ともに試験期間を通じて認められた）及び常同行動（雄では試験期間を通じて認められたが，投与開始後最初の 2 週間に概して発現頻度が高く，雌では概して投与開始後最初の 2 週間に認められた）が認められた。300/75 mg/kg 投与群で認められた活動性亢進及び常同行動は，所見の程度及び持続性（200/50 mg/kg 投与群との比較）並びに雌（動物番号 4501）で認められた重度の影響（過剰な薬理作用が，自傷につながった可能性のある活動性亢進として認められた）に基づき，毒性と考えられた。高用量群では，毒性ではない変化として，試験期間を通してすべての動物で認められたケージ受け皿内の褐色物質，活動性低下及び / 又は運動失調の散発的な発現，円背位並びに食欲不振の散発的な発生が認められた。

100/25 mg/kg/日以上の群で，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した臨床検査値の変化として，フィブリノーゲン（各動物の投与前の平均値に対して 30%–72%の増加）及びグロブリンの高値並びにアルブミンの低値が認められた。また，300/75 mg/kg/日群の雌雄で赤血球系パラメータの減少（赤血球数，ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット［各動物の投与前の平均値に対して 8%–18%の低下］），コレステロール濃度の減少（200/50 mg/kg/日以上の群の雄及び

300/75 mg/kg/日群の雌）及びナトリウムの減少（300/75 mg/kg/日群の雌雄），血清リン濃度の減少（300/75 mg/kg/日群の雌雄）が認められた。これらの変化はすべて毒性ではないと考えられた。

尿検査，尿生化学検査，眼科学的検査及び心電図に，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した変化は認められなかった。

胸腺の絶対重量の平均値及び体重あたりの胸腺重量の平均値の統計学的有意ではない減少（300/75 mg/kg/日群の雄で対照群と比較してそれぞれ 83%及び 80%並びに 100/25 mg/kg/日群の雌でそれぞれ 31%及び 26%，200/50 mg/kg/日群の雌でそれぞれ 44%及び 41%及び 300/75 mg/kg/日群の雌でそれぞれ 57%及び 50%）が認められた。病理組織学的検査では，全用量群の雌雄の胸腺に用量依存的なリンパ球減少（低用量群で軽微から軽度，高用量群で中等度から重度）が認められた。これらの変化は，300/75 mg/kg/日群の雌雄各 1 例にみられた重度の胸腺の小型化という肉眼的所見と一致していた。本試験において認められた胸腺への影響は毒性ではないと考えられ，また，投与期間終了時の循環血中リンパ球数への影響は認められなかった。

以上の結果から，300/75 mg/kg/日群では一般状態の毒性変化が認められたことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパの NOAEL は 200/50 mg/kg/日と判断し，この用量でのホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の C_{ss} は，それぞれ，0.979，0.223，7.78 及び 2.42 µg/mL であった。

2.6.6.3.6 LD（遊離型）/CD（一水和物）： カニクイザルを用いた 14 日間持続静脈内投与毒性試験

（R&D/16/0490 [4.2.3.2-6 項]）

カニクイザルに LD 及び CD を 14 日間持続静脈内投与し，毒性及びトキシコキネティクスを評価した（非 GLP 試験）。カニクイザル（各群雌雄各 2 例）に LD / CD を 100/25，200/50 及び 300/75 mg/kg/日の用量で投与した。300/75 mg/kg/日群の全例で 2 日目に投与を中止した。さらに，雌 1 例，雄 2 例からなる対照群には，溶媒である pH 5.0 ± 0.05 のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を投与した（2.6.7.6 項）。溶媒又は被験物質は 93.75 mL/kg/日（3.90 mL/kg/hr）の投与速度で投与した。LD 及び CD の分析のために血液を採取した。その他の評価項目は，死亡，一般状態，体重及び臨床検査（投与前のみ）であった。

すべての用量群（対照群を含む）で食欲不振が認められた。しかし，発現頻度及び食欲不振を示した動物数は 200/50 mg/kg/日群で最も多かったため，この変化は，被験物質投与に関連する所見と考えられた。

100/25 mg/kg/日では，LD / CD 投与に関連した一般状態の変化として，自傷及び尾の赤色化が認められた。200/50 mg/kg/日以上の群では，用量依存的な一般状態の毒性変化として，運動失調，活動性の低下 / 亢進，円背位及び常同行動（うずくまり，咀嚼行動，かむ，身づくろい，舌舐めずり，後方突進，揺らす，及び / 又は歩行）がみられた。300/75 mg/kg/日ではこれら一般状態の変化の重症度が高いことから，2 日目に投与を中止した。

LD / CD を 200/50 mg/kg 以上の用量で投与したとき，一般状態の毒性変化が認められた。したがって，NOAEL は 100/25 mg/kg/日と判断し，この用量での LD 及び CD の C_{ss} はそれぞれ 3.45 及び 1.32 µg/mL であった。

2.6.6.3.7 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 13 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

（R&D/18/0060 [4.2.3.2-7 項]）

ビーグル犬（各群雌雄各 6 例）にホスレボドパ / ホスカルビドパを 0/0 又は 576/28.8 mg/日（USP 注射用水で pH 7.4 に調整）の用量で 13 週間持続皮下投与し，ホスレボドパ及びホスカルビドパの毒性（局所刺激性を含む）並びに血漿中曝露量を評価した（GLP 試験）。さらに別の群（雌雄各 6 例）にホスレボドパ / ホスカルビドパを 576/28.8 mg/日（USP 注射用水で pH 7.4 に調整）の用量で 7 日間の持続皮下投与期間と 7 日間の休薬期間を交互に設け，13 週間投与した（2.6.7.7.3 項）。各群の雌雄各 4 例を主試験群，雌雄各 2 例を回復性試験群とし，回復性試験群は，投薬期間終了後に 4 週間の休薬期間を設けた。本試験の用量は，200/50 mg/mL のホスレボドパ / ホスカルビドパ配合剤を 0.1 及び 0.25 mL/hr の投与速度（すなわち，ホスレボドパ / ホスカルビドパの用量として，それぞれ 480/120 及び 1200/300 mg/日）でイヌに 14 日間又は 28 日間持続皮下投与した局所刺激性試験の結果に基づいて設定した（2.6.6.7.4 項及び 2.6.6.7.5 項）。本試験（連続投与群）では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ濃度 240/12 mg/mL（576/28.8 mg/日），最大投与速度 0.1 mL/hr を選択した。また連続投与の代わりとなり，臨床で想定されている投与レジメンを考慮し，投与期間と休薬期間を交互に設けた間欠投与群を設定した。比較のため，1 日絶対投与量を投与前の体重を用いて換算した概算投与量を算出した（2.6.6.7 項）。連続投与群のホスレボドパ / ホスカルビドパの概算投与量は，雌雄でそれぞれ，約 53/2.6 及び約 69/3.5 mg/kg/日であった。間欠投与群の概算投与量は，雌雄でそれぞれ，約 53/2.7 及び約 68/3.4 mg/kg/日であった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した一般状態の変化は，投与開始時又は投与再開時（各休薬期間後）の嘔吐，並びに投与部位における浮腫（両投与レジメン）の発現頻度及び重症度の増加（対照群と比較して）であった。両投与レジメンで，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した体重減少及び摂餌量減少が認められ，概して投薬開始時又は 7 日間の休薬期間後の投与再開時に認められた。体重及び摂餌量に対する変化は，投与期間中又は 7 日間の休薬期間中にも一過性に認められた。一般状態の変化及び体重 / 摂餌量の変化は，投与中止後に完全に回復し，全体として臨床状態に影響が認められなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

血漿検体を用いたホスレボドパ，LD，ホスカルビドパ及び CD の解析から，投与用量で標準化した平均 C_{ss}（C_{ss}/D）は 2 つの投与レジメン間で差がなかった。

皮下カテーテル，カテーテルループ又はカテーテルポートの留置に関連した多くの変化がすべての動物で認められ，留置物に対する皮下組織の反応による変化であると考えられ，実験手技による変化と考えられた。皮下投与部位に認められた顕著な病理組織学的変化は，皮下の軽度から顕著な線維化，軽微から顕著な混合細胞炎症及び軽微から軽度の顕微鏡的出血（多くは線維化又は炎症領域内）であった。概してカテーテルとカテーテルループの全長を取り囲むように皮下の線維化がみられ，多くはさまざまな炎症細胞が浸潤していた。炎症細胞が中心のカ

テーテルとまわりの線維組織の間に局在している症例もあった。全体として，投与部位の変化は，雌雄ともに 2 つの投与レジメン（連続投与群及び間欠投与群）にて投与した群と対照群）間で発現頻度及び重症度の点で同程度であったことから，本試験条件下では，投与部位における被験物質の忍容性は概して良好であることが示唆された。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した肉眼的所見は，連続投与群の投与期間終了時にみられた投与部位の毒性変化ではない褐色 / 黒色の変色のみであった。これらの肉眼的所見は休薬期間終了時には消失した。肉眼的変化は，顕微鏡下で認められた色素沈着マクロファージと関連していた。病理組織学的検査では，すべての間欠投与群の動物においてもホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した色素沈着マクロファージが認められた。両レジメンでみられた色素沈着マクロファージは，4 週間の休薬期間中においても投与部位及び腋窩リンパ節で持続して認められた。投与期間及び休薬期間の終了時に，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した全身性の病理組織学的変化は認められなかった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパを 13 週間持続皮下投与した結果，毒性ではない一過性の嘔吐，一過性の体重及び摂餌量の減少，並びに回復性のある肉眼的変色を伴う投与部位の浮腫（投与部位の色素沈着マクロファージ）の発現頻度増加が認められた。すべての用量でホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した毒性変化が認められなかったことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパの NOAEL は 576/28.8 mg/日と判断し，その用量での LD 及び CD の C_{ss} は，それぞれ 1.820 及び 0.224 µg/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ホスレボドパ / ホスカルビドパの遺伝毒性について，細菌を用いた in vitro 変異原性試験及びヒトリンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験により評価した。初期に実施した in vitro 染色体異常試験におけるホスレボドパ及びホスカルビドパの最高濃度は，初期の溶解法による溶解度に基づき 250 µg/mL であった。これらのホスレボドパ及びホスカルビドパ濃度は予想よりも低かったことから，新たな溶解法を用い，ホスレボドパ及びホスカルビドパ濃度をそれぞれ 280 及び 310 µg/mL にて in vitro 染色体異常試験を実施した。

2.6.6.4.1 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）を用いたネズミチフス菌又は大腸菌の復帰突然変異試験

（R&D/16/0076 [4.2.3.3.1-1 項]）

数種類のヒスチジン要求性ネズミチフス菌株（TA98，TA100，TA1535 及び TA1537）及びトリプトファン要求性大腸菌株（WP2 uvrA）を用いて，S9 の存在下及び非存在下で，ホスレボドパ及びホスカルビドパ並びに代謝物の復帰突然変異誘発能を検討した（2.6.7.8.1 項）。

プレート法を用いて，S9 存在下及び非存在下で 1.60–5000 µg/プレートの濃度のホスレボドパ及びホスカルビドパ（pH 5.0 に調整した脱イオン水で溶解）について検討した。

ホスカルビドパを用いた最初の試験では，検討したいずれの菌株においても析出は認められなかった。S9 存在下において，試験菌株 WP2 uvrA では 5000 µg/プレートで復帰変異コロニー数

の減少や毒性がみられ，試験菌株 TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 では 5000 µg/プレートで背景の細菌の減少がみられた。S9 非存在下の WP2 uvrA において，ホスカルビドパは 5000 µg/プレートで復帰変異コロニー数を 3.2 倍増加させた。

ホスカルビドパの陽性結果を確認するため，100–5000 µg/プレートの濃度で S9 非存在下で試験菌株 WP2 uvrA を用いて確認試験を実施した。毒性及び析出は認められなかった。WP2 uvrA を用いた確認試験では，ホスカルビドパは 2000–5000 µg/プレートで濃度依存的に溶媒対照と比較して 1.9 から 5.9 倍の復帰変異コロニー数の増加を誘導した。

ホスレボドパは，1600–5000 µg/プレートの濃度で，S9 非存在下では試験菌株 WP2 uvrA，S9 存在下ではすべての試験菌株で析出が認められた。S9 存在下の試験菌株 TA1537 では，1600–5000 µg/プレートの濃度で，復帰変異コロニー数の減少により示される毒性が認められた。S9 存在下及び非存在下の 5 つの試験菌株においてすべての濃度における復帰突然変異頻度は，溶媒対照群で認められた値と近似していた。

陽性対照及び溶媒対照の値はいずれも許容範囲内であったことから，本試験の試験系は適切であったと考えられる。

以上の結果から，実施した試験条件におけるネズミチフス菌及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験においてで，ホスレボドパは陰性で，ホスカルビドパは陽性であった。この結果は，LD 及び CD で報告されている所見と一致していた[1]。

2.6.6.4.2 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）：ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験

（R&D/16/0077 [4.2.3.3.1-2 項]）

ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）の染色体異常誘発能の有無を，ヒト末梢血リンパ球を用いて S9 存在下及び非存在下で評価した（2.6.7.8.2 項）。

染色体異常試験で検討した最高濃度は，溶媒である脱イオン水への溶解度（pH 5.0）に基づき 250 µg/mL とした。溶解度試験では，被験物質を pH 5.0 の脱イオン水で調製した。被験物質の溶解液は pH 5.0 に再調整していない。染色体異常試験では，原液及び希釈液を 1%（10.0 µL/mL）の容量で添加し，溶媒対照群は，10.0 µL/mL の脱イオン水（pH 5.0）で処理した。

S9 存在下及び非存在下で 3 時間，S9 非存在下で約 24 時間，終濃度 4.45–250 µg/mL で処理し評価した。すべての細胞は処理開始約 24 時間後に回収した。

ホスレボドパについては，S9 存在下及び非存在下での 3 時間処理条件では，141，188 及び 250 µg/mL の濃度で処理した細胞について分析した。最高濃度の 250 µg/mL では，S9 存在下及び非存在下において，分裂指数がそれぞれ 11%及び 9%低下した。S9 非存在下の約 24 時間処理条件では，194，226 及び 238 µg/mL の濃度で処理した細胞について分析した。最高濃度の 238 µg/mL では，分裂指数が 45%低下した。染色体異常，倍数性又は核内倍加を示した細胞数に統計学的有意な増加は認められなかった。

ホスカルビドパについては，S9 存在下及び非存在下での 3 時間処理条件では，141，188 及び 250 µg/mL の濃度で処理した細胞について分析した。最高濃度の 250 µg/mL では，S9 存在下及

び非存在下において，分裂指数がそれぞれ 0%及び 25%低下した。S9 非存在下の約 24 時間処理条件では，10.6，14.1 及び 18.8 µg/mL の濃度で処理した細胞について分析した。最高濃度の 18.8 µg/mL は細胞培養液中における被験物質の溶解限度であり，この濃度において分裂指数が 31%低下した。S9 存在下での 3 時間処理又は S9 非存在下での約 24 時間処理した細胞において，染色体異常，倍数性又は核内倍加を示した細胞数に統計学的有意な増加は認められなかった。しかし，S9 非存在下での 3 時間処理では，250 µg/mL で溶媒対照と比較して染色体異常の統計学的に有意な増加が認められた。染色体異常を有する細胞及び個々の細胞の複製割合の平均値は，試験実施施設（Covance，米国）の背景データ範囲及び溶媒対照（0.00%–2.00%）の 95%参照範囲内に含まれることから，この統計的に有意な増加は生物学的に意味のある変化ではないと判断した。倍数性又は核内倍加を示した細胞数に統計学的有意な増加は，いずれの培養条件においても認められなかった。

溶媒対照群における染色体異常を有する細胞は背景データの範囲内であり，陽性対照群では，染色体異常を有する細胞の統計学的に有意な増加が認められ，溶媒対照の背景データの範囲を明らかに超えていた。また，高用量群は溶媒中の溶解度に基づき設定した。以上より，本試験の試験系は適切であると考えられる。

S9 存在下及び非存在下で培養したヒトリンパ球において，ホスレボドパ及びホスカルビドパは，倍数性，核内倍加及び染色体異常を誘発しないと考えられた。

2.6.6.4.3 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）：ヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験

（R&D/16/0698 [4.2.3.3.1-3 項]）

ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）の染色体異常誘発能の有無を，ヒト末梢血リンパ球を用いて S9 存在下及び非存在下で評価した（2.6.7.8.3 項）。本試験は，バリデートされた安定性試験法により支持された方法を用いて調製した被験物質を用いて実施した。

染色体異常試験に用いた最高濃度は，ホスレボドパが 280 µg/mL，ホスカルビドパが 310 µg/mL とし，この濃度は分子量又はガイダンスで推奨されている最高濃度（いずれの被験物質も約 1.01 mmol/L）に基づき設定した。原液及び希釈液は 1%（10.0 µL/mL）（pH 5.0 に調整）で添加し，溶媒対照培養液は 10.0 µL/mL のイオン交換水（pH 5.0 ± 0.1）で処理した。被験物質のバリデートされた安定性試験では，pH 5.0 に調整する必要があり，調整することで各被験物質の溶解性が改善された。

S9 存在下及び非存在下でホスレボドパ及びホスカルビドパをそれぞれ 11.8–280 µg/mL 又は 5.52–310 µg/mL の濃度で 3 時間，S9 の非存在下で約 24 時間処理した。すべての細胞は処理開始約 24 時間後に回収した。

ホスレボドパについては，S9 非存在下で 21.0，230 及び 280 µg/mL の濃度で 24 時間処理した細胞を用いて評価した。最高濃度の 280 µg/mL では，分裂指数が 51%低下した。S9 存在下及び非存在下で 250，260 及び 280 µg/mL の濃度で 3 時間処理した細胞を評価した。最高用量の

280 µg/mL では，分裂指数が 0%（S9 存在下）及び 29%（S9 非存在下）低下した。染色体異常，倍数性又は核内倍加を示した細胞数に統計学的有意な増加は認められなかった。

ホスカルビドパについては，S9 存在下及び非存在下で，270，290 及び 310 µg/mL の濃度で 3 時間処理した細胞を用いて評価した。最高濃度の 310 µg/mL では，S9 存在下及び存在下で，分裂指数がそれぞれ 0%及び 10%減少した。S9 非存在下で 9.82，23.3 及び 31.0 µg/mL の濃度で約 24 時間処理した細胞を評価した。最高用量の 31.0 µg/mL は，細胞培養液中における被験物質の溶解限度であり，この濃度で分裂指数は 40%低下した。いずれの培養条件においても，染色体異常，倍数性又は核内倍加を示した細胞数に統計学有意な増加は認められなかった。

溶媒対照群における染色体異常を有する細胞は背景データの範囲内であり，陽性対照群では，染色体異常を有する細胞の統計学的に有意な増加が認められ，溶媒対照の背景データの範囲を明らかに超えていた。また，高用量群は溶媒中の溶解度に基づき設定した。以上より，本試験の試験系は適切であったと考えられる。

ホスレボドパ及びホスカルビドパは，S9 存在下及び非存在下で培養したヒトリンパ球において，倍数性，核内倍加及び染色体異常を誘発しないと考えられた。

2.6.6.4.4 ホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）： Sprague Dawley ラットを用いた連続静脈内投与による in vivo 小核試験

（R&D/19/0121 [4.2.3.3.2-1 項]）

雄 Sprague Dawley ラットにホスレボドパ及びホスカルビドパを持続静脈内投与し，ラット骨髄中の多染性赤血球における小核誘発能を評価した（2.6.7.9.1 項）。

ラットにホスレボドパ / ホスカルビドパを 125/31.25，250/62.5 又は 500/125 mg/kg/日の用量で投与した。別の動物に溶媒（注射用 0.9%塩化ナトリウム［生理食塩液］，USP，pH 7.4 ± 0.05）を投与した。さらにサテライト群のラットには，上記用量のホスレボドパ / ホスカルビドパ又は溶媒を投与し，トキシコキネティクスを評価した。用いた用量は，活性を元に調整した。初回の試験では，必要数の未成熟赤血球が得られなかったことから小核は評価できなかったため，再度実施した。

すべての動物に 24 時間持続静脈内投与を 2 日連続で実施した。本試験では，一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，トキシコキネティクス及び小核の評価項目を評価した。

全例が計画剖検時まで生存した。本試験では，被験物質投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。

本試験では，被験物質投与に関連した体重増加量の減少が 250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群で投与前日から 3 日目に認められた。3 日目の平均体重は，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群で対照群と比較してそれぞれ約 4%及び 9%減少した。4 日目の平均体重は 500/125 mg/kg/日群で対照群と比較して 5.1%減少した。

被験物質投与に関連した摂餌量の減少が 250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日群で投与前日から 4 日目にみられ，対照群と比較してそれぞれ 9.67%及び 27.49%減少し，この期間中のこれらの用量

での体重増加量の減少と相関していた。初回の試験では摂餌量減少及びそれに伴う体重減少も認められた。

ホスレボドパ / ホスカルビドパは，いずれの用量においても，小核を有する多染性赤血球の割合を溶媒対照と比較して統計学的に有意又は用量依存的に増加させなかった。すべての用量のホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群の雄ラットに骨髄細胞毒性は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において，ホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したラットでは用量依存的なホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の曝露が確認された。一方，対照群のラットでは曝露は確認されなかった。

本試験の結果に基づき，Sprague Dawley ラットにホスレボドパ / ホスカルビドパ（比率 4 : 1）を 125/31.25，250/62.5 及び 500/125 mg/kg/日の用量で 2 日間連続静脈内投与したところ，500/125 mg/kg/日まで骨髄小核誘発能を示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

ホスレボドパ / ホスカルビドパを用いたがん原性試験は実施しなかった。ホスレボドパ / カルビドパは，生体内で速やかに LD 及び CD に変換されること，並びに最大 13 週間の反復投与毒性試験の成績を踏まえると，ホスレボドパ / カルビドパの安全性プロファイルは，LD/CD 含有製剤で得られている成績と同様のものであったことから，LD/CD 含有製剤で得られているがん原性の試験の結果を以下に要約した。

ラットに LD/CD を 2 年間経口投与した結果，腫瘍形成は認められていない [1]。ラットに LD/CD を 25/10，50/10 及び 100/10 mg/kg/日の用量で 2 年間連日強制経口投与し，LD/CD のがん原性を評価した結果，生存率は対照群と LD/CD 投与群で同程度であった [1]。100/10 mg/kg/日群で一過性の流涎（流涎過多）及び活動性低下が認められた。また，雄の体重増加量が 50/10 mg/kg/日で 8%減少し，100/10 mg/kg/日で 14%減少した。雌では体重への影響は認められなかった。LD/CD 投与に関連した非腫瘍性の病理学的変化は認められず，腫瘍の発現率は対照群と LD/CD 投与群で同程度であった。したがって，LD/CD はラットにおいてがん原性を示さなかった。

LD，CD 及び LD/CD 併用がん原性試験に関する詳細については，既存の LD/CD 含有製剤で評価されていることから LCIG の申請概要を参照した [1]。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ホスレボドパ / ホスカルビドパを用いた生殖発生毒性試験は実施しなかった。ラット，イヌ及びサルを用いた反復投与毒性試験において，生殖器への影響は認められなかった。ただし，サルを用いた試験では，性成熟したサルを用いていないため，病理組織学的検査の結果から十分な結論は得られなかった。

ホスレボドパ / カルビドパは，生体内で速やかに LD 及び CD に変換されること，並びに最大 13 週間の反復投与毒性試験の成績を踏まえると，ホスレボドパ / カルビドパの安全性プロファ

イルは，LD/CD 含有製剤で得られている成績と同様のものであったことから，LD/CD 含有製剤で得られている生殖発生毒性試験の要約を，2.6.6.6.1 項，2.6.6.6.2 項及び 2.6.6.6.3 項に記載した。

LD，CD 及び LD/CD 併用投与の生殖発生毒性試験は，既存の LD/CD 製剤により十分に評価されている [1]。

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

LD/CD を用いた生殖発生毒性試験において，ラットの受胎能に影響は認められなかった [1]。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

動物試験において，LD/CD は臨床的に意義のある用量で発生毒性（催奇形性を含む）を示した [1]。LD/CD を器官形成期の妊娠ウサギに投与したところ，検討したすべての用量及び LD/CD 比で胎児に内臓及び骨格奇形が認められた。LD/CD を器官形成期の妊娠マウスに投与した場合，催奇形性はみられなかった。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能

妊娠ラットに妊娠 15 日から生後 21 日に LD/CD を投与したとき，出生後生存児数の減少がみられた [1]。

2.6.6.7 局所刺激性試験

イヌを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパの主な局所刺激性試験を表 2.6.6-2 に示す。イヌにおいてカテーテルを用いた試験実施の可否を評価した予備試験の結果は本表に含めていない。

局所刺激性の評価では，動物種，製剤組成，カテーテル留置の手技，持続皮下投与速度及び投与部位の評価方法について考慮した。13 週間反復皮下投与毒性試験では，持続皮下投与後の全身毒性についても評価した。

皮下に留置したカテーテルを 13 週間維持することが技術的に可能であったことから，局所刺激性を評価する動物種として，イヌを選択した。長期の皮下カテーテル留置の手技及び無菌状態の維持には重大な課題があるものの，ラット及びカニクイザルに比べて，イヌは管理可能な程度であったため，イヌのみで実施した。

局所刺激性試験には臨床製剤を用いた。

表 2.6.6-2 に示した最初の 5 試験では，それぞれ 200 及び 50 mg/mL の濃度のホスレボドパ及びホスカルビドパを用い，ホスレボドパ / ホスカルビドパの 3 つの異なる用量比である 200/50，200/20 及び 200/10 mg/mL について評価する第 I 相試験を支持するために実施した。製剤は滅菌水（又は静菌注射用水又は 0.9%塩化ナトリウム）で調製し，最終溶液は NaOH を用いて pH 7.4 に調整した。イヌに 90 日間投与した 2 試験では，それぞれ 240 及び 12 mg/mL の濃度のホスレボドパ及びホスカルビドパの製剤を使用した。この製剤の溶媒は静菌注射用水（USP）で，

pH 7.4 に調整した。これらの濃度は，主要な薬物動態比較試験である M17-220 試験，長期安全性試験である M15-741 試験，有効性確認試験である M15-736 試験及び他の第 III 相試験で使用されており，市販製剤でも使用される予定である。

イヌを用いた試験で使用する皮下カテーテルは，技術的な問題に対処するため，カスタマイズした。初期検討として実施した 1–5 日間投与する非臨床毒性試験では，臨床試験で使用したカテーテルと同等のカテーテルを用いて局所刺激性を評価した。しかし，カテーテルの留置及び持続皮下投与によりイヌに薬剤を確実に投与することに限界があったことから，この方法は短期投与試験のみ用いた。その後実施した最長 14 日間の反復投与毒性試験では，外科的に埋め込んだカテーテル（表 2.6.6-2，Reference No. 1–3）を用いて持続皮下投与による局所刺激性を評価した。留置したカテーテルが 14 日以内に外れ，被験物質の確実な投与が担保できなかったため，その後の 14 日間投与試験及び 28 日間投与試験では，カテーテルの種類を Huber 針及び皮下ポートに変更した（表 2.6.6-2，Reference No. 4–5）。Huber 針及び皮下ポートを用いた長期持続皮下投与には，針の破損などの技術的な問題があったため，13 週間持続皮下投与試験では外科的に埋め込んだ cath-in-cath カテーテル（表 2.6.6-2，Reference No. 6–7）を使用した。すべてのカテーテルタイプでカテーテルの開通性と無菌状態の維持に課題があったが，cath-in-cath カテーテルでは 13 週間投与の局所刺激性試験が実施可能であった。

毒性試験及び忍容性試験に用いた投与速度及び投与量は，イヌで薬理学的に忍容性が示された用量に基づいて決定した。なお，ほとんどの試験において，体重によらず一定容量/hr で投与されていることから，後述の表 2.6.6-2 では，該当する用量群 / 性別の群平均体重を用いて算出したおおよその投与量（mg/kg/日）を記載した。Reference No. 1 の試験（表 2.6.6-2，2.6.6.7.1 項）では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ（200/50 mg/mL）を 1 mL/hr の投与速度で 2 日間点滴静注し，このときのホスレボドパ / ホスカルビドパの用量は雄で約 464/116 mg/kg/日，雌で約 691/173 mg/kg/日であった。神経行動学的変化及び一般状態の変化の重症度に基づき，長期投与試験では本用量は，忍容性がないと考えられた。Reference No. 2 の試験（表 2.6.6-2，2.6.6.7.2 項）では，Reference No. 1 の試験と同一製剤を 0.5 mL/hr の投与速度で 2 日間投与し，このときのホスレボドパ / ホスカルビドパの用量は雄で約 190/48 mg/kg/日，雌で約 305/76 mg/kg/日であった。同用量で 5 日間投与したときの曝露量も同様であった。本試験では，活動性低下，嘔吐，摂餌量減少及び顕著な体重減少などの毒性変化が認められ，その後の試験ではより低用量を選択した。2 つの 14 日間投与試験及び 28 日間投与試験（表 2.6.6-2，Reference No. 3–5，2.6.6.7.3-5 項）では，0.1 及び 0.25 mL/hr の投与速度で実施した。これらの 3 試験を通して，ホスレボドパ / ホスカルビドパの用量は，0.1 mL/hr の投与速度の場合，雄で約 49–52/12–13 mg/kg/日，雌で 49–55/12–14 mg/kg/日，0.25 mL/hr の投与速度の場合，雄で約 109–127/27–32 mg/kg/日，雌で 126–136/31–34 mg/kg/日であった。0.1 及び 0.25 mL/hr の投与速度のいずれも忍容性は良好であったが，被験物質投与に関連した嘔吐及び補給を要する摂餌量減少が認められた。90 日間投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ比が 20 : 1 の製剤（240/12 mg/mL）を使用した。28 日間投与試験の結果に基づき，最初の局所刺激性評価を含む 90 日間投与試験（表 2.6.6-2，Reference No. 6，2.6.6.3.7 項）では 0.1 mL/hr の投与速度を用い，このときのホスレボドパ / ホスカルビドパの用

量は雄で約 53/2.6–2.7 mg/kg/日，雌で約 68–69/3.4–3.5 mg/kg/日であった。不純物の安全性評価を目的とした 90 日間投与試験（表 2.6.6-2，Reference No. 7，2.6.6.8.1.1.2 項）では，50/2.5 mg/kg/日の用量を目標とする投与方法に変更した。目標用量（mg/kg/日）を投与するために，体重に基づき必要に応じて投与速度を調節した。すべての試験において，イヌで忍容可能な最大用量の検討が可能となるように皮下投与の用量を最適化した。イヌの試験に用いた投与製剤は臨床製剤と同一であったが，ヒトとイヌの体格差に基づくと，ヒトでは 24 時間の総 1 日投与量が最大 25 mL であるのに対し，イヌでは約 10 分の 1 であることから，臨床試験と非臨床試験で 1 日あたりの投与容量は異なる。

投与部位の評価は総合的に行った。上述の 90 日間投与試験（表 2.6.6-2，Reference No. 7，2.6.6.8.1.1.2 項）で用いたカテーテルタイプは，肩甲骨背面部の皮下に埋め込んだポート，胸椎背面部から腰椎部に沿って皮下を通したカテーテル，投与のための穿孔ループから成る。カテーテル全長を肉眼的に観察し，病理組織学的検査のための複数の切片をカテーテル全長にわたり作製し評価した。一部のイヌで膿瘍が認められたことから，剖検時にすべてのイヌの投与ループから採取した検体を培養した。

また，表 2.6.6-2 に示した 13 週間反復投与毒性試験 2 試験は，全身毒性についても評価した。

表 2.6.6-2. イヌを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパ持続皮下投与における局所刺激性試験のまとめ

Reference Number	Study Type/ Catheter Type	Dose Duration (Days)	N Per Group	foslevodopa/ foscarbidopa (mg/mL)	Infusion Rates (mL/hr)	foslevodopa/ foscarbidopa Dose (approximate mg/kg/day [a])	Noteworthy Findings	Report Number/ GLP Status
1	Local tolerance/ Straight silicon catheter	2	1/sex	200/50 (G1)	1 (G1)	464/116 (G1, M) 691/173 (G1, F)	Adverse clinical signs: ↓ activity, compulsive behavior, abnormal gait and lateral recumbency in the female. The histopathologic findings at the injection site area in the female were consistent with the infusion procedure and were not adverse.	R&D/16/0051/ Non-GLP
2	Local tolerance/ Straight silicon catheter	2 or 5	3/sex	0/0 (G1) 200/50 (G2-3)	0.5 (G1-3) G2 for 2 days G1,3 for 5 days	190/48 (G2, M) 305/76 (G2, F) 184/46 (G3, M) 257/64 (G3, F)	**G2-3:** ↓ activity, emesis and absent feces, which were associated with foslevodopa/foscarbidopa-related ↓ FC and BW loss. Male and female animals also exhibited foslevodopa/foscarbidopa-related mild skin swelling around the injection site, which was not considered adverse.	R&D/16/0212/ GLP
3	Local tolerance/ Straight silicon catheter	14	3 males	200/50 (G1-2)	0.1 (G1) 0.25 (G2)	49/12 (G1) 118/29 (G2)	**G1 and G2**: emesis, ↓ BW, black skin discoloration around the injection site beginning as early as Study Day 6. Based on radiographic imaging at the injection site and surrounding area, in addition to bioanalysis for foslevodopa, foscarbidopa, LD and CD, it was concluded that this black skin discoloration was due to retrograde flow of test material from the catheter tip through the catheter insertion point and onto the skin, and infusion site observations were not adverse. **G2:** ↓ FC, and absent, unformed and/or watery feces.	R&D/16/0886/ Non-GLP

表 2.6.6-2. イヌを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパ持続皮下投与における局所刺激性試験のまとめ （続き）

Reference number	Study Type/ Catheter Type	Dose Duration (Days)	N Per Group	foslevodopa/ foscarbidopa (mg/mL)	Infusion Rates (mL/hr)	foslevodopa/ foscarbidopa Dose (approximate mg/kg/day[a])	Noteworthy Findings	Report Number/ GLP Status
4	Local tolerance/ Huber needle/ port	14	2/sex	0/0 (G1) 200/50 (G2-3)	0.1 (G2) 0.25 (G1,3)	52/13 (G2, M) 49/12 (G2, F) 127/32 (G3, M) 126/31 (G3, F)	G2-3: Tolerated systemically, based on resolution of initial episodes of emesis and reversibility of the ↓ FC/BW loss with food supplementation. G1-3: Locally, the presence of a lump/swelling in the lumbar region (i.e., the end of the SC catheter). Although these lumps could be considered normal expected local reactions to the presence of the SC catheter, the higher incidence and longer duration in G3 was considered possibly exacerbated by the administration of increased volume of foslevodopa/foscarbidopa.	R&D/16/1374/ Non-GLP
5	Local tolerance/Huber needle/ port	28	4/sex	0/0 (G1) 200/50 (G2-3)	0.1 (G2) 0.25 (G1,3)	51/13 (G2, M) 55/14 (G2, F) 109/27 (G3, M) 136/34 (G3, F)	G2-3: Intermittent emesis at initiation of treatment; dose-related moderate to severe ↓ FC and moderate to severe transient BW loss. FC and BW decreases generally reversed with supplementation. G1-3: Signs of inflammation related to the infusion site in all groups; however, a higher incidence/severity at the infusion site was observed in G3. MTD = G2	R&D/17/0113/ GLP
6	Repeat dose/ Cath-in-cath	90	4/sex 2/sex recovery	0/0 (G1) 240/12 (G2-3)	0.1 (G1-3) G2: alternating 7 days dosing/ not dosing G1,3: continuous	53/2.7 (G2, M) 68/3.4 (G2, F) 53/2.6 (G3, M) 69/3.5 (G3, F)	G2-3: Non-adverse transient emesis, transient ↓ BW and FC G1-3: Local inflammatory changes associated with infusion. G2-3: Nonadverse black/brown discoloration at infusion site (associated with pigmented macrophages) NOAEL = G3	R&D/18/0060[b]/ GLP

表 2.6.6-2. イヌを用いたホスレボドパ / ホスカルビドパ持続皮下投与における局所刺激性試験のまとめ （続き）

Reference number	Study Type/ Catheter Type	Dose Duration (Days)	N Per Group	foslevodopa/ foscarbidopa (mg/mL)	Infusion Rates (mL/hr)	foslevodopa/ foscarbidopa Dose (approximate mg/kg/day [a])	Noteworthy Findings	Report Number/ GLP Status
7	Repeat dose/ Cath-in-cath	90	4	0/0 (G1) 240/12 (G2-3)[d]	0.0087 (mL/kg/hr)	50/2.5 (G2) 50/2.5 (G3)	G2-3: Tolerated systemically based on the general maintenance in BW with food enrichment/supplementation. G1-3: Procedure-related inflammatory changes at infusion site/port. G2-3: Nonadverse pigmented macrophages at infusion site. G3: Adverse mineralization and often associated erosion/ulcer formation of the overlying epidermis of the catheter tract and adjacent subcutis at the dose administration site and at the SC port site.	R&D/19/1129[c]/ GLP

↓ = decreased; BW = body weight; F = female; FC = food consumption; G = Group; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; MTD = maximum tolerated dose; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SC = subcutaneous

a. Approximate daily dose of foslevodopa/foscarbidopa was calculated using the group mean of the latest baseline body weight value for each respective group/sex. Doses were administered as a defined infusion volume irrespective of body weight.

b. Reported in Section2.6.6.3.7, Repeat-Dose Toxicity.

c. Reported in Section2.6.6.8.1.1.2, Other Toxicity Studies.

d. G3 test article spiked with impurities.

2.6.6.7.1 ホスレボドパ / ホスカルビドパ： ビーグル犬を用いた 2 日間皮下投与忍容性試験

（R&D/16/0051 [4.2.3.6-1 項]）

ホスレボドパ / ホスカルビドパの毒性及び病理学的変化を検討するため，ビーグル犬 2 例（雌雄各 1 例）に 200/50 mg/mL のホスレボドパ / ホスカルビドパ（滅菌水，NaOH を用いて最終溶液を pH 7.4 に調整）を 1 mL/hr の投与速度で 48 時間持続皮下投与した （2.6.7.16.1 項）。本試験における評価項目は，死亡，一般状態，剖検（投与部位のみ）及び病理組織学的検査（投与部位のみ）であった。

カテーテルの維持が不十分であるかホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に対して忍容性が認められなかったことから，試験を早期に中止した。雄イヌは投与開始後 4 時間に投薬を中止し（一般状態の変化は嘔吐，投与部位周囲の腫脹のみ認められた），雌イヌは有害な一般状態の変化（嘔吐，流涎，活動性低下，強迫行動，運動失調，爪先歩行，前肢屈曲異常，側臥位）のために投与後 33 時間に安楽死させた。

安楽死させた動物の投与部位の病理組織学的所見は投与手技によるものであり，毒性ではないと判断した。

2.6.6.7.2 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 2–5 日間持続皮下投与局所刺激性試験

（R&D/16/0212 [4.2.3.6-2 項]）

ホスレボドパ及びホスカルビドパの局所刺激性を評価するため，ビーグル犬（各群雌雄各 3 例）にホスレボドパ / ホスカルビドパ（注射用水，USP，pH 7.4）を 2400/600 mg/日の用量（200/50 mg/mL の濃度及び 0.5 mL/hr の投与速度）で 2 日間又は 5 日間持続皮下投与した（2.6.7.16.2 項）。対照群（雌雄各 3 例）には生理食塩液（pH 7.4）を 0.5 mL/hr の投与速度で 5 日間連続皮下投与した。本試験では，死亡，一般状態，体重，摂餌量，トキシコキネティクス（ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD），剖検（投与部位のみ）及び病理組織学的検査（投与部位のみ）について評価した。

試験期間中にホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した死亡は認められなかった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した一般状態の変化として，活動性低下，嘔吐及び無便が認められ，摂餌量減少及び体重減少を伴っていた。雌雄ともに，投与部位周囲に軽度の腫脹がみられたが，毒性変化ではないと考えられた。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した病理組織学的所見は，毒性ではない，皮下組織における軽微から中等度の体液貯留のみであった。

200/50 mg/mL のホスレボドパ / ホスカルビドパを 0.5 mL/hr の投与速度で最長 5 日間持続皮下投与したところ，投与部位の局所刺激性に関する忍容性は良好であり，LD 及び CD の C_{ss} は，それぞれ 19.6 及び 5.83 µg/mL であった。

2.6.6.7.3 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 2 週間持続皮下投与忍容性試験

（R&D/16/0886 [4.2.3.6-3 項]）

ホスレボドパ及びホスカルビドパ（三水和物）の忍容性を評価するため，ビーグル犬（各群雄 3 例）にホスレボドパ / ホスカルビドパ（注射用水［USP］及び NaOH 溶液［pH 7.4 に調整］）を 480/120 又は 1200/300 mg/日の用量（200/50 mg/mL の濃度，投与速度はそれぞれ，0.1 又は 0.25 mL/hr）で留置カテーテルを用いて 14 日間持続皮下投与した（2.6.7.16.1 項）。本試験では，死亡，一般状態，体重，摂餌量，トキシコキネティクス，投与部位の X 線画像及び生体分析について評価した。

すべての動物は投与期間終了時まで生存し，試験終了時に施設のコロニーに戻された。

480/120 又は 1200/300 mg/日投与群において，投与期間中に被験物質投与に関連した嘔吐がみられた。1200/300 mg/日投与群において，被験物質投与に関連した摂餌量の減少，無便，無形便及び / 又は水様便が認められた。被験物質投与に関連した体重減少が両群で認められた。両群において投与部位周囲の皮膚の赤色化がみられたが，投与継続中に回復したため，毒性変化ではないと考えられた。また両群において，投与部位周囲の皮膚の黒色化も 6 日目から認められた。投与部位及び周辺部位の X 線画像並びに，ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の生体分析に基づき，この皮膚の黒色化は，カテーテル先端からカテーテル挿入点を経て皮膚へ被験物質が漏出したことによるものであると考えられ，毒性ではないと判断された。

480/120 mg/日を投与したとき，1，7 及び 14 日目の投与開始 24 時間後時点におけるホスレボドパの平均濃度は，それぞれ 0.747，0.353 及び 0.396 µg/mL であり，LD の平均濃度は，それぞれ 1.69，1.50 及び 4.37 µg/mL であった。1200/300 mg/日に増量したとき，ホスレボドパ濃度は用量比を下回る増加傾向を示し，1，7 及び 14 日目の平均濃度はそれぞれ 0.431，0.346 及び 0.658 µg/mL であった。LD 濃度も同様に用量比を下回る増加傾向を示し，平均濃度はそれぞれ 1.83，4.69 及び 5.14 µg/mL であった。ホスカルビドパ及び CD も用量比を下回る増加傾向を示した。480/120 mg/日群の 1，7 及び 14 日目におけるホスカルビドパの平均濃度はそれぞれ 0.213，0.119 及び 0.0912 µg/mL，CD の平均濃度はそれぞれ 0.750，1.21 及び 2.72 µg/mL であった。1200/300 mg/日群では，1，7 及び 14 日目のホスカルビドパの平均濃度は，それぞれ 0.113，0.126 及び 0.175 µg/mL，CD の平均濃度は，それぞれ 1.18，2.41 及び 2.60 µg/mL であった。

以上より，イヌに 0.25 mL/hr（1200/300 mg/日）の投与速度で最長 14 日間にわたり 200/50 mg/mL の濃度のホスレボドパ / ホスカルビドパを持続皮下投与したとき，投与部位に毒性変化は認められなかった。

2.6.6.7.4 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 14 日間持続皮下投与毒性試験

（R&D/16/1374 [4.2.3.6-4 項]）

ホスレボドパ及びホスカルビドパ（三水和物）の忍容性を評価するため，ビーグル犬（各群雌雄各 2 例）に，ホスレボドパ / ホスカルビドパ（注射用水，USP 及び NaOH 溶液［pH 7.4 に調整］）を 480/120 又は 1200/300 mg/日の用量（200/50 mg/mL の濃度，投与速度はそれぞれ，0.1

又は 0.25 mL/hr）で留置カテーテルを用いて 14 日間持続皮下投与した（2.6.7.16.1 項）。対照群（各群雌雄各 2 例）には溶媒のみを 0.25 mL/hr の投与速度で投与した。本試験は，持続皮下投与の手技を改善し，2.6.6.7.3 項に示した 14 日間持続皮下投与試験を再現するものである。

評価項目は，死亡，一般状態，体重及び摂餌量とした。血漿中薬物濃度を評価するため，投与開始後約 24 時間（2 日目），7 及び 15 日目の投与終了前 0–2 分に血液を採取した。

投与期間中，対照群を含む各群の数例に投与ラインの断裂又は閉塞が認められた。しかし，一般状態，摂餌量，体重及び / 又は血漿中全身曝露量への影響から，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に対する明らかな影響は認められなかった。

試験期間中にホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した死亡は認められなかった。ホスレボドパ / ホスカルビドパの持続皮下投与に関連した影響として，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群のほぼ全例で投与開始時に間欠性の嘔吐がみられ，1200/300 mg/日群の全例で投与開始後数日から投与期間終了時まで中等度から重度の摂餌量の減少が認められた。1200/300 mg/日群でみられた摂餌量の減少は，同期間中の軽度から重度の体重減少と相関していた。3–10 日目に同様の摂餌量減少及び体重減少が 480/120 mg/日群の 4 例中 2 例に認められた。両群における摂餌量減少及び体重減少は，乾燥固形飼料に缶詰飼料を添加することで回復した。

腰部の腫瘤 / 腫脹（例として皮下カテーテルの先端部分）の発現頻度は，1200/300 mg/日群の方が 480/120 mg/日群及び対照群よりも高く，長く持続した。これらの腫瘤は，皮下カテーテルの存在に対して予測される通常の局所反応と考えられるが，1200/300 mg/日群で発現頻度の増加及び発現持続時間の延長が認められたことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパの用量増加により増悪した可能性が考えられた。

14 日間持続皮下投与期間中のホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の平均血漿中濃度はほぼ用量に比例して増加した。

要約すると，嘔吐は投与期間の初期で消失し，摂餌量減少 / 体重減少が缶詰飼料の補給で回復したことから，200/50 mg/mL の濃度のホスレボドパ / ホスカルビドパを 0.25 mL/hr（1200/300 mg/日）の投与速度で最長 14 日間持続皮下投与したときの忍容性は良好であった。1200/300 mg/日群における投与部位の腫瘤 / 腫脹の発現頻度の増加及び発現持続時間の延長は，ホスレボドパ / ホスカルビドパの用量増加により増悪した可能性があると考えられた。

2.6.6.7.5 ホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）： ビーグル犬を用いた 28 日間持続皮下投与局所刺激性試験

（R&D/17/0113 [4.2.3.6-5 項]）

ホスレボドパ及びホスカルビドパの局所刺激性を評価するため，ビーグル犬（各群雌雄各 4 例）にホスレボドパ / ホスカルビドパを 480/120 又は 1200/300 mg/日（静菌注射用水［USP］，0.9%ベンジルアルコール，［pH 7.4 に調整］）の用量で 0.1 又は 0.25 mL/hr の投与速度で 28 日間持続皮下投与した（2.6.7.16.3 項）。対照群（雌雄各 4 例）には，溶媒（静菌注射用水［USP］，0.9%ベンジルアルコール，［pH 7.4 に調整］）を 0.25 mL/hr の投与速度で 28 日間持続投与した。Port-A-Cath チタンポートは腰椎領域に，6F カテーテルを皮下に背側肩甲骨間領域まで外科的に埋め込んだ。本試験では，死亡，一般状態，体重，摂餌量，血漿中薬物濃度（ホ

スレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD），臨床病理検査，器官重量，剖検，並びに投与部位及び皮下ポートの周囲の病理組織学的検査について評価した。

炎症の徴候（すなわち，皮膚腫脹 / 発赤 / 腫瘤）が，対照群を含むすべての群で，投与部位（例として，皮下カテーテル穿孔部）では投与前 2 週間及び投与 1 週目に，皮下ポート挿入部位では試験期間を通して認められた。これらの一般状態の変化は，埋め込んだ物に対する正常な生理反応の範囲内であると考えられた。しかし，投与部位の変化の発現頻度及び重症度は，1200/300 mg/日のホスレボドパ / ホスカルビドパ群の方が高く，概して 11–20 日目に発現した。

1200/300 mg/日群の 8 例中 6 例では，これらの一般状態の変化に伴って投与部位に膿瘍形成（例として，顕著な化膿性 / 感染性炎症）が認められたため，22–28 日目に 6 例中 4 例を安楽死させた。高用量群の 8 例中 7 例では，剖検時に採取した組織の細胞学的検査及び細菌学的検査において，細菌培養で陽性の化膿性 / 感染性炎症が認められた。高用量群における膿瘍形成の病因は完全には解明されていないが，浸透圧の高い薬剤を低速で投与（第 2 群，0.1 mL/hr，総量 2.4 mL/日）した場合には膿瘍形成が認められなかったのに対し，同じく浸透圧の高い薬剤を高速で投与（第 3 群，0.25 mL/hr，総量 6 mL/日）した場合に膿瘍形成 / 感染性炎症が認められた。

その他のホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した変化として，480/120 及び 1200/300 mg/日群の多くの動物で投与開始時に間欠的な嘔吐がみられ，投与開始後数日間及び試験期間中には間欠的に少数の動物で中等度から重度の摂餌量減少が認められた。480/120 及び 1200/300 mg/日群における摂餌量減少は，変化の重症度及び / 又は発現の頻度に基づき用量依存的な変化と考えられ，3 日目からみられた用量依存的な中等度から重度の一過性の体重減少とも関連していた。しかし，摂餌量及び体重の減少はいずれも，乾燥固形飼料に缶詰飼料を添加した飼料を与えることで数日間で回復した。体重を維持するため，1200/300 mg/日群では，缶詰飼料による乾燥固形飼料の補給に加えて，流動食の補給が必要であった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパを 1200/300 mg/日の用量で投与した動物では，以下の臨床検査値の変化の発現頻度 / 重症度が対照群と比較してわずかに高かった（ 1）赤血球数，ヘマトクリット及びヘモグロビンの減少，2）好中球数の増加，3）フィブリノーゲン濃度の増加）。これらの変化は，1200/300 mg/日群で投与部位に認められた炎症性変化の重症度が高かったこと，及び / 又は 1200/300 mg/日群で局所的な細菌感染に対する反応が認められたことに関連していると考えられた。

器官重量においては，ホスレボドパ / ホスカルビドパに関連した変化は認められなかった。肉眼的所見はすべての群で同様であり，概して皮膚の変色，皮膚創傷，皮膚又は皮下の腫脹又は肥厚，分泌物又は様々な色の物質（硬い / ゼラチン状 / クリーム状）及び嚢胞であった。病理組織学的検査では，概して皮下に好中球性及び単核球性の炎症並びに皮下の線維増殖及び線維化が認められた。1200/300 mg/日群では，好中球性の皮下の炎症の重症度及び範囲が増加し，イヌの皮膚に通常認められる細菌の二次感染と関連した。細菌感染はホスレボドパ / ホスカルビドパ投与量の増加により増悪した可能性があり，1200/300 mg/日群では忍容性を示さなかった。480/120 mg/日のホスレボドパ / ホスカルビドパ投与の忍容性は良好であった。これらの投与群と対照群の違いは不明瞭であったことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与速度を下げた

場合も，処置及び / 又はカテーテル及びポートの物理的な存在による変化を増悪しないと考えられた。

トキシコキネティクスの結果から，ホスレボドパ / ホスカルビドパの皮下投与により LD 及び CD の全身曝露が確認された。試料採取期間中の個体間及び個体内の変動は大きいが，各分析対象物質の平均血漿中濃度は，両群とも 14 日目まで用量の増加にほぼ比例して増加した。ほとんどの動物において 21 及び 29 日目のすべての分析対象物質の血漿中濃度は前回の採血時点と比べて低かった。全体として，血漿中に分析物が認められたことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパが皮下から血液に移行したことが示された。

本試験の結果に基づき，雌雄ビーグル犬にホスレボドパ / ホスカルビドパを 28 日間持続皮下投与したときの最大耐量は，低用量群の 480/120 mg/日であると判断され，14 日目の LD 及び CD 濃度はそれぞれ 1.05 及び 0.7 µg/mL であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 不純物の特性解析及び安全性の評価

2.6.6.8.1.1 一般不純物

原薬及び製剤の規格が，安全性確認が必要とされる閾値（それぞれ ICH Q3A ガイドライン [3] 及び ICH Q3B ガイドライン [4]）を超える不純物について，不純物の安全性を確認するための毒性試験（2.6.6.8.1.1.2 項）を実施した。本試験では，臨床製剤を用いて，ビーグル犬に臨床投与経路（持続皮下投与）により 13 週間投与した。群構成は溶媒対照，ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパの 3 群（各群雌雄各 4 例）とした。原薬の用量は忍容可能であるが薬理活性が認められる用量を選択し，不純物については，イヌにおけるヒト等価用量に基づき，ヒトの最大投与量と同等又はそれを超える用量となるように原薬に添加した。原薬に添加した不純物 15 種のうち 14 種の濃度は，ヒトでの最大投与量（ヒトにおけるホスレボドパ又はホスカルビドパの最大投与量における規格値）の少なくとも 0.9 倍であった（表 2.6.6-3）。これらの不純物については，当該不純物に起因する全身毒性が認められなかったことから，規格値における安全性が確認されたと判断した。不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパ群では不純物を添加していないホスレボドパ / ホスカルビドパ群と比較してより投与部位への影響が認められたが，これらは臨床上のリスクとはならないと考えられた。不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した動物では，毒性所見として，軽度から顕著なカテーテル管及び投与部位に隣接する皮下組織への鉱質沈着が認められ，これらの変化は（頻度は低いが）皮下ポート部位でも認められ，びらん / 潰瘍及び腫脹 / 肥厚などの剖検所見と一致していた。投与部位における局所反応の亢進は，不純物の総量が多いこと（ホスレボドパの不純物がホスレボドパの約 29%，ホスカルビドパの不純物がホスカルビドパの約 97%）並びにその結果生じる投与液の物理化学的特性への影響に起因すると考えられた。例えば，不純物を添加しないときの浸透圧は 2505 mOsmo/kg であったが，[5] 不純物を添加したときの浸透圧はこの値よりも高かった（既存の方法では定量できていない）。臨床製剤中の不純物の総量は管理されていることから，これらの局所的作用は臨床的に重要ではないと考えられた。本

試験で添加した 15 種類の不純物のうち 1 種類（LD）については，ヒトにおける最大投与量の 0.3 倍であった。しかし，2.6.6.8.1.1.1 項に示した考察に基づき，LD の安全性が確認されたと判断した。

これらの安全性が確認された不純物に関連した遺伝毒性リスクは，プロドラッグ及び親化合物の全体的な遺伝毒性リスクプロファイルに影響を及ぼさないと考えられる。

ホスレボドパは LD と同様に，S9 の有無にかかわらず復帰突然変異試験で陰性であり，in vitro 及び in vivo 染色体異常誘発性は示さない（2.6.6.4 項）。すべてのホスレボドパ関連不純物は復帰突然変異試験で評価されており，陰性又はクラス 4（3.2.S.3.2 項，ホスレボドパ）であった。具体的には：

- 不純物A＊（[redacted]）及び[redacted]（[redacted]）は Ames 試験で陰性であった（R&D/20/0378 及び R&D/18/0795）。
- [redacted]は，ホスレボドパ原薬（A-1591706.0）及び/又は 不純物A＊と警告構造を共有しており，Ames 陰性であることから（CTD 3.2.S.3.2），いずれもクラス 4 と判定された。
- In vitro 染色体異常誘発性の評価において，LDP 4’（ホスレボドパの染色体異常試験［R&D/16/0698］）及び[redacted]の小核試験［非 GLP 試験，社内資料］）はいずれも陰性であった。In vivo 染色体異常誘発性の評価において，LD（CD との併用下，デュオドーパ 毒性試験の概要文，2.6.6.4.1）及び LDP 4’（ホスレボドパ［R&D/19/0121］）は陰性であった。その他の LD 関連不純物はいずれもこれらのプロドラッグの変異体である。具体的には，ほとんどがリン酸基の配置とリン酸基の数の違いであった。リン酸エステルは自然及びヒトの生化学的過程に存在するものであり，親化合物及び[redacted]及び[redacted]を有する LD 化合物において染色体異常誘発性のシグナルは認められなかったことから，追加の染色体異常誘発性試験は不要と考えられた。

したがって，遺伝毒性の観点から，一般不純物として取り扱う。

ホスカルビドパは復帰突然変異試験で陽性（S9 非存在下）であったが，染色体異常誘発性は示さなかった（2.6.6.4 項）。同様に，カルビドパも，S9 の有無にかかわらず復帰突然変異試験で陽性であり，染色体異常誘発性は示さなかった（マウスリンフォーマ試験における大コロニーの陽性所見は，変異原性を反映したものと考えられた）[1]。ホスカルビドパ関連不純物は，ホスカルビドパ及び CD（不純物B＊）と同等の変異原性リスクを有するか，もしくは復帰突然変異試験で陰性（[redacted]）又はクラス 4（[redacted]及びホスカルビドパ+[redacted]）に分類されることに基づいて変異原性を有さないと判断した（3.2.S.3.2 項，ホスカルビドパ）[1]。具体的には：

- 不純物B＊（[redacted]）は Ames 試験で評価され，ホスカルビドパ及び CD と同様の変異原性リスクを有する。
- [redacted]（[redacted]）は Ames 試験で陰性であった。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

- [redacted]（[redacted]）及び[redacted]（[redacted]）は，ホスレボドパ原薬（A-1591706.0）と警告構造を共有していたことから（ホスカルビドパについては CTD 3.2.S.3.2 項及び 3.2.P.5.5 項），クラス 4 と判断された。

ホスカルビドパ関連不純物の染色体異常誘発性リスク：

- CD（不純物B＊）に代謝されるホスカルビドパ関連不純物は，染色体異常誘発性を示さない。不純物B＊は CD の[redacted]であり，[redacted]の位置化学のみが異なるホスカルビドパの構造異性体でもある。[redacted]は自然及びヒトの生化学的過程に存在するものである。In vivo 条件下では，不純物B＊は速やかに CD に代謝され，残存する 不純物B＊はわずかであることから，CD，[redacted]又は[redacted]において評価されていない染色体異常誘発性を示す警告構造は予想されない。CD は，LD の存在下及び非存在下で実施した in vivo マウス小核試験 2 試験（デュオドーパ 毒性試験の概要文，2.6.6.1 及び 2.6.6.3）で陰性であり，CDP 4’（ホスカルビドパ）は，in vitro 染色体異常試験（R&D/16/0698）及び in vivo マウス小核試験（R&D/19/0121）で LDP 4’との併用で陰性であった。また，[redacted]（[redacted]及び[redacted]）を用いた in vitro 小核試験（非 GLP，社内資料）において，陰性であった。総合すると，これらの結果は，不純物B＊の染色体異常誘発性のリスクは無視できることを裏付けている。
- ヒト染色体異常試験（S9 存在下又非存在下）において，[redacted]は陽性であることが示された。[1] [redacted]は[redacted]に代謝され，共に警告構造を有する。ホスカルビドパの[redacted]への酸化は変異原性を低下させるが，染色体異常誘発性を増加させる可能性がある。[redacted]は CD の in vivo 代謝物でもある[1]。ホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床予定最高用量を 6000/300 mg/日としたとき，[redacted]及び[redacted]のヒトにおける想定 1 日曝露量は，それぞれ[redacted]及び[redacted] mg/日である。これらの 1 日曝露量は，LCIG 投与時の[redacted]の想定される曝露量である[redacted] mg/日（CD として 1000 mg を投与した場合の有効期間終了時の規格値[redacted]%）に近い[1]。
- [redacted]（[redacted]，[redacted]）は，染色体異常誘発性が評価されているホスカルビドパと[redacted]である。遺伝毒性に対する警告構造は，この分子の[redacted]と関係すると考えられる。したがって，染色体異常誘発リスクはこれらの[redacted]と同様であると予想される。[redacted]はホスカルビドパ及び[redacted]と平衡状態で形成され，可逆的に結合する。ホスカルビドパは染色体異常誘発能を示さなかった（CTD 2.6.6.4 項）。[redacted]は細菌で変異原性を示さなかったが，in vitro でヒト末梢血リンパ球の染色体構造異常の増加と関連していた。これらの知見は，[redacted]の[redacted]に関連する既知の警告構造及び変異原性データと一致する。[redacted]に関連することとして，[redacted]は[redacted]に代謝され，[redacted]と同様に，in vivo では CD の既知のヒト代謝物である。[redacted]（その約半分のみが[redacted]に関連する）の想定されるヒトの最大 1 日用量は[redacted] mg/日である。この 1 日用量[redacted]は，デュオドーパに含まれる[redacted]の予定用量（[redacted] mg/日，カルビドパ用量 1000 mg の有効期間終了時の規格の[redacted]%）よりも低い。
- [redacted]が代謝産物であることを考慮すると，ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤と LCIG 製剤におけるホスカルビドパ及び CD の 1 日最高用量の差が約[redacted]倍（それぞれ，

[redacted] mg 及び [redacted] mg）であることから，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与による [redacted] の総曝露量は，LCIG 製剤投与時と比較して，低下すると考えられる。

要約すると，これらの不純物が設定した規格値の濃度で存在しても，ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LD 及び CD に関連する遺伝毒性リスクを変化させるとは考えられず，市販されている LCIG と同様のプロファイルを有する[1]。

表 2.6.6-3. イヌを用いた 13 週間投与試験に用いた原薬に含まれる不純物とヒトでの最大投与量との比較

Impurity	A-number	API limit[a]	Total Limit[b]	Toxicology Lot w/w%[c]	Dog Dose mg/kg/day[d]	HE of Dog Dose mg/kg/day[e]	Maximum Human Dose mg/kg/day[f]	Dose Multiple[g]
LDP Impurities								
不純物A＊								
CDP Impurities								
不純物B＊								

- = limit is below qualification threshold; API = active pharmaceutical ingredient; CDP=foscarbidopa; HE = human equivalent; LDP = foslevodopa

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6.8.1.1.1 レボドパの安全性確認

LD はホスレボドパの薬理学的に活性を示す親化合物である。投与されたホスレボドパの約90%以上が LD に変換されるため，ホスレボドパ / ホスカルビドパの一般毒性試験でみられた毒性プロファイルは LD の全身毒性の評価として利用可能である。局所刺激性に関しては，イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験において，製剤における規格値（[redacted]%）と近似した濃度となるように添加（[redacted]%）し，評価した。以上を総合すると，LD の規格値として [redacted]%は適格であると考えられる。

2.6.6.8.1.1.2 ビーグル犬を用いたホスレボドパ（遊離型）及びホスカルビドパ（三水和物）及び類縁物質（配合剤）の皮下投与による 13 週間反復投与試験

（R&D/19/1129 [4.2.3.7.6-1 項]）

ホスレボドパ及びホスカルビドパの製造工程由来不純物又は分解不純物として同定された不純物の安全性を評価するため，ビーグル犬（各群雌雄各 4 例）に，不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパを 0，50/2.5 mg/kg/日，又は不純物を添加しないホスレボドパ / ホスカルビドパを 50/2.5 mg/kg/日の用量で，溶媒には静菌注射用水（USP），（0.9%ベンジルアルコール）を用いて 0.0087 mL/kg/hr の投与速度で 13 週間持続皮下投与した（GLP 試験，2.6.7.17.6.1 項）。

本試験では，死亡，一般状態，全例の剖検時の細菌学的検査，カテーテル留置部位及び / 又は投与部位，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図検査，血漿中ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LD/CD 濃度，血液生化学的検査，血液学的検査，凝固検査，尿検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査を評価した。

全例が計画剖検時まで生存した。

対照群を含むすべての群において，皮下のカテーテルラインに沿った又はポート部位及び / 又は投与部位に腫脹が認められ，この変化は，ホスレボドパ / ホスカルビドパ（不純物の有無を問わない）の蓄積 / 沈着としばしば関連した。不純物を添加しないホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した雄 1 例及び不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した雄 2 例 / 雌 2 例では，投与部位の膿瘍形成につながる腫脹がみられ，その後病変から分泌物が認められた。これらの投与部位の所見は，肉眼的所見である腫脹 / 肥厚，透明な体液及び / 又は嚢胞形成と関連していた。腫脹 / 肥厚は組織学的に混合細胞性炎症と関連していたが，透明な体液又は嚢胞形成には組織学的所見との関連性はみられなかった。これらの所見の有無と細菌増殖（嫌気又は好気性培養）の有無との間にほとんど又は全く相関は認められなかった。

一般状態の変化として削痩が 0 mg/kg/日群の雌雄各 1 例，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群のうち不純物非添加群の雄 2 例及び不純物添加群の雌 3 例，雄 2 例に散発的かつ一過性に認められた。この所見は一過性の食欲不振と関連していた。さらに，ホスレボドパ / ホスカルビドパ（不純物の有無を問わない）を投与した動物では，投与に関連した摂餌量の減少が概ね 1 日目から認められ，試験期間中継続して認められたため，乾燥固形飼料に缶詰食品を追加した。

剖検では，投与に関連した所見は皮下投与部位及び皮下ポート部位に限られていた。不純物を添加したホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した動物では，投与部位及び（まれに）皮下ポート部位に軽度から顕著なカテーテル管に隣接する皮下組織に鉱質沈着が認められ，雄 1 例では，肉眼的所見である裂傷 / 穿孔に関連した重度の皮膚のびらん / 潰瘍（瘻孔）が認められた。この群の動物では，他の群と比較して投与部位の肉眼的腫脹 / 肥厚の発現頻度も増加した。不純物を含まないホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した動物では，不純物を添加した群で認められたカテーテル管の鉱質沈着は認められなかった。不純物の有無にかかわらず，ホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した群では，対照群と比較して被験物質投与に関連した色素沈着マクロファージの発現頻度及び重症度の増加がみられたが，関連する退行性の変化が認められなかったことから，毒性変化ではないと考えられた。

対照群ではホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LD/CD は検出されなかった。また，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群では，ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD のトキシコキネティクスパラメータは，不純物の有無にかかわらず同様であった。以上より，雌雄ビーグル犬に不純物を添加又は添加せずにホスレボドパ / ホスカルビドパを 50/2.5 mg/kg/日の用量で 13 週間持続皮下投与したとき，栄養強化 / 補給により体重がおおむね維持され，毒性を示唆する臨床病理学的変化が認められなかったことから，忍容性が認められた。投与部位及び皮下ポート部位の処置に関連した変化は軽微から顕著であった。認められた変化は，線維化，混合細胞性炎症，異物肉芽腫，空洞形成及びびらん / 潰瘍であった。混合細胞性炎症は，しばしば腫脹 / 肥厚の肉眼的所見と一致していた。本試験の結果から，ホスレボドパ / ホスカルビドパの製造工程由来不純物及び分解不純物は，摂餌量の減少及び有害な鉱質沈着を引き起こし，投与部位及び皮下ポートのカテーテル管に隣接する皮下組織にしばしばびらん / 潰瘍を引き起こした。

2.6.6.8.1.2 ヒドラジン

ヒドラジンはホスカルビドパ及び CD の分解物であり，保管及び取扱い中にホスレボドパ / ホスカルビドパより生成される可能性がある。ヒドラジンは，利用可能な文献に基づき ICH M7（R1）ガイドライン [2] において，変異原性発がん物質と指定されている。公表文献（例：マウスリンフォーマ試験）で明確でないと判断された所見の一部を最新の方法を用いてさらに評価するための試験，及び機序に関して既存の文献を補足するための追加試験（例：Big Blue ®マウスを用いた in vivo 変異原性試験）を実施した。これらの試験を以下に示し，ICH M7（R1）ガイドライン [2] 及びこれらの試験に基づく非臨床リスク評価を 2.6.6.9.4.1 項に示す。

2.6.6.8.1.2.1 ヒドラジン一水和物の復帰突然変異試験

（R&D/19/0390 [4.2.3.7.6-2 項]）

本試験の目的は，ヒスチジン要求性ネズミチフス菌株（サルモネラ属，TA98，TA100，TA1535 及び TA1537）のトリプトファン要求性大腸菌株（WP2 uvrApKM101）を用いて被験物質及び / 又は代謝物の復帰突然変異誘発能を，S9 の存在下及び非存在下で評価することであった（2.6.7.17.6.2 項）。

ヒドラジン一水和物（ヒドラジン）の変異原性は，プレート法により，S9 存在下及び非存在下で 0.07–250 µg/well の濃度範囲で評価した。ヒドラジンは水に溶解し，試験した最高濃度 12.5 mg/mL で無色溶液となった。

インキュベーション期間終了後，S9 非存在下の試験菌株 TA98 では 17 µg/well より，試験菌株 TA100，TA1535，TA1537 及び大腸菌株で 150 µg/well より背景の細菌の生育の減少が認められた。S9 存在下では，背景の細菌の生育の減少が，試験菌株 TA100，TA1535 及び TA1537 では 150 µg/well から，試験菌株 TA98 及び大腸菌株では 250 µg/well から認められた。

全ての試験菌株において，S9 存在下及び非存在下のいずれの濃度においても析出は認められなかった。

試験菌株 TA1535 では，復帰変異コロニーは S9 非存在下及び存在下で溶媒対照のそれぞれ 4.5 倍及び 5.4 倍に増加した。大腸菌株では，用量依存的な増加が認められ，S9 非存在下及び存在下で溶媒対照のそれぞれ 2.4 倍及び 2.3 倍に増加した。

すべての溶媒対照群における結果は許容可能な背景データの範囲内であり，陽性対照は試験菌株が変異原性物質を検出できることを示した。したがって，本試験は妥当であると判断された。

これらの結果から，ヒドラジンは細菌を用いた復帰突然変異試験において陽性（変異原性を有する）であることが示された。

2.6.6.8.1.2.2 ヒドラジン一水和物処理による DNA 修復経路に関する検討

（R&D/19/1160 [4.2.3.7.6-3 項]）

本試験は，ヒドラジン一水和物（2.6.7.17.6.2 項）の遺伝毒性に対する細胞保護作用に関わる主要な DNA 損傷修復機構を明らかにするために実施した。

ヒドラジン一水和物の遺伝毒性に対する細胞保護作用に関わる機序を評価するため，特定の DNA 修復因子に変異があることが明らかとなっている種々のほ乳類細胞株を用いて検討した。DNA 修復変異細胞株の試験化合物に対する感受性を Alamar Blue 細胞生存率アッセイ及びクローン形成細胞生存率アッセイにより検討した。試験の妥当性を，種々の DNA 修復変異細胞株に関連する参照遺伝毒性化学物質へ曝露することにより検証した。

ヒドラジン一水和物は，ミリモル濃度（1–4 mmol/L）で有意な細胞毒性（> 50%）を誘発する。塩基除去修復変異細胞においては，野生型親細胞と比較して細胞毒性の増加又は減少は認められなかった。ヒドラジン一水和物は，ゲノム全体又は転写共役ヌクレオチド除去修復のどちらかが欠損した 2 種類の細胞株で細胞毒性を増加させた。ヒドラジン一水和物は，野生型親細胞株と比較して，XRCC4 欠損非相同末端結合（以下「NHEJ」）DNA 修復変異細胞株で細胞毒性を増加させた。これはヒドラジンが DNA 修復に NHEJ を必要とする DNA 二本鎖切断を誘導することを示唆する。ヒドラジン一水和物は，野生型親細胞株と比較して，DNA ミスマッチ修復（以下「MMR」）変異細胞株及び DNA 翻訳合成（以下「TLS」）変異細胞株に対する細胞毒性を増加及び減少させなかった。結論として，ヌクレオチド除去修復及び NHEJ DNA 修復経路が

欠損する細胞が，ヒドラジン一水和物に対して感受性を示したことから，ヒドラジン曝露による DNA 損傷部位の認識及び修復にこれらの DNA 修復機構が重要であることを示された。

2.6.6.8.1.2.3 ヒドラジンを用いた FE1 細胞の in vitro 導入遺伝子突然変異試験

（R&D/18/0858 [4.2.3.7.6-4 項]）

Muta™マウス肺 FE1 細胞[6]を用いて，S9 存在下及び非存在下において in vitro 導入遺伝子突然変異試験を実施した。400 から 1000 µg/mL のヒドラジン濃度について評価した。溶媒対照（滅菌蒸留水）及び陽性対照（Benzo[a]pyrene (BaP)，S9 非存在下及び 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4, 5-b) pyridine （PHiP），S9 存在下）についてもヒドラジンと同時に試験を行った（2.6.7.17.6.2 項）。

変異頻度が溶媒対照と比較して濃度依存的な統計学的有意な増加を示した場合，被験物質は陽性（変異原性）を示したと判断した。濃度依存的な変異頻度の増加がみられず，再現性のある統計学的有意な増加が認められない場合，被験物質は陰性であると判断した。

ヒドラジンによる突然変異頻度を，溶媒対照と比較した。S9 の有無にかかわらず，変異頻度に一貫した有意な増加は認められなかった。実施した試験の妥当性は確認された。

以上の結果から，ヒドラジンは S9 存在下又は非存在下で FE1 細胞に対して変異を誘導しないことが示された。

2.6.6.8.1.2.4 ヒドラジン一水和物の in vitro ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（L5178Y/TK +/-マウスリンフォーマ試験）

（R&D/18/0227 [4.2.3.7.6-5 項]）

ヒドラジン一水和物の，L5178Y マウスリンフォーマ細胞のチミジンキナーゼ（以下「TK」）遺伝子座における前進突然変異誘発能を，S9 存在下及び非存在下で評価した（2.6.7.17.6.2 項）。溶媒として水を用いた。マウスリンフォーマ試験はソフトアガー法を用いて実施した。

S9 存在下のマウスリンフォーマ試験では，5，25，50，70，200，281，376 及び 501 µg/mL の濃度で 4 時間処理した。処理開始時及び終了時に肉眼で確認できる析出物は認められなかった。全ての濃度において処理した培養細胞は 27%–99%の相対浮遊細胞増殖率（以下「RSG」）を示し，クローン化した。クローン化細胞の相対総増殖率は 23%–92%であった。70 µg/mL 以上の濃度で，10^6 クローン化細胞あたり 90 変異以上の誘発変異頻度の増加が認められた。

S9 非存在下のマウスリンフォーマ試験では，3.91，7.83，15.7，31.3，62.6，125，251 及び 501 µg/mL の濃度で 4 時間処理した。処理開始時及び終了時に肉眼で確認できる析出物は認められなかった。全ての濃度において処理した培養細胞は 15%–96%の RSG を示し，クローン化した。クローン化細胞の相対総増殖率は 12%–117%であった。10^6 クローン化細胞あたり 90 変異以上の誘発変異頻度の増加は認められなかった。

陽性対照及び溶媒対照，並びに被験物質を 70 µg/mL 以上の濃度で，S9 存在下で 4 時間処理したときのトリフルオロチミジン耐性コロニーの大きさは，直径が約 0.2–1.1 mm の範囲であった。コロニーサイズ分布のデータにおいて，被験物質を処理した培養細胞を溶媒対照の培養細胞と

比較したところ，小コロニー（0.63 mm 以下）及び大コロニー（0.63 mm 超）の頻度の増加がみられ，大コロニーより小コロニーの頻度増加の方が顕著であった。小コロニーの出現頻度の増加は，TK 遺伝子座の機能喪失に加えて，11 番染色体上の複数の遺伝子座の損傷に一致する。大コロニーの増加は，点突然変異又は TK 遺伝子座内の小さな欠失といった局所的な損傷を示す[7,8]。MMS 及び DMBA 陽性対照のコロニーサイズの解析では，予測されたように小コロニー（小コロニーの検出法の妥当性を検証する）及び大コロニーの増加がみられた。

陽性対照及び溶媒対照における結果はいずれも許容範囲内であり，本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から，ヒドラジン一水和物は，L5178Y マウスリンフォーマ細胞の TK 遺伝子座において S9 存在下で前進突然変異誘発能を示し，小コロニー（染色体異常の典型的所見）の増加がより顕著であり，S9 非存在下では前進突然変異誘発能を示さなかった。

2.6.6.8.1.2.5 ヒドラジン一水和物の Big Blue ®トランスジェニック C57BL/6 マウスを用いた cII 座での in vivo 突然変異試験

（R&D/18/1285 [4.2.3.7.6-6 項]）

雌 Big Blue トランスジェニック C57BL/6 マウスの肝臓及び肺を用いて cII 遺伝子座での変異頻度に与えるヒドラジン一水和物の影響を検討した。Big Blue Assay は OECD ガイドライン（OECD 488）[9]に記載されているトランスジェニックげっ歯類（以下「TGR」）突然変異試験である。

突然変異試験（メインコホート）では，Big Blue トランスジェニック C57BL/6 マウスの雌 6 例 / 群（溶媒対照群及び被験物質投与群）及び雄 6 例（陽性対照群）を用いた。（2.6.7.17.6.2 項）。トキシコキネティクス測定用コホートとして，野生型 C57BL/6 マウス雌 4 例 / 群（溶媒対照群及び被験物質投与群のみ）を用いた。ヒドラジン製剤は，補正係数 1.56 を用いて純度及び水分を補正した。

試験の第 1 相では，雌マウスに水（第 1 群）又は飲水中ヒドラジンを加え（第 2–4 群）1.0，7.5 及び 10.9 mg/kg/日の用量で，28 日間連続曝露した。陽性対照群の雄（第 5 群）には，1，2 及び 3 日目にエチルニトロソウレア（以下「ENU」）を 40 mg/kg/回の用量で強制経口投与した。ENU は強力な直接作用型変異原物質であり，標的組織で変異原性を示した。

試験の第 2 相では，第 6 群の雌マウスには水を，第 7 群の雌マウスには 5 mg/kg/日の用量で水に溶解したヒドラジンを 28 日間連日強制経口投与した。すべての強制経口投与（第 5 群の雄を含む）の投与容量は 10 mL/kg であった。

生存動物は 28 日目（トキシコキネティクス測定用コホート）又は 31 日目（メインコホート）に安楽殺した。メインコホートでは，剖検時に肝臓，肺及び腺胃を採取し，重量を測定した後，瞬間凍結し，-60°C 以下で保存した。各群 5 例以上の動物から採取した組織（肝臓及び肺）を DNA 単離及び cII 変異体の解析のために処理した。

ヒドラジン投与による死亡はみられず，毒性と考えられる臨床徴候も認められなかった。

最終体重及び試験期間を通じた体重に毒性学的に意義のある変化は認められなかった。試験期間中（投与前日から 31 日目）における平均体重増加量は，ヒドラジン投与群と溶媒対照群と

で同程度であったが，高用量群（第 4 群）の平均体重は，投与開始後 2 週間は低値を示したが，後半には回復した。高濃度では被験物質は嗜好性を示さないと考えられたため，第 3 及び 4 群の摂水量は溶媒対照群と比較して投与期間を通して（用量依存的に）低かった。

本試験の条件下において，ヒドラジンは，本試験で投与した 10.9 mg/kg/日まで，Big Blue マウスの肝臓及び肺において cII 変異体を誘導しなかった。陽性対照では，両組織において統計学的に有意な変異頻度の増加がみられたことから，本試験は既知の直接作用型の突然変異誘発物質により誘導される変異を検出[redacted]の試験方法の判定基準に適合していたことから本試験は妥当であった。

2.6.6.8.1.3 製造工程由来不純物 / 分解物に関する細菌を用いた変異原性試験

中間体及び溶媒を含むホスレボドパ / ホスカルビドパ原薬及び製剤の潜在的製造工程由来不純物 / 分解物について，変異原性評価（すなわち，DEREK 解析，Case Ultra 解析，文献調査）を実施した（ホスレボドパは 3.2.S.3.2 項，ホスカルビドパは 3.2.S.3.2 項を参照）。変異原性に関する警告構造を有するすべての不純物は，その後の細菌を用いた変異原性試験（復帰突然変異試験）で陰性であることが示されたため，変異原性の懸念がある不純物とはみなさない。変異原性試験（GLP 試験）はプレート法を用いて実施した。試験した不純物を（2.6.7.17.6.3 項）に示す。

2.6.6.8.2 その他

2.6.6.8.2.1 [redacted]（[redacted]）の一日許容曝露量（PDE）値の導出

[redacted]（[redacted]）はホスレボドパ中の不純物として検出されるため，一日許容曝露量（以下「PDE」）を決定した。

「評価報告書」に引用されているように，清涼飲料水に含まれる[redacted]の耐容一日摂取量は[redacted] µg/kg/日，体重 50kg の人では[redacted] µg/日である。[12] ICH-Q3D では，経口バイオアベイラビリティが 1%以上 50%未満の元素及び非経口バイオアベイラビリティが不明の元素に対して修正係数 10 を推奨している。[13] この 10 倍の補正係数を[redacted] µg/日に適用すると，皮下投与時の PDE 値は[redacted] µg/日となる。

2.6.6.8.2.2 ビーグル犬の皮下投与試験に使用したホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）の pH 7.4 製剤の適合性 / 安定性

（R&D/16/1419 [4.2.3.7.7-1 項]）

ビーグル犬を用いた皮下投与試験に使用した薬剤（2.6.7.17.7.1 項）におけるホスレボドパ / ホスカルビドパ（ホスレボドパとホスカルビドパの 4：1 配合剤）の適合性を検討した。試験は以下の点を考慮して実施した。

- 用量の一貫性（濃度）を経時的に評価。
- チューブ及びカテーテルへの被験物質の吸着を評価。
- シリンジ内への被験物質の吸着を評価。
- 体温が被験物質の安定性並びにチューブ及びカテーテルへの吸着に及ぼす影響を評価。
- 投与溶液が透明で粒子状物質を含まないこと。

いずれの製剤も，破片を含まない透明な溶液であった。0.1 及び 0.25 mL/hr の溶媒対照（溶媒，注射用水，USP pH 7.4）には，ホスレボドパ及びホスカルビドパいずれも検出されなかった。

表 2.6.6-4. ビーグル犬の皮下投与試験に使用したホスレボドパ（遊離型） / ホスカルビドパ（三水和物）の pH 7.4 製剤の適合性 / 安定性

Sample	Nominal A-1591706.0 Conc. (mg/mL)	Nominal A-1610308.0 Conc. (mg/mL)	Measured A-1591706.0 Conc. (mg/mL)	Measured A-1610308.0 Conc. (mg/mL)	% A-1591706.0 Conc. From Nominal	% A-1610308.0 Conc. From Nominal
Post Filtration	200	50	199	49.7	100	99
Syringe Post Infusion (Setup 1A)	200	50	199	49.3	100	99
Syringe Post Infusion (Setup 1B)	200	50	201	49.9	101	100
Setup 1A	200	50	247	58.5	124	117
Setup 1B	200	50	249	58.7	125	117
Setup 2A	200	50	222	53.2	111	106
Setup 2B	200	50	231	53.1	116	106

Setup 1A and 1B: exposure to 200/50 mg/ml foslevodopa/foscarbidopa at 0.1 mL/hr. Duplicate sets.
Setup 2A and 2B: exposure to 200/50 mg/ml foslevodopa/foscarbidopa at 0.25 mL/hr. Duplicate sets.

Conc. = concentration

ろ過後及び投与シリンジから 26 時間後に採取した試料の濃度は同等であり，設定濃度から99%–101%の範囲であり，これは±10%の許容範囲内であった。

高い投与速度（0.25 mL/hr）では，投与液中のホスカルビドパ濃度は設定濃度の±10%の許容範囲内であった（106%）。しかし，ホスレボドパ濃度は，設定濃度の±10%の許容範囲をわずかに上回っていた（111%及び 116%）。

低い投与速度（0.1 mL/hr）では，投与液中のホスレボドパ及びホスカルビドパ濃度はいずれも設定濃度の±10%の許容範囲より高かった（それぞれ 124%–125%及び 117%）。

上述したように，いずれの投与条件（0.1 mL/hr 及び 0.25 mL/hr）においてもホスレボドパ及びホスカルビドパ濃度にわずかな増加がみられたことは，37°C に曝露された点滴静注システムの製剤からの水分喪失に起因する可能性がある。

結論として，200/50 mg/mL のホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤は透明な溶液であり，投与シリンジ，カテーテル，皮下ポート及びスイベル / コネクターに吸着は認められなかった。したがって，皮下投与試験に用いた投与液はこの濃度でホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤と適合すると考えられた。

2.6.6.8.3 光毒性試験

ホスレボドパ / ホスカルビドパの光毒性試験は実施していない。ホスレボドパ / ホスカルビドパは 290–700 nm の光を吸収しないことから（ホスレボドパは 3.2.S.3.2.6 項，ホスカルビドパは 3.2.S.3.2.7 項を参照），ICH S10 ガイドラインに従い，さらなる光毒性評価は実施しなかった。光毒性のリスクは低いと考えられる。

2.6.6.9 考察及び結論

ホスレボドパ / ホスカルビドパの主な毒性学的影響は，用量依存的な CNS に関連した一般状態の変化及び体重増加量 / 体重の減少に至る摂餌量減少である。これらの変化は既存の LD/CD 製剤及び LCIG 製剤の非臨床成績，並びにカニクイザルを用いた LD/CD 持続静脈内投与試験の結果と一致している。これらの CNS に関連した一般状態の変化は毒性と考えられ，摂餌量及び体重への影響は高用量のホスレボドパ / ホスカルビドパにおける用量制限毒性と考えられた。投与部位にホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した特異的な局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.9.1 全身毒性

2.6.6.9.1.1 一般状態

ホスレボドパ / ホスカルビドパをラット及びカニクイザルに静脈内投与，並びにイヌに皮下投与したとき，CNS への影響を示唆するホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した一般状

態の変化が認められた（2.6.6.3 項）。これらの変化は，カニクイザル（2.6.6.3.6 項）並びにラット及びイヌに LD/CD 製剤を投与したときに認められた変化と一致している[1]。

ラットを用いた 2 週間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 250/62.5 mg/kg 以上の用量で投与したとき，異常発声及び接触過敏などの一般状態の変化が認められた（2.6.6.3.1 項）。ラットを用いた 28 日間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 250/62.5 mg/kg 以上の用量で投与したとき，異常発声，常同行動（立ち上がり，反応性亢進），接触過敏，攻撃性及び活動性亢進などの CNS に関連する一般状態の変化が認められた（2.6.6.3.2 項）。これらのホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連したラットの一般状態の変化は，重症度の観点から毒性ではないと判断した。

サルを用いた 5 日間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与により 100/25 mg/kg 以上の用量で活動性低下，円背位及び常同行動などの CNS に関連した一般状態の変化が認められた（2.6.6.3.3 項）。200/50 mg/kg のホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したサルでは，活動性亢進も認められた。サルを用いた 14 日間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与により 100/25 mg/kg 以上の用量で活動性亢進及び常同行動が認められた（2.6.6.3.4 項）。サルを用いた 28 日間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与により 200/50 mg/kg 以上の用量で攻撃性，活動性亢進及び常同行動（かむ，頭を上下に振る，反応性亢進）などの CNS に関連した一般状態の変化が認められた（2.6.6.3.5 項）。これらの一般状態の変化の発現頻度及び重症度は 300/75 mg/kg 群で増加し，この群ではその他の一般状態の変化として円背位及び運動失調も認められた。300/75 mg/kg 群の 1 例は，4–8 日及び 15–19 日に投与を休止し，回復傾向は認められたものの，CNS 関連の一般状態の変化が重篤であったため，19 日目に安楽死させた。300/75 mg/kg 群で認められたこれらの CNS に関連した一般状態の変化は，ホスレボドパ / ホスカルビドパで予想される薬理作用に関連したものであり，2.6.6.3 項に記載した LD/CD 製剤の持続静脈内投与試験の結果と一致していたが，認められた所見の重症度から毒性と判断された。

イヌを用いた 2 日間用量設定試験（非 GLP 試験）において，ホスレボドパ / ホスカルビドパの 200/50 mg/mL 製剤を雌雄各 1 例に 1 mL/hr の投与速度（雌では約 691/173 mg/kg/日の用量）で持続皮下投与したところ，雌では忍容できない CNS への影響（強迫行動［旋回］，運動失調，爪先歩行，前肢屈曲異常，側臥位）が認められた（2.6.6.7.1 項）。その後実施したイヌを用いた皮下投与試験では摂餌量 / 体重への影響が認められたが，曝露量が低く，CNS への顕著な影響は認められなかった。

摂餌量：

ラット，サル及びイヌにホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したところ，用量依存的に摂餌量が減少し，それに伴い体重 / 体重増加量が減少した。

ラットを用いた 14 日間（非 GLP 試験）及び 4 週間（GLP 試験）持続静脈内投与試験において，250/62.5 及び 500/125 mg/kg の用量で摂餌量の用量依存的な減少が試験の最初の週に概して認められた（2.6.6.3 項）。イヌを用いた 13 週間持続皮下投与試験（GLP 試験）では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 576/28.8 mg/日の用量で投与した群で摂餌量の減少が認められた

（2.6.6.3.7 項）。これらの摂餌量の減少は体重及び体重増加量の減少と関連しており，一般状態に影響を及ぼさなかったことから毒性変化ではないと考えられた。サルを用いた 14 日間持続静脈内投与試験（非 GLP 試験）ではホスレボドパ / ホスカルビドパを 100/25 mg/kg/日以上の用量，4 週間持続静脈内投与試験（GLP 試験）では 300/75 mg/kg/日の用量で投与したとき，散発的に食欲不振がみられた（2.6.6.3 項）。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した摂餌量に対する影響は，影響の程度から毒性ではないと考えられた。また，ラット及びサルを用いた LD/CD 製剤の強制経口投与による非臨床試験でこれまでに報告されている所見と同様であった [1]。さらに，サルを用いた LD/CD の 14 日間持続静脈内投与試験（非 GLP 試験）では，200/50 mg/kg 以上の用量で食欲不振が認められた（2.6.6.3.6 項）。したがって，ホスレボドパ / ホスカルビドパの投与に関連した摂餌量の減少は LD/CD の薬理作用に関連すると考えられた。

体重：

ラット，サル及びイヌにホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したところ，摂餌量の減少に起因する体重及び体重増加量の用量依存的な減少が認められた。

ラットを用いた 2 週間持続静脈内投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 250/62.5 及び 500/125 mg/kg の用量で投与したところ，一過性の体重増加量の減少が認められた（2.6.6.3.1 項）。ラットを用いた 28 日間持続静脈内投与試験（GLP 試験）では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 250/62.5 及び 500/125 mg/kg の用量で投与したところ，一過性の体重増加量減少及び体重減少が認められた（2.6.6.3.2 項）。サルを用いた 5 日間及び 14 日間持続静脈内投与毒性試験（非 GLP 試験）では 100/25 mg/kg 以上の群で，サルを用いた 4 週間持続静脈内投与毒性試験（GLP 試験）では 300/75 mg/kg 群の雄で，一過性の体重減少が認められた（2.6.6.3 項）。これらのホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した体重への影響は，ラットでは 250/62.5 及び 500/125 mg/kg，サルでは 100/25 mg/kg 以上でみられたが，毒性と判断される重篤性はみられなかった。イヌを用いた 13 週間持続皮下投与試験（GLP 試験）では，ホスレボドパ / ホスカルビドパを 576/28.8 mg/日の用量で投与した個体で一過性の体重減少が認められた（2.6.6.3.7 項）。ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した体重 / 体重増加量の減少は，ラット及びサルに LD/CD 製剤を強制経口投与した試験に基づき，LD/CD の薬理作用に関連すると考えられた [1]。

2.6.6.9.1.2 プロドラッグの代謝に由来するリン酸塩

ホスレボドパ / ホスカルビドパは，薬理活性を有する LD 及び CD に一リン酸を結合させたプロドラッグである。プロドラッグの代謝により遊離されるリン酸脱離基による毒性は低いと考えられる。ホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床予定最高用量である 6000/300 mg/日から予想される 1 日リン負荷量は約 700 mg であり，米国科学アカデミーの食事摂取基準上限値である 3000 mg/日よりも大幅に低いことから，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与によるリスクは低いと考えられる [12, 14]。

血清リン（無機リン酸塩として測定）濃度は，腸管吸収，骨への流入 / 流出，腎排泄，及び腸管分泌でバランスのとれた狭い範囲内で調節されている。血清リン濃度は血清カルシウム濃度と密接に関連しており，上皮小体ホルモンとビタミン D が腸管吸収，腎排泄，そして骨への流入 / 流出に影響を与える。正常範囲外の血清リン濃度は高リン酸血症又は低リン酸血症を引き起こす可能性があり，正常範囲外の血清リン濃度が長期的に持続すると，軟部組織の石灰化などの様々な有害事象を引き起こす可能性がある。リン不均衡の結果はよく理解されており，モニタリングが可能である。

ラット又はサルを用いた 4 週間までの反復投与試験において，軽度から中等度の血清リンの増加又は減少が認められたが，これらは毒性変化ではないと考えられた（2.6.6.3 項）。これらの試験及びイヌを用いた最長 13 週間の持続皮下投与試験では，血清リンの有意な増加は認められなかった（2.6.6.3.7 項）。また，腎機能及び腎臓の病理組織学的検査に変化は認められなかった。

2.6.6.9.2 皮下投与部位の忍容性

イヌを用いた一連の持続皮下投与試験において，投与部位の忍容性を評価した。2.6.6.7 項に概説したように，試験では臨床的に意義のある処方を用いて実施した（すなわち，ホスレボドパ / ホスカルビドパ濃度，溶媒及び pH が同一の製剤）。体重差及び正常動物のドパミン作動性刺激に対する薬理学的感受性により，イヌで検討した用量はヒトで検討した用量よりも必然的に低かった。しかし，13 週間投与試験を含め，試験期間中は同一の投与部位から継続的に投与していたことから，イヌ試験において十分な組織曝露量を得られたと考えられる。一方，臨床使用では，1 つの投与部位は 3 日間使用した後，投与部位を変更することを推奨しており，新たな投与部位は，過去 12 日間に使用した部位から 2.5 cm 以上離すことが望ましいとしている。

投与部位にホスレボドパ / ホスカルビドパに関連する特異的な毒性変化は認められなかった。ほとんどの試験では，異物反応で予想されるように，留置カテーテル周囲に炎症が認められた。一部の試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパにより炎症の悪化がみられた。この例として，イヌを用いた 28 日間持続皮下投与試験があり，この試験では 2 種類の異なる投与液量（ホスレボドパ / ホスカルビドパの 200/50 mg/mL 製剤を 0.1 及び 0.25 mL/hr の投与速度で投与）を評価した（2.6.6.7.5 項）。溶媒対照群を含むすべての群で認められた処置に関連した病理組織学的所見は，対照群又はホスレボドパ / ホスカルビドパ 0.1 mL/hr 投与群のイヌにおける軽微から重度の皮下の好中球性炎症であり，重症度及び発現頻度に差はみられなかった。対照群を含むすべての群で認められたその他の所見は，単核球性炎症並びに皮下の線維増殖及び線維化であった。すべての投与群において皮下ポート及びその周囲では上記の皮下組織と同様の変化が認められ，重症度又は範囲に用量依存的な傾向はなかった。高用量のホスレボドパ / ホスカルビドパを 0.25 mL/hr の投与速度で投与したイヌでは，好中球性炎症は軽微から重度であり，最も重度に影響を受けたイヌでは細菌感染も認められた。高用量群では線維増殖がわずかに増加した。このように，0.25 mL/hr 群では 0.1 mL/hr 群及び対照群と同様の炎症性変化が観察され，重症度がわずかに増加した。

イヌを用いた 13 週間投与試験では，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与による投与部位の炎症の増強は認められなかった。2.6.6.7 項で記載したように，カテーテルタイプをイヌ 28 日間試験及びその後の 13 週間試験では変更した。イヌでは改良型 cath-in-cath カテーテルの忍容性が高かったが，このカテーテルタイプにおいて病理変化が依然として認められた。すべての動物において皮下カテーテル，カテーテルループ又はカテーテルポートの存在に関連した多数の処置に関連した変化が観察され，留置物に対する皮下組織の予想される反応によるものと考えられた。皮下投与部位に認められた顕著な病理組織学的変化は，軽度から顕著な皮下の線維化，軽微から顕著な皮下の混合細胞炎症及び軽微から軽度の皮下の顕微鏡的出血（しばしば線維化又は炎症領域内）であった。概してカテーテルとカテーテルループの全長を取り囲むように皮下の線維化がみられ，多くはさまざまな炎症細胞が浸潤していた。全体として，投与部位の変化は，発現頻度及び重症度の点でホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した 2 群間（91 日間の連続投与群及び間欠投与群）並びにこれら 2 群と同時対照群間で同程度であり，本試験の条件下ではホスレボドパ / ホスカルビドパの局所における忍容性は概ね良好であることが示唆された。

投与部位におけるホスレボドパ / ホスカルビドパ投与に関連した病理組織学的所見は，色素沈着マクロファージの存在であり，毒性ではないと考えられた。イヌを用いた 13 週間皮下投与試験では，投与部位やカテーテル周囲の皮下組織に軽微，軽度又は中等度の豊富な褐色緑色色素を有する食細胞の細胞質の膨張を特徴とする色素沈着マクロファージの浸潤がみられた。この所見はホスレボドパ / ホスカルビドパを 13 週間連続投与した雌雄全例及び間欠投与した雌雄全例で認められたが，対照群では認められなかった。色素沈着マクロファージは鉄 / ヘモジデリンに対するマロリー染色で部分的に青色に染色された。しかしながら，色素沈着部分の多くは鉄に対するマロリー染色で染色されなかったことから，色素の大部分は鉄又はヘモジデリンではなく，ホスレボドパ / ホスカルビドパの可能性が示唆された。この所見は投与部位の肉眼所見である黒色変化と関連していた。

投与群の雌雄ともに腋窩及び腰部リンパ節において，静脈洞内に軽微から中等度の色素沈着マクロファージがみられ，投与部位にみられたものと同様の褐色緑色色素で満たされていた。ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群のリンパ節におけるこの色素沈着マクロファージは，ホスレボドパ / ホスカルビドパに起因するものと考えられ，投与部位からの漏出の結果として赤血球貪食が生じた可能性がある。対照群の雄 1 例の腋窩リンパ節にも，ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与群と同様の軽微な色素沈着マクロファージがみられたが，これは投与部位出血によるヘモジデリンに起因する可能性があると考えられた。

要約すると，イヌに最長 13 週間の持続皮下投与が可能なカテーテル投与系を確立した。これらの試験において，ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の一貫した全身曝露が示された。ホスレボドパ / ホスカルビドパに起因すると考えられる特有の病理所見はなく，手技に関連する背景病理の悪化であると考えられた。外科的に留置したカテーテルによる二次的な病理変化により，被験物質投与による炎症に対するわずかな変化は検出できないものの，有意な毒性変化については検出可能な試験系であると考えられる。イヌ試験における所見は，ホスレボドパ / ホスカルビドパが同一部位に長期にわたって持続注入されるという極端な状況を表している。一方，臨床使用時は，注入部位は定期的に（少なくとも 3 日ごとに）変えることとしている。

イヌを用いた皮下投与毒性試験とは対照的に，臨床使用時ではカテーテル留置部位を適切に衛生管理することが可能であると考えられる。

2.6.6.9.3 製品品質

製剤品質を支持するための非臨床安全性評価として，原薬及び製剤の不純物（2.6.6.8.1.1 項）の安全性評価及び遺伝毒性不純物であるヒドラジンのリスク評価を実施した。

2.6.6.9.3.1 遺伝毒性不純物

ヒドラジンは，CD の分解不純物である。遺伝毒性の発現機序をより明らかにするために実施した試験を 2.6.6.8.1.2 項に示す。非臨床リスク評価を 2.6.6.9.4.1 項に示す。

2.6.6.9.4 非臨床リスク評価

ホスレボドパ / ホスカルビドパの非臨床リスク評価は，遺伝毒性発がん物質であるヒドラジンのリスク評価及び反復投与毒性試験で認められた全身毒性を中心に実施した。がん原性，生殖及び発生に関連するリスクは，過去に LD/CD で検討されたものと同じである[1]。

2.6.6.9.4.1 ヒドラジン

ヒドラジンが CD の分解により生成される条件は十分に検討されており，またホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤中のヒドラジン濃度を最小にするための CMC 管理戦略が導入されている（3.2.P.3.4 項及び 3.2.P.5.1 項）。その結果，CMC 管理戦略により，ホスレボドパ / ホスカルビドパの有効期間終了時のヒドラジンの規格値は，市販の LCIG 製剤と比較して [redacted]。[redacted]，有効期間終了時の規格は，ICH M7（R1）ガイドライン[2]に記載されている，ヒドラジンがげっ歯類に対して発がん性を示し，変異原性を有する可能性が示唆されたことに基づき設定された許容摂取量（以下「AI」）である 39 µg/日を[redacted]。

アッヴィにより実施した試験において，ヒドラジンは，ほ乳類細胞を用いた in vitro 試験及び変異原性の評価に適したモデルである Big Blue トランスジェニック C57BL/6 マウスを用いた in vivo 試験において，変異原性を示さなかった（2.6.6.8.1.2.5 項）。特定の DNA 修復経路を欠損する真核細胞がヒドラジンに対して感受性を示したことから，ヒドラジンによる DNA 損傷を認識及び修復する上で，これらの DNA 修復経路が重要であることが明らかとなった（2.6.6.8.1.2.2 項）。これら結果は，これらの DNA 修復機構を欠損した細菌に対してヒドラジンが変異原性を示した結果と一致した。これらの知見は，ヒドラジンの発がん性について，閾値に基づいた評価を支持するものであった。

アッヴィにおいて実施した試験から，経口投与と皮下投与の曝露プロファイルは類似していることが示されたため，以下に示す 2 つの手法を用いたヒドラジンのリスク評価が可能であった。リスク評価アプローチ 1 は，ICH M7（R1）ガイドライン[2]に基づくものであり，ヒドラジンは変異原性発がん物質であることから，70 年間の生涯 AI は 39 µg/日である。10 年間曝露の

AI は 273 µg/日（39 µg/日×7（生涯曝露量より少なくなることから調整））であり，曝露期間が短いほど線形的に AI は大きくなると考えられる（ICH M7（R1）ガイドライン[2]）。採用した標準的な線形外挿法により，様々な用量及び使用期間における特定の発がんリスクを算出することができ，算出した発がんリスクを以下に示す。リスク評価アプローチ 2 では，アッヴィが実施したヒドラジンの試験に基づき，ヒドラジンは非変異原性発がん物質であることから，閾値に基づく発がんリスク評価が適切であると考え評価を行った。この方法による生涯 AI は 128 µg/日であり，10 年間曝露の AI は 896 µg/日（128 µg/日×7）である（ICH M7（R1）ガイドライン[2]）。曝露期間が短いほど，線形的に AI は大きくなる。さらに，進行期パーキンソン病患者の疾患の重症度及び利用可能な治療法の選択肢が限られることは，ICH M7（R1）ガイドライン[2]でリスク評価における重要な考慮事項とされていることを認識することが重要である。総合すると，臨床的なリスク・ベネフィットは両評価方法を用いて評価することが好ましいと考えられ，この評価はホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床使用を支持するものである。

ヒドラジンのリスク・ベネフィット評価に対するアッヴィのアプローチにとって重要な要因について，以下に詳細を示す。

1) ヒドラジンのリスク・ベネフィットを考慮しケースバイケースで評価する上で，進行期パーキンソン病の特徴及び利用可能な治療法の選択肢が限られることは重要な要因である（ICH M7（R1）ガイドライン[2]，7.5 項）。

2) ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤の製造時のヒドラジン生成を抑制するためのヒドラジン管理戦略の開発及び 1 日曝露量の推定。

3) ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤のヒドラジンの規格値（[redacted] µg/日）は，LCIG と比較してヒドラジンの 1 日最大曝露量が[redacted]設定されている[1]。

4) ヒドラジンのリスク評価には，ICH M7（R1）ガイドライン[2]に記載されている変異原性発がん物質であると仮定する方法と，アッヴィが実施した試験に基づき非変異原性発がん物質であると仮定する方法の 2 つの方法がある。

5) 標準治療と比較したときのホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床的ベネフィット。

進行期パーキンソン病の特徴と現在の治療選択肢

ICH M7（R1）ガイドライン[2]（7.5 項）では，AI を決定する際にケースバイケースのアプローチを認めている。考慮される 2 つの要因として，後期発症性の慢性疾患であるかどうか，及び治療選択肢が限られているかどうかがある。

パーキンソン病は慢性進行性の神経変性疾患であり，発症時の平均年齢は 60 歳である。治療法はない。患者は自由に動くことができず，日常の作業を行うことができないため，自立性が制限され，介護者及び補助器具の必要性が高まる。情緒的及び心理的達成感にも悪影響を与える[15]。パーキンソン病と診断されてから 3–8 年後，初期のパーキンソン病「ハネムーン期」に対して当初は非常に有効であった治療に対する反応は，次第に無効になる。ホスレボドパ / ホスカルビドパが対象としている疾患の後期段階では，進行期パーキンソン病患者は運動合併症及び非運動合併症を発症し，経口薬による治療が困難となり，さらなる障害及び生活の質の低下

をきたし，社会的負担が増大する[16]。進行期パーキンソン病患者集団に LCIG を長期投与した文献に基づくと，ホスレボドパ / ホスカルビドパを投与される典型的な進行期パーキンソン病患者の投与期間は最大 10 年間であり，一部の患者では長期間投与されると予想される[17]。

疾患修飾療法はまだ開発中であるが，進行期パーキンソン病患者の対症療法の改善は患者にとって有益であることが証明されている。LD と末梢性 DOPA 脱炭酸酵素阻害剤の併用投与は，依然としてパーキンソン病の症状をコントロールするための標準治療である。しかし，ドパミン作動性ニューロンの進行性変性，LD の短い半減期，及び経口剤の予測不能な吸収により，症状及び運動合併症に対して最適なコントロールをすることはできない。徐放性 LD 含有製剤，長時間作用型ドパミン作動薬及び COMT 阻害剤など，様々な抗パーキンソン病薬及び製剤は，進行期パーキンソン病患者の症状のコントロールをわずかに改善することが認められている[18]。ドパミン作動薬の安全性及び忍容性プロファイル，並びに持続性 LD 製剤の経口投与は，進行期パーキンソン病患者におけるさまざまな疾患状態をコントロールするには不十分である。多剤併用療法は最終的に症状をコントロールできず，進行期パーキンソン病における運動合併症及び非運動合併症を予防できず，患者に残される選択肢は非常に限られ（LCIG，深部脳刺激），その選択肢は一般的に外科的介入を必要とし，それに伴うリスクが付随する。

適応症及び治療選択肢が限られているというこれらの特徴は，一日摂取許容量を定量的に調整したり，リスク計算を修正したりするために用いられるものではないが，最終的にリスク・ベネフィット評価を行う際には重要な検討事項となる。

ヒドラジン管理戦略の開発とヒドラジン曝露量の推定

ホスカルビドパは，親化合物である CD と同様に酸化的分解を受けやすく，水溶液中でヒドラジンを生成する。[redacted]

患者におけるヒドラジンの曝露量は，ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤中のヒドラジン濃度及び患者ごとに異なる漸増治療用量に依存する。ホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床における 1 日最大用量の 6000/300 mg/日に基づき，全ての患者でヒドラジン曝露量が [redacted] µg/日未満（300 mg ホスカルビドパの [redacted]%）となるように管理基準を設定した（3.2.P.5.1 項及び 3.2.P.5.6 項）。[redacted]安定性試験から推定される（3.2.P.8.1 項及び 3.2.P.5.6 項）典型的ケースのヒドラジン濃度は，[redacted] µg/日（300 mg ホスカルビドパの [redacted]%）である。全ての患者はワーストケース（[redacted] µg/日）又は典型的ケース（[redacted] µg/日）のヒドラジン曝露を受けることになる。これらの典型的ケース及びワーストケースにおける曝露に伴うリスクを表 2.6.6-6 に示す。

ほとんどの患者は，ホスレボドパ / ホスカルビドパの 1 日最大用量である 6000/300 mg/日未満の投与を受けると予想される。長期安全性試験である M15-741 試験のデータカットオフ日である 2021 年 1 月 14 日時点で，201 例中 90 パーセンタイルにあたる 181 例目におけるホスレボドパの 1 日投与量は 3763.35 mg であった。したがって，被験者の 90%では，ホスレボドパ / ホスカルビドパの 1 日投与量が 3763.35/188.17 mg 未満になると予想される。その結果，被験者の 90%におけるヒドラジン曝露量は，ワーストケース（ホスカルビドパ 188.17 mg の [redacted]%）又は典型的ケース（ホスカルビドパ 188.17 mg の [redacted]%）で考えた場合，それぞれ，[redacted] 又は [redacted] µg/日以下となる。これらのヒドラジン曝露に伴うリスクを表 2.6.6-6 に要約した。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ投与後のヒドラジンの曝露量をより明らかにするため，ホスレボドパ / ホスカルビドパを投与したパーキンソン病患者の第 I 相臨床試験（M15-738 試験）における後ろ向き研究として高感度分析法を用いて血漿中ヒドラジン濃度を測定した（定量下限［LLOQ］[redacted] ng/mL［0.00[redacted] µg/mL］）。投与前，投与後 24 及び 72 時間の血漿中ヒドラジン濃度を測定した。ホスレボドパ / ホスカルビドパの用量範囲（24 時間あたりホスレボドパ / ホスカルビドパとして 960/48–4800/240 mg）において，被験者 15 例全例の血漿中にヒドラジンは検出されなかった。投与した薬剤中のヒドラジン量のデータがないことから，この結果の解釈には限界があるものの，臨床使用時における暴露量の評価の一例となった。

ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LCIG の規格の比較

ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤のヒドラジンの規格値は，LCIG と比較してヒドラジンの 1 日最大曝露量が[redacted]（表 2.6.6-5）。ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤におけるホスレボドパ / ホスカルビドパの比（20 : 1）は，LCIG の LD/CD の比（4 : 1）より高く，ホスレボドパ / ホスカルビドパ製剤投与時のヒドラジンの総曝露量は LCIG 投与時よりもさらに減少する。ホスカルビドパ中のヒドラジンの臨床使用時の規格値は，ホスカルビドパの最大投与量である 300 mg/日の [redacted]%（[redacted] µg/日のヒドラジン）である（3.2.P.5.1 項及び 3.2.P.5.6 項）。この規格値は，[redacted]，[redacted]ヒドラジンが生成されるワーストケースの曝露量を想定している。この曝露量を LCIG のヒドラジンの最大 1 日曝露量 [redacted] µg/日と比較した。

表 2.6.6-5. ホスレボドパ / ホスカルビドパ及び LCIG 投与により予想される最大 1 日ヒドラジン曝露量の比較

Drug Product	Concentration	Route and Duration of Administration	Maximum Daily Dose	Hydrazine Shelf Life Specification	Maximum Daily Hydrazine Exposure
Duodopa	20.0 mg/mL LD / 5.0 mg/mL CD	Enteral; 16 hours/day	4000 mg LD / 1000 mg CD	[redacted] µg/g gel	[redacted] µg/day[a]
foslevodopa/ foscarbidopa	240 mg/mL foslevodopa / 12.0 mg/mL foscarbidopa	Subcutaneous; 24 hours/day	6000 mg foslevodopa / 300 mg foscarbidopa	NMT [redacted]%	[redacted] µg/day[b]

NMT = not more than

[redacted]

リスク評価アプローチ 1 及び 2 を裏付けるデータ：経口投与と皮下投与でバイオアベイラビリティが類似していることに基づく，げっ歯類にヒドラジンを経口投与したときの薬物動態データを皮下投与時の安全性評価として用いることの妥当性

C57BL/6 マウスにヒドラジンを 10 mg/kg の用量で単回静脈内，皮下又は経口投与したときの薬物動態を比較した（R&D/19/0623）。雌の C57BL/6 マウスにヒドラジンを 10 mg/kg の用量で静脈内投与したときのヒドラジンの薬物動態は，クリアランスが高く（CLp：2.85 L/h/kg），分布容積が大きく（Vss：6.1 L/kg），見かけの消失半減期は 3.2 時間であった。ヒドラジンは，10 mg/kg の用量で皮下投与及び経口投与したとき，速やかに吸収され T_{max} は 0.25 時間，最高濃度はそれぞれ 2920 及び 1786 ng/mL であった。バイオアベイラビリティの平均値は，皮下投与時で 97.0%であり，経口投与時で 72.2%であった。皮下投与後の AUC は経口投与後の 1.3 倍であった。したがって，ヒドラジンを皮下投与したときの全身曝露量は，経口投与したときと同程度であると考えられる。また，ヒドラジンをラットに皮下投与したとき，ヒドラジンは速やかに分布し，血漿中濃度及び組織中濃度は投与後 30 分以内に最高濃度に達した [19]。ヒドラジンの皮下投与経路による 1 日摂取許容量を決定する根拠としてヒドラジンの経口投与毒性試験成績（例えば，げっ歯類を用いた経口投与による 2 年間のがん原性試験成績）を用いることは妥当であると考えられた。

リスク評価アプローチ 1： ICH M7（R1）ガイドライン [2] におけるヒドラジンの AI の算出

ICH M7（R1）ガイドライン [2] によれば，IARC 1999 のデータが概説されているように，ヒドラジンは復帰突然変異試験で変異原性を示し，in vitro マウスリンフォーマ L5178Y 細胞の TK 遺伝子を標的とした試験で陽性結果を示した。In vivo では，ヒドラジンはマウス骨髄において小核を誘発したが，染色体異常は誘発しなかった。

がん原性試験データベースには，ヒドラジンのがん原性試験として，投与期間が 1 年の試験を含む吸入毒性試験 3 試験，飲水投与試験 3 試験，強制経口投与試験 1 試験の計 7 試験が収載されている。ヒドラジンのがん原性試験 7 試験のうち 5 試験は，原文の著者らにより発がん性は陽性と判定された。

経口投与試験のうち，頑健な 2 つの飲水投与試験では類似した結果 [20, 21] が得られたことから，ヒドラジンの非吸入 AI 算出には，より最近実施された高用量試験を用いた [20]。変異原性を有する発がん性物質の生涯 AI を算出する標準的な方法（TD_{50} / 50000 × 50 kg）を用いて算出した AI は 39 µg/日であった。

さらに，ICH M7（R1）ガイドライン [2] では，投与期間が一生涯（70 歳未満，又は 25500 日未満）よりも短い場合，変異原性不純物に関する AI の修正が認められている。一生涯摂取量を曝露日数で割ることが認められている。ヒドラジンでは，10 年間使用した場合の 1 日当たりの AI は，70 年間使用した場合の 7 倍，すなわち 273 µg/日となる。同様に，投与期間がさらに短い場合，許容量が上方に修正される。

ICH M7（R1）ガイドライン[2]に基づくヒドラジンの生涯 AI（10 万分の 1 のリスク）が 39 µg/日であること，及び一生涯より短い投与期間であるため線形補正が可能であることを考慮して，典型的ケース及びワーストケースのシナリオにおける発がんリスクを算出し，表 2.6.6-6 に要約する。

表 2.6.6-6. 投与期間と 1 日投与量を元に算出したヒドラジンの発がんリスク

Hydrazine daily dose (µg/day)	% of patient population[b]	Cancer risk per 100,000[a] Duration of Administration[c] 5 years	10 years	20 years
Typical (more likely scenario)[d]				
< [redacted]	90%	[redacted]	[redacted]	[redacted]
< [redacted]	100%	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Maximum (worst-case scenario)[f]				
< [redacted]	90%	[redacted]	[redacted]	[redacted]
< [redacted]	100%	[redacted]	[redacted]	[redacted]

a. Note: AI defined in FDA M7(R1)[2] of 39 ug/day for lifetime exposure relates to a 1 in 100,000 risk.

b. Percent of the patient population to receive the various doses in the two scenarios. Based on 14 January 2021 data cut from M15-741, 90% of subjects had foscarbidopa doses ≤188.17 mg. 100% of subjects would be < 300 mg.

c. The majority of patients with advanced PD are expected to receive treatment for 10 years or less, while a subset may be treated longer.

d. The typical scenario considers the more usual concentration of hydrazine in DP ([redacted]% of foscarbidopa dose) based on In-Use stability testing (Section 3.2.P.8.1 and Section 3.2.P.5.6)

e. The range of values relate to body weight of 50 kg (used in FDA M7(R1) [2]) and 60 kg (more relevant to this patient population).

f. The worst-case scenario considers if all administered DP is given with the maximum amount of hydrazine allowed by end-of-shelf life limits ([redacted]% of foscarbidopa dose).

市販製品に関する ICH M7（R1）ガイドライン[2]の 7.3.2 項では，「一部の患者集団では，市販製品の分類上の上限を超える治療期間となる場合がある（例えば，10 µg/day という AI に対し治療期間が 15 年など 10 年を超える場合）これは，10 年間治療される大部分の患者で算出した総リスクと比較して，無視できる程度の増加（先に挙げた例では，1.5/100000 への微増）と考えられる。」と記載されている。このロジックをヒドラジンに用いると，典型的なケースでは被験者の 100%，最長 20 年間の使用，ワーストケースの最長 10 年間のシナリオでは 90%以上の患者が，1/100000 を下回る，同程度，もしくは無視できる程度に上回るリスクに曝されることになる（表 2.6.6-6）。その他のすべてのシナリオ / 投与期間（全ての被験者が 10 年及び 20 年投与した場合）では，リスクはわずかに上昇し，有効期間終了時の治験薬を用いて，20 年間にわたって毎日最大用量のホスレボドパ / ホスカルビドパを投与した場合に算出されたリスクが最も高くなる（60 kg の被験者で [redacted]）。特に進行期パーキンソン病の特徴及び重症度を考慮すると，これらのシナリオにおけるリスクは許容可能と考えられる。

リスク評価アプローチ 2： ヒドラジンがほ乳類細胞において，変異原性を示さないことに基づく， ICH Q3C ガイドライン[11]に定義される許容 1 日曝露量の算出の妥当性

アッヴィでは，ヒドラジンは細菌を用いた復帰突然変異試験において復帰突然変異を誘発することを確認した（2.6.6.8.1.2.1 項）。マウスリンフォーマ試験において，現行のガイドラインの基準を用いてヒドラジンについて評価した結果，S9 存在下で陽性反応が認められた（2.6.6.8.1.2.4 項）。本試験では，誘発コロニーは主に染色体異常を伴う小コロニーの増加が顕著にみられ，大コロニーを形成する遺伝子変異ではなかった[8]。代謝能のある Muta™マウス肺由来 FE1 細胞を用いた in vitro 導入遺伝子突然変異試験において，ヒドラジンは遺伝子突然変異を誘発しなかった（2.6.6.8.1.2.3 項）。ヌクレオチド除去修復及び NHEJ を欠損した細胞はヒドラジンに対して感受性を示すことから，これらの DNA 修復経路がヒドラジンによる DNA 損傷の認識及び修復に重要であることを示した（2.6.6.8.1.2.2 項）。まとめると，細菌とほ乳類細胞を用いた突然変異試験の違いは，DNA 修復機構がヒドラジン曝露により引き起こされる変異原性を決定する重要な経路であることを示唆している。40.6 系統のトランスジェニックマウス（Muta™マウス）に毒性を示す濃度（400 mg/kg）まで単回経口投与した試験が公表されている[22]。Muta™マウスは lacZ 変異を検出するようにデザインされているが，肺，肝臓及び骨髄において用量依存的な変異は検出されなかった。本試験に用いた最高用量は，過去の試験で腫瘍を誘発した累積用量よりも高かった[22]。これらの試験結果に基づき，マウスを用いたヒドラジンの変異原性を評価する 28 日間の in vivo 試験を実施した（2.6.6.8.1.2.5 項）。本試験では，雌の Big Blue トランスジェニック C57BL/6 マウスの肝臓及び肺の cII 遺伝子座での変異頻度に対するヒドラジンの影響を検討した。Big Blue Assay は，OECD ガイドライン（OECD 488）[9]に記載されている TGR 突然変異試験である。雌マウスにヒドラジンを含む飲料水を 1.0，7.5 又は 10.9 mg/kg/日の用量で 28 日間連日，あるいは 5 mg/kg/日の用量でヒドラジンを 28 日間連日強制経口投与した。最高用量における雌マウスの曝露量は 11.45 mg/kg/日であり，雌雄ラットにおいて肝細胞腺腫及び肝細胞癌の増加がみられた曝露量（2.50–5.35 mg/kg/日）を上回った[20]。陽性対照群の雄には，1，2 及び 3 日目に，ENU を 40 mg/kg/回の用量で強制経口投与した。肺及び肝臓はマウスにおける発癌の標的組織として同定されているため[2,20, 21]，少なくとも 1 群 5 例の動物から採取した肝臓及び肺を DNA 単離及び cII 変異体の解析のために処理した。本試験の結果から，ヒドラジンを 10.9 mg/kg/日の用量まで投与しても，Big Blue マウスの肝臓及び肺に cII 変異体は誘導されなかった。予想されたとおり，陽性対照群では，検討したいずれの組織においても統計学的に有意な変異頻度の増加がみられた。In vitro 及び in vivo 試験の両方で遺伝子突然変異が認められなかったことから，ヒドラジンはほ乳類細胞に対して変異原性を示さないと結論された。ヒドラジンは in vitro 及び in vivo 試験のいずれにおいてもほ乳類細胞に対して変異原性を示さないという解釈と，上記に要約したそれを裏付けるデータが最近公表された[23]。

これらの成績は，ヒドラジンが十分な DNA 修復機能を欠く細菌において一貫して変異原性を示すが，腫瘍を生じることが知られている用量において，マウスの標的臓器である肝臓及び肺において変異を誘導しないことを示す。さらに，ヒドラジンはマウスリンフォーマ試験で陽性を示したが，コロニーの解析では DNA 損傷が突然変異か染色体異常によるものかは示されなか

った。実際，大コロニーより小コロニーの方がより多く誘導されたため，主に染色体異常が示唆された。FE1 細胞を用いた遺伝子突然変異試験では，ヒドラジンは突然変異を誘発しなかった。ヒドラジンはほ乳類細胞に対して変異原性を示さないことから，ヒドラジンには作用機序に基づく閾値があり，ICH Q3C ガイドライン [10]，ICH M7（R1）ガイドライン [2]，7.2.2 項に基づいて PDE 値を算出することができると考えられる。最も感度の高い経口投与による発がん性試験で得られた発がん性に関する無作用量（以下「NOEL」）1.28 mg/kg/日を用いると，[20] ヒドラジンの PDE 値は 128 µg/日である。

PDE 値は ICH Q3C ガイドライン [11] に従って算出した。具体的には，PDE=（NOEL×体重）/（F1×F2×F3×F4×F5）であり，ICH M7（R1）ガイドライン [2, 20] で特定された最も適切なラットを用いたがん原性試験における NOEL は 1.28 mg/kg である。

F1=5，ラットからヒトへの外挿（体表面積で補正）

F2=10，個体間のばらつきを考慮

F3=1 少なくとも半生涯の試験の場合

F4=10，重篤な毒性，すなわち非変異原性発がん性物質に対して適用される係数

F 5=1，NOEL が得られているため

したがって，生涯曝露量に対するヒドラジンの PDE 値は，（1.28 mg/kg×50 kg）/（5×10×1×10×1）＝0.128 mg，すなわち 128 µg となる。

さらに，ICH M7（R1）ガイドライン [2] では，変異原性不純物と同様の方法で，一生涯よりも短い期間の曝露に関して化合物特異的 PDE 値の変更が認められている。上述のように，進行期パーキンソン病におけるホスレボドパ / ホスカルビドパの予測使用期間に相当する 10 年間の PDE 値は，一生涯（70 年間）において算出される値よりも約 7 倍大きい。10 年間のヒドラジン曝露量の PDE 値は，128 µg×7 = 896 µg であった。同様に，投与期間が短いほど PDE 値は上方に調節される。閾値に基づく PDE 値と投与期間に関する科学的な議論は現在も継続中であるが（例：ICH M7 ガイドライン Q&A [24]），投与期間による PDE 値の調整がなくとも許容されると考えられる。典型的なケースの曝露量（表 2.6.6-6）では，すべての被験者においてヒドラジンの曝露量はこの PDE 値に合致した 150 µg/日未満である。ワーストケースの曝露量（ホスレボドパ / ホスカルビドパの最高用量の規格値で投与した場合の 1 日用量）では，この値の [redacted] 倍である。

<u>ホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床的有用性</u>

LD は，CD 等の DOPA 脱炭酸酵素阻害剤と併用することにより，依然としてパーキンソン病の運動症状をコントロールする最も有効な治療選択肢である [25]。パーキンソン病の進行に伴い治療域が狭くなるため，LD/CD 錠の経口摂取に起因する LD の薬物動態プロファイルの変動は，運動合併症（ピーク用量でのジスキネジア，delayed-on 現象，sudden-off 現象，wearing-off 現象等）の発現及び表現型に寄与し，一旦発症すると治療が困難となり，QOL に悪影響を及ぼす。したがって，LD の薬物動態，薬力学及び代謝特性を改善することは，依然として進行期パーキンソン病の治療における重大なアンメットニーズである。ホスレボドパ / ホスカルビドパの臨床的ベネフィットを 2.5 項に要約する。

ヒドラジンのリスク評価の結論

ヒドラジンのリスク評価は，ICH M7（R1）ガイドライン [2] に記載されている変異原性発がん物質であるとの仮定に基づく方法，並びにヒドラジンが非変異原性発がん物質であることを示したアッヴィの最新データに基づき，ICH M7（R1）ガイドライン [2] 及び ICH Q3C（R8）ガイドライン [11] で提案された方法に基づく方法の 2 つの方法を用いて行った。いずれの場合も，ヒドラジンの規格値（[redacted] µg/日）は，それぞれ [redacted] 及び [redacted] µg/日として設定されているヒドラジンの生涯曝露量の限度値を[redacted]。[redacted]，いずれの場合も，使用期間に基づき PDE 値を調整すると，結果として生じるリスクは，ICH M7（R1）ガイドライン [2] の目標である 10 万分の 1 リスクと実質的に変わらない。これらの解析から，特に進行期パーキンソン病患者集団，病態の特徴（遅発型，慢性）及びこれらの患者に対する治療選択肢が限られていることを考慮すると，使用期間を問わず [redacted] µg/日の規格値が裏付けられる。

2.6.6.9.4.2 安全域

ホスレボドパ / ホスカルビドパの 4 週間静脈内又は 13 週間持続皮下投与毒性試験では，ホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の血漿中濃度に一貫した性差は認められなかった。LD 及び CD の血漿中濃度は，それぞれ対応するプロドラッグであるホスレボドパ及びホスカルビドパの血漿中濃度よりも約 10 倍高かった。ラット及びサルを用いた 4 週間静脈内投与毒性試験及びイヌを用いた 13 週間持続投与毒性試験における NOAEL での曝露量比は，最大投与量である 6000/300 mg のホスレボドパ / ホスカルビドパで評価した。ホスレボドパ / ホスカルビドパは用量調節される薬剤であるため，実際の臨床使用時の曝露量はこの最大投与量よりも低く，したがって，臨床使用時の安全域は表 2.6.6-7 に示す安全域よりも大きい。曝露量は，投与経路が持続皮下投与であり，定常状態でホスレボドパ，ホスカルビドパ，LD 及び CD の血中濃度が一定となることを考慮して，C_{ss} を用いた。最大臨床用量で予想される曝露量は，ラット又はサルの NOAEL での C_{ss} を超えるとは考えにくく，被験者に対するリスクは無視できると考えられる。イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量は，ドパミン作動性刺激に対してイヌは高い感受性を示すことから最大臨床曝露量を下回ったものの，このモデルは皮下投与経路を介した局所刺激性の評価に有用であり，この新規投与経路による予期しない全身反応は認められなかった。

表 2.6.6-7. 最大臨床用量で予想されるホスレボドパ / ホスカルビドパの安全域

Species/ Route of Administration	A-1591706/ A-1610308 (mg/kg)	A-1591706 (foslevodopa)		A-1610308 (foscarbidopa)		A-21236 (LD)		A-39432 (CD)	
		C_{ss} (µg/mL)	Safety Margin for C_{ss}	C_{ss} (µg/mL)	Safety Margin for C_{ss}	C_{ss} (µg/mL)	Safety Margin for C_{ss}	C_{ss} (µg/mL)	Safety Margin for C_{ss}
Human/ SC	5990/300 [a]	0.39	--	0.019	--	5.7	--	0.68	--
4-week rat/ IV	500/125 [b]	1.65	4.23	0.352	18.5	18.9	3.32	2.7	3.97
4-week monkey/ IV	200/50 [b]	0.979	2.51	0.223	11.7	7.78	1.36	2.42	3.56
13-week dog/ SC	576/28.8 mg/day [b]	0.202	0.52	0.010	0.53	1.82	0.32	0.224	0.33

-- = not applicable; C_{ss} = concentration at steady state; IV = intravenous; NOAEL = no-observed-adverse-effect level; SC = subcutaneous

a. Dose expressed in mg/day; plasma exposure to foslevodopa, foscarbidopa, LD, and CD are based on the final database from M15-738 using a linear model with all steady state values for foslevodopa, foscarbidopa, LD, and CD, LDP.

b. Dose represents NOAEL.

結論として，ホスレボドパ / ホスカルビドパの非臨床毒性試験成績，並びに LD/CD の臨床及び非臨床試験成績から，皮下投与されたホスレボドパ / ホスカルビドパの安全性プロファイルは，経口投与又は経腸投与された LD/CD の安全性プロファイルと類似していることが示唆され，予定臨床最高用量の 6000/300 mg/日までのホスレボドパ / ホスカルビドパの持続皮下投与の安全性を支持する結果であった。

2.6.6.10 図表

本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

1. デュオドーパ配合経腸用液申請資料概要：2.6.6 毒性試験の概要文 (R&D/15/0752)
2. ICH M7 (R1)「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて
3. ICH Q3A(R2) 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン
4. ICH Q3B (R2) 新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン

5. Study RD210290 ABBV-951 Co-formulated Tox formulations Lot 2593081 (Unspiked) lot 2593082 (Spiked) forOsmolality Testing.
6. White PA, Douglas GR, Gingerich J, et al. Development and Characterization of a Stable Epithelial Cell Line from Muta Mouse Lung. Environ Mol Mutagen. 2003;42(3):166-84.
7. Applegate ML, Moore MM, Broder CB, et al. Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(1):51-5.
8. Moore MM, Clive D, Hozier JC, et al. Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1985;151(1):161-74.
9. OECD. OECD 488: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2013.
10. [redacted]
11. ICH Q3C (R8) 医薬品の残留溶媒ガイドライン
12. 評価書 食品中に含まれる放射性物質 食品安全委員会 2011 年 10 月
13. ICH Q3D (R1) 医薬品の元素不純物ガイドライン
14. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD, editors. Washington, DC: The National Academies Press; https://doi.org/10.17226/11537; 2006 1344 p.
15. Scheife RT, Schumock GT, Burstein A, et al. Impact of Parkinson's Disease and its Pharmacologic Treatment on Quality of Life and Economic Outcomes. Am J Health Syst Pharm. 2000;57(10):953-62.
16. Luquin M-R, Kulisevsky J, Martinez-Martin P, et al. Consensus on the Definition of Advanced Parkinson's Disease: A Neurologists-Based Delphi Study (CEPA Study). Parkinson's Disease. 2017;2017(4047392):1-8.
17. Nyholm D, Klangemo K, Johansson A. Levodopa/carbidopa Intestinal Gel Infusion Long-Term Therapy in Advanced Parkinson's Disease. Eur J Neurol. 2012;19(8):1079-85.
18. Müller T, Möhr J-D. Long-Term Management of Parkinson's Disease Using Levodopa Combinations. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2018;19(9):1003-11.
19. Kaneo Y, Iguchi S, Kubo H, et al. Tissue Distribution of Hydrazine and Its Metabolites in Rats. Journal of Pharmacobio-Dynamics. 1984;7(8):556-62.

20. Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, et al. Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Hydrazine Monohydrate in Rats and Mice by Two-Year Drinking Water Treatment. Regul Toxicol Pharmacol. 2016;76:63-73.

21. Steinhoff D, Mohr U. The Question of Carcinogenic Effects of Hydrazine. Exp Pathol. 1988;33(3):133-43.

22. Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM. Evidence for In Vivo Non-Mutagenicity of the Carcinogen Hydrazine Sulfate in Target Tissues of lacZ Transgenic Mice. Carcinogenesis. 1995;16(4):801-4.

23. Nicolette J, Murray J, Sonders P, et al. In Vitro and In Vivo Mammalian Mutation Assays Support a Nonmutagenic Mechanism of Carcinogenicity for Hydrazine. Environ Mol Mutagen. 2021;62(1):4-17.

24. ICH M7 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン質疑応答集（Q&A）

25. Nutt JG. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Levodopa. Mov Disord. 2008;23 Suppl 3:S580-4.

2.6.7 毒性試験概要表

目次

2.6.7 毒性試験概要表 1
2.6.7.1 Toxicology - Overview 3
2.6.7.2 Toxicokinetics - Overview of Toxicokinetics Studies 6
2.6.7.3 Toxicokinetics - Overview of Toxicokinetics Data 7
2.6.7.4 Toxicology - Drug Substance 8
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity 12
2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies 13
2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity 15
2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate: A 4-Week Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (R&D/15/1302) 15
2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate: A 4-Week Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (R&D/15/1293) 22
2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: ABBV-951: A 13-Week Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate Followed by a 4-Week Recovery Period in Beagle Dogs (R&D/18/0060) 30
2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro 41
2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Salmonella-Escherichia coli / Mammalian-Microsome Reverse Mutation Assay with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0076) 41
2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0077) 49
2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0698) 55
2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo 61
2.6.7.9.1 Genotoxicity: In Vivo - Report Title: An In Vivo Micronucleus Assay of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate by Continuous Intravenous Infusion in Sprague Dawley Rats (R&D/19/0121) 61

2.6.7.10 Carcinogenicity....63
2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity - Nonpivotal Studies....63
2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development....63
2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryo-Fetal Development....63
2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre and Postnatal Development, Including Maternal Function....63
2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals....63
2.6.7.16 Local Tolerance....64
2.6.7.16.1 Local Tolerance – Nonpivotal Studies....64
2.6.7.16.2 Local Tolerance - Report Title: Two to Five Day Continuous Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form and A-1610308 Trihydrate (Monophosphate Prodrugs of Levodopa and Carbidopa) in Beagle Dogs (R&D/16/0212)....66
2.6.7.16.3 Local Tolerance - Report Title: ABBV-951: A 28-Day Continuous Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate in Beagle Dogs (R&D/17/0113)....69
2.6.7.17 Other Toxicity Studies....75
2.6.7.17.1 Other Toxicity Studies – Antigenicity....75
2.6.7.17.2 Other Toxicity Studies – Immunotoxicity....75
2.6.7.17.3 Other Toxicity Studies - Mechanistic Studies....75
2.6.7.17.4 Other Toxicity Studies – Dependence....75
2.6.7.17.5 Other Toxicity Studies – Metabolites....75
2.6.7.17.6 Other Toxicity Studies – Impurities....76
2.6.7.17.6.1 Other Toxicity – Impurities - Report Title: A GLP 13-Week Study of A-1591706 Free Form, A-1610308 Trihydrate, and Associated Impurities (co-formulated) by Subcutaneous Infusion in Beagle Dogs (R&D/19/1129)....76
2.6.7.17.6.2 Other Toxicity Studies – Impurities – Hydrazine Monohydrate....82
2.6.7.17.6.3 Other Toxicity Studies – Impurities – Bacterial Mutation Assays for Potential Impurities....83
2.6.7.17.7 Other Toxicity Studies - Other....84
2.6.7.17.7.1 Other Toxicity Studies – Other – Report Title: Compatibility/ Stability of A-1591706 Free Form and A-1610308 Trihydrate in Water pH 7.4 with Material Used for Subcutaneous Infusion in Beagle Dogs (R&D/16/1419)....84

2.6.7.1 Toxicology - Overview

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Single-Dose Toxicity	-	-	-	-	-	-	-
Repeat-Dose Toxicity	Rat Sprague Dawley	Intravenous (Continuous infusion)	2 weeks	0/0, 100/25, 250/62.5, 500/125	No	[redacted]	R&D/15/1291 (4.2.3.2-1)
	Rat Sprague Dawley	Intravenous (infusion)	4 weeks	0/0, 100/25, 250/62.5, 500/125	Yes	[redacted]	R&D/15/1302 (4.2.3.2-2)
	Male Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	5 days	0/0, 50/12.5, 100/25, 200/50	No	[redacted]	R&D/15/1363 (4.2.3.2-3)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	2 weeks	0/0, 50/12.5, 100/25, 200/50	No	[redacted]	R&D/15/1292 (4.2.3.2-4)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	4 weeks	0/0, 100/25, 200/50, 300/75	Yes	[redacted]	R&D/15/1293 (4.2.3.2-5)
	Monkey Cynomolgus	Intravenous (infusion)	2 weeks	**A-21236/A-39432**: 0/0, 100/25, 200/50, 300/75	No	[redacted]	R&D/16/0490 (4.2.3.2-6)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	13 weeks or cycles of 7 days followed by 7-day washout for 13 weeks	0/0, 576/28.8 mg/day	Yes	[redacted]	R&D/18/0060 (4.2.3.2-7)

2.6.7.1 Toxicology - Overview (Cont.)

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing (Continuous)	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Genotoxicity	Salmonella typhimurium and E. coli	In vitro ±S9	Not applicable	**A-1591706**: 1.60 to 5000 µg/plate **A-1610308**: 1.60 to 5000 µg/plate	Yes	[redacted]	R&D/16/0076 (4.2.3.3.1-1)
	Human peripheral blood lymphocytes	In vitro -S9	24 hours	**A-1591706**: 194 to 238 µg/mL **A-1610308**: 10.6 to 18.8 µg/mL	Yes	[redacted]	R&D/16/0077 (4.2.3.3.1-2)
		In vitro ±S9	3 hours (with 21-hour recovery)	**A-1591706**: 141 to 250 µg/mL **A-1610308**: 141 to 250 µg/mL			
	Human peripheral blood lymphocytes	In vitro -S9	24 hours	**A-1591706**: 21.0 to 280 µg/mL **A-1610308**: 9.82 to 31.0 µg/mL	Yes	[redacted]	R&D/16/0698 (4.2.3.3.1-3)
		In vitro ±S9	3 hours (with 21-hour recovery)	**A-1591706**: 250 to 280 µg/mL **A-1610308**: 270 to 310 µg/mL			
	Rat, Male Sprague Dawley	Intravenous (infusion)	2 days	Phase A (including bioanalytical) and Phase B: 0/0, 125/31.25, 250/62.5, 500/125	Yes	[redacted]	R&D/19/0121 (4.2.3.3.2-1)
Carcinogenicity	-	-	-	-	-		-
Reproductive and Developmental Toxicity	-	-	-	-	-		-
Local Tolerance	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 days	200/50 mg/mL	No	AbbVie	R&D/16/0051 (4.2.3.6-1)

2.6.7.1 Toxicology - Overview (Cont.)

Type of Study	Species and Strain	Route (Method) of Administration	Duration of Dosing (Continuous)	Foslevodopa/Foscarbidopa [a] Doses (mg/kg/day [a])	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
Local Tolerance	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 to 5 days	0/0, 2400/600 mg/day	Yes	AbbVie	R&D/16/0212 (4.2.3.6-2)
	Dog, Male Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 weeks	480/120, 1200/300 mg/day	No	AbbVie	R&D/16/0886 (4.2.3.6-3)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	2 weeks	0/0, 480/120, 1200/300 mg/day	No	[redacted]	R&D/16/1374 (4.2.3.6-4)
	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	4 weeks	0/0, 480/120,1200/300 mg/day	Yes	[redacted]	R&D/17/0113 (4.2.3.6-5)
Other Toxicity Studies							
Impurity Qualification	Dog Beagle	Subcutaneous (infusion)	13 weeks	0, 50/2.5, 50/2.5 + impurities	Yes	[redacted]	R&D/19/1129 (4.2.3.7.6-1)
Compatibility/ Stability	Not applicable	Mock Subcutaneous (infusion)	24 hours	0/0, 200/50 mg/mL at various infusion rates	No	[redacted]	R&D/16/1419 (4.2.3.7.7-2)

- No studies conducted; GLP = Good Laboratory Practice; S9 = metabolic activation

a. Unless otherwise specified **foslevodopa/foscarbidopa** was administered in units of mg/kg/day. For Repeat-Dose Toxicity LD/CD prodrug studies, the highest No-observed-adverse-effect level (NOAEL) for studies ≥ 7 days in duration is underlined.

2.6.7.2 Toxicokinetics - Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Test System	Route (Method) of Administration	Foslevodopa[a]/Foscarbidopa Doses (mg/kg)	GLP Compliant	Report Number
4-week	Rat	Intravenous (infusion)	100/25	Yes	R&D/15/1302 (4.2.3.2-2)
4-week	Monkey	Intravenous (infusion)	100/25	Yes	R&D/15/1293 (4.2.3.2-5)
4-week	Monkey	Intravenous (infusion)	200/50	Yes	R&D/15/1293 (4.2.3.2-5)
4-week	Rat	Intravenous (infusion)	250/62.5	Yes	R&D/15/1302 (4.2.3.2-2)
4-week	Monkey	Intravenous (infusion)	300/75	Yes	R&D/15/1293 (4.2.3.2-5)
4-week	Rat	Intravenous (infusion)	500/125	Yes	R&D/15/1302 (4.2.3.2-2)
13-week	Dog	Subcutaneous (infusion)	576 [b] /28.8	Yes	R&D/18/0060 (4.2.3.2-7)

a. Foslevodopa = A-1591706 = LDP4'; Foscarbidopa = A-1610308 = CDP4'
b. Foslevodopa/Foscarbidopa doses are in mg/day, based on a concentration of 240/12 mg/mL infused at a rate of 0.1 mL/hour continuously for 24 hours.

2.6.7.3 Toxicokinetics - Overview of Toxicokinetics Data

LDP4'/CDP4' Daily Dose (mg/kg)	Mean Steady-State Concentration C_{ss} (µg/mL)													
	A-1591706 (LDP4') Concentrations							A-21236 (LD) Concentrations						
	Rats		Monkeys		Dogs			Rats		Monkeys		Dogs		
	M	F	M	F	M	F	Humans	M	F	M	F	M	F	Humans
80/4							0.282[d]							4.46[d]
100/25	0.314 [a]	0.243 [a]	0.42 [b]	0.43 [b]				2.63 [a]	1.58 [a]	2.86 [b]	2.95 [b]			
200/50			1.05 [b]	0.907 [b]						7.46 [b]	8.10 [b]			
250/62.5	0.506 [a]	0.551 [a]						8.05 [a]	5.93 [a]					
300/75			1.66 [b]	1.47 [b]						13.5 [b]	13.9 [b]			
500/125	1.53 [a]	1.77 [a]						21.7 [a]	16.0 [a]					
576 [c]/28.8					0.216 [c]	0.189 [c]						1.58 [c]	2.07 [c]	
LDP4'/CDP4' Daily Dose (mg/kg)	A-1610308 (CDP4') Concentrations							A-39432 (CD) Concentrations						
	Rats		Monkeys		Dogs			Rats		Monkeys		Dogs		
	M	F	M	F	M	F	Humans	M	F	M	F	M	F	Humans
80/4							0.0136[d]							0.502[d]
100/25	0.0821 [a]	0.0387 [a]	0.0921 [b]	0.0865 [b]				0.521 [a]	0.413 [a]	1.07 [b]	1.31 [b]			
200/50			0.242 [b]	0.205 [b]						2.39 [b]	2.46 [b]			
250/62.5	0.109 [a]	0.114 [a]						1.07 [a]	1.16 [a]					
300/75			0.402 [b]	0.354 [b]						4.11 [b]	4.12 [b]			
500/125	0.342 [a]	0.361 [a]						2.64 [a]	2.76 [a]					
576 [c]/28.8					0.0105 [c]	0.00982 [c]						0.199 [c]	0.249 [c]	

F = Females; Foslevodopa = A-1591706 = LDP4'; Foscarbidopa = A-1610308 = CDP4'; M = Males;

a. R&D/15/1302: 4-week study TA15-212, intravenous administration
b. R&D/15/1293: 4-week study TC15-213, intravenous administration
c. R&D/18/0060: 13-week study TB17-097; A-1591706/A-1610308 doses are in mg/day.
d. M15-738 (Group 8): 200/10 mg loading + 4800/240 mg/24 hr for 72 hr (mg/kg dose estimated using 60 kg as the average human weight)

2.6.7.4 Toxicology - Drug Substance

		Foslevodopa (A-1591706) Impurities (% w/w)[b]													
	Assay (%)[a]	[redacted]	[redacted]	(不純物A＊)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Proposed Acceptance Criteria:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Batch Number													**GLP**	**Report Number**	**Type of Study**
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/16/0076	Ames assay
													Yes	R&D/16/0077	Chromab in HPBL
													Yes	R&D/15/1302	4-week rat
													No	R&D/16/0051	2-day dog
													Yes	R&D/16/0212	2 to 5-day dog
													No	R&D/16/1374	2-week dog
													Yes	R&D/17/0113	4-week dog
													Yes	R&D/15/1293	4-week monkey
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/17/0113	4-week dog
													Yes	R&D/16/0698	Chromab in HPBL
													No	R&D/16/0886	2-week dog
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/19/0121	Micronucleus assay rat

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 Toxicology Drug Substance (Cont.)

	Assay (%)[a]	Foslevodopa (A-1591706) Impurities (% w/w)[b]										GLP	Report Number	Type of Study
		[redacted]	[redacted]	(不純物A＊)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Proposed Acceptance Criteria:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Batch Number														
[redacted]												No	R&D/15/1291	2-week rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	No	R&D15/1363	5-day monkey
												No	R&D/15/1292	2-week monkey
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/18/0060	13-week dog
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/19/1129	

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 Toxicology - Drug Substance (Cont.)

		Foscarbidopa (A-1610308) Impurities (% w/w) [b]								
	Assay (%) [a]	[redacted] (不純物B＊)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	GLP	Report Number	Type of Study
Proposed Acceptance Criteria:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Batch Number										
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/16/0076	Ames assay
								Yes	R&D/16/0077	Chromab in HPBL
								Yes	R&D/15/1302	4-week rat
								No	R&D/16/0051	2-day dog
								Yes	R&D/16/0212	2 to 5-day dog
								No	R&D/16/1374	2-week dog
								Yes	R&D/15/1293	4-week monkey
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/16/0698	Chromab in HPBL
								No	R&D/16/0886	2-week dog
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/17/0113	4-week dog
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/19/0121	Micronucleus assay rat

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 Toxicology - Drug Substance (Cont.)

		Foscarbidopa (A-1610308) Impurities (% w/w) [b]									
	Assay (%)[a]	[redacted] (不純物B＊)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Proposed Acceptance Criteria:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Batch Number									**GLP**	**Report Number**	**Type of Study**
[redacted]									No	R&D/15/1291	2-Week rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	No	R&D15/1363	5-Day monkey
									No	R&D/15/1292	2-Week Monkey
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/18/0060	13-week dog
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Yes	R&D/19/1129	13-week dog

Ames assay = bacterial reverse mutation assay; Chromab = chromosomal aberrations assay; GLP = Good Laboratory Practice; HPBL = human peripheral blood lymphocytes; ND = not detected, NR = not reported; NT = not tested; RRT = relative retention time

a. Anhydrous basis.

b. Proposed acceptance criteria and GLP batch unspecified impurities can be found in Module 3 (Section S.4.4 Batch Analyses)

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

No studies were conducted. Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies

Species and Strain	Route (Method) of Administration (Vehicle/Formulation) Dose Volume	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa[a] Doses (mg/kg/day)	Sex and Number per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Report Number
Rat, Sprague-Dawley	24-hour Continuous intravenous (Infusion) (0.9% Sodium Chloride for injection, pH 7.4) 28.8 mL/kg/day	14 days	0, 100/25, 250/62.5, 500/125	Males 6 Females 6	500/125	**250/62.5 (F) and 500/125 (M, F)** ↓ Body weight, body weight gain and food consumption; ↓ reticulocytes and mean corpuscular volume. **250/62.5 (M, F) and 500/125 (M, F)** hypersensitivity to touch, vocalization, ↓ red cell mass **500/125 mg/kg/day:** ↑ activity, head twitching (noted once), ↓ sodium (M); ↑ phosphorus (M), ↓ thymus weight and size (1 M), ↓ cortical lymphocytes in thymus	R&D/15/1291
Monkey Cynomolgus	24-hour Continuous intravenous (Infusion) (0.9% Sodium Chloride for injection, pH 7.4) 12 mL/kg/day	5 days	0, 50/12.5, 100/25, 200/50	Males 2	NA	**≥100/25 mg/kg**: ↓ activity, hunched posture, ↑ activity, stereotypic behavior, ↑ heart rate, and transient ↓ body weight through study Day 3 that were not considered adverse.	R&D/15/1363

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (Cont.)

Species and Strain	Route (Method) of Administration (Vehicle/Formulation) Dose Volume	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa[a] Doses (mg/kg/day)	Sex and Number per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Report Number
Monkey Cynomolgus	24-hr Continuous intravenous (Infusion) (0.9% Sodium Chloride for injection, pH 7.4) 12 mL/kg/day	14 days	0, 50/12.5, 100/25, 200/50	Males 2 Females 2	200/50	**≥ 100/25 mg/kg/day:** Transient ↓ body weight ↑ activity, stereotypic behavior, sporadic inappetence, watery feces ↑ bicarbonate, ↓ phosphorus	R&D/15/1292
Monkey Cynomolgus	Continuous intravenous (Infusion) (Phosphate Buffered Saline, pH 5.0) 93.75 mL/kg/day	14 days	**A-21236/ A-39432:** 0, 100/25, 200/50, 300/75	Males Group 1 - 4: 2 Females Group 1: 1 Groups 2 - 4: 2	NA	**300/75 mg/kg/day:** Dose administration was terminated on Day 2 due to adverse clinical findings, including ataxia, ↓ and/or ↑ activity, hunched posture, and stereotypies. **200/50 mg/kg/day:** Inappetence; Adverse clinical findings in 1M and 1F (ataxia, ↓ and/or ↑ activity, hunched posture, and stereotypies); dose administration was terminated on Day 2 and 8, respectively. The remaining 2 animals exhibited similar CNS-related clinical findings with less severity.	R&D/16/0490

↓ = decreased; ↑ = increased; CNS= central nervous system; F = female; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no-observed-adverse-effect level

a. Unless otherwise specified.

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity

2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate: A 4-Week Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Sprague Dawley Rats (R&D/15/1302)

Lot Numbers: FT00109149/1000109143 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Rat/Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Report Number:**	R&D/15/1302
Age at Dose Initiation:	Approximately 10 weeks	**Duration of Postdose:**	Not applicable	**AbbVie Study Number:**	TA15-212
Date of First Dose:	16 December 2015	**Route (Method) of Administration:**	24-hr Continuous intravenous (Infusion)	**MPI Study Number:**	2100-167
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection (Saline), USP, pH 7.4; Dose volume = 28.8 mL/kg/day			**GLP Compliant:**	Yes
Special Features:	Urine Chemistry				
No-Observed-Adverse-Effect Level:	500/125 mg/kg/day				

2.6.7.7.1 Repeat Dose Toxicity Report R&D/15/1302 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Dose Level (mg/kg/day)	**100/25**		**250/62.5**		**500/125**	
Sex	**Males**	**Females**	**Males**	**Females**	**Males**	**Females**
Number of Animals	**20**		**20**		**20**	
Toxicokinetics (Mean ± SD**):**	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
A-1591706 (LDP4')						
C_{ss} (µg/mL)	0.278 ± 0.305		0.528 ± 0.331		1.65 ± 1.13	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	237 ± 269		339 ± 189		1140 ± 911	
A-21236 (LD)						
C_{ss} (µg/mL)	2.11 ± 0.669		6.99 ± 1.47		18.9 ± 3.92	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	1350 ± 430		4450 ± 886		12000 ± 2580	
A-1610308 (CDP4')						
C_{ss} (µg/mL)	0.0759 ± 0.0740		0.112 ± 0.0716		0.352 ± 0.218	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	60.1 ± 60.6		70.0 ± 44.0		239 ± 180	
A-39432 (CD)						
C_{ss} (µg/mL)	0.467 ± 0.134		1.12 ± 0.196		2.70 ± 0.538	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	303 ± 82.9		729 ± 145		1760 ± 375	

2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1302 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Mortality	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Clinical Observations – Detailed Scheduled and Unscheduled Cageside Observations (Number Observed/Total Number of Animals)								
Activity increased	0/0	1/1	2/1	9/4	0/0	0/0	4/2	3/3
Behavior aggressive	1/1	0/0	2/1	16/10	0/0	0/0	1/1	0/0
Vocalization	4/1	5/2	6/3	20/8	0/0	1/1	9/5	4/3
Hypersensitivity to touch	5/2	7/2	12/5	57/10	0/0	0/0	5/3	7/6
Hypersensitivity to sound	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	1/1
Stereotypy	0/0	0/0	0/0	8/6	0/0	0/0	0/0	1/1
Activity decreased	0/0	2/1	2/2	4/3	0/0	1/1	4/1	0/0
Red material around nose	7/4	2/1	2/1	22/9	0/0	4/2	14/6	4/3
Hunched appearance	0/0	6/4	2/2	35/8	0/0	0/0	0/0	0/0
Unkempt appearance	0/0	0/0	3/2	34/7	0/0	0/0	0/0	0/0
Thin appearance	0/0	0/0	0/0	4/1	0/0	0/0	0/0	1/1
Body Weight [a](%)	427.4 g	-4	-5	-14**	264.8 g	-3	-4	-14**

2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1302 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Food Consumption [a] (%)	31.37 g/animal/day	-5	+7	-3	22.39 g/animal/day	-5	-6	+22
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Means)								
Hemoglobin (g/dL)	14.50	14.18	13.11**	13.30**	13.94	13.92	13.13	13.01
Hematocrit (%)	47.54	46.87	43.51**	44.57	45.35	44.97	43.00	42.41
Mean Corpuscular Volume (fL)	62.70	61.79	59.79*	60.20*	62.98	65.59	62.88	60.50
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	19.14	18.70	18.01*	17.99**	19.39	20.30	19.25	18.57
Absolute Reticulocytes ($10^3/\mu L$)	301.39	305.39	279.28	269.14	280.68	234.19	291.05	209.00*
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (Means)								
Sodium (mEq/L)	145.2	143.6	143.9	141.8**	140.9	140.7	140.0	139.1
Potassium (mEq/L)	8.05	9.16	8.55	10.47**	10.14	10.06	9.64	11.07
Phosphorus (mg/dL)	10.38	10.90	10.75	12.00**	10.87	10.68	10.31	10.97
Urea Nitrogen (mg/dL)	15.9	17.1	17.4	19.1**	18.0	17.9	17.0	20.2

2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1302 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Urinalysis (Means)								
Volume (mL)	5.20	6.30	6.45	9.80	1.79	1.51	5.00*	4.25*

2.6.7.7.1 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1302 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**	**0/0**	**100/25**	**250/62.5**	**500/125**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Urine Chemistry (Means)								
Phosphorus creatinine ratio	1.71	1.69	1.19	1.05**	1.95	2.13	1.32	0.96**
Fractional excretion phosphorus	5.076	4.595	3.303*	2.360**	7.163	6.664	4.422*	2.887**
Organ Weights [a] (%)								
Thymus/BWt	0.0883%	+4	-29**	-34**	0.1416%	-13	-1	-32
Thymus	0.340 g	+3	-28*	-43**	0.341 g	-16	-3	-40*
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (Number Observed)								
Thymus								
depletion, lymphoid, generalized								
minimal	0	0	2	3	3	0	0	6

2.6.7.7.1 Repeat Dose Toxicity Report R&D/15/1302 (Cont.)

GLOSSARY and ENDNOTES	
Abbreviation	**Definition**
A-21236 (LD)	Levodopa
A-39432 (CD)	Carbidopa
A-1591706 (LDP4')	Foslevodopa
A-1610308 (CDP4')	Foscarbidopa
AUC	Area under the concentration-time curve
BWt	Body weight
C_{ss}	Concentration at steady state
-	No noteworthy findings
*	$p < 0.05$
**	$p < 0.01$

a. At the end of the dosing 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. All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate: A 4-Week Continuous Intravenous Infusion Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (R&D/15/1293)

Lot Numbers: FT00109149/1000109143 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Report Number:**	R&D/15/1293
Age at Dose Initiation:	Approximately 3-4 years	**Duration of Postdose:**	Not applicable	**AbbVie Study Number:**	TC15-213
Date of First Dose:	17 December 2015	**Route (Method) of Administration:**	Continuous intravenous (infusion)	**MPI Study Number:**	2100-168
Vehicle/Formulation:	0.9% Sodium Chloride for Injection (Saline), USP, pH 7.4; Dose volume = 12 mL/kg/day			**GLP Compliant:**	Yes
Special Features:	None				
No-Observed-Adverse-Effect Level:	200/50 mg/kg/day				

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Dose Level (mg/kg/day)	**100/25**		**200/50**		**300/75**	
Sex	**Males**	**Females**	**Males**	**Females**	**Males**	**Females**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Toxicokinetics (Mean ± SD**):**	**Combined Sexes**		**Combined Sexes**		**Combined Sexes**	
A-1591706 (LDP4')						
C_{ss} (µg/mL)	0.425 ± 0.132		0.979 ± 0.204		1.58 ± 0.382	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	279 ± 92.4		686 ± 115		980 ± 248	
A-21236 (LD)						
C_{ss} (µg/mL)	2.90 ± 0.376		7.78 ± 0.893		13.7 ± 1.87	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	1860 ± 296		5170 ± 593		8670 ± 1260	
A-1610308 (CDP4')						
C_{ss} (µg/mL)	0.0889 ± 0.0317		0.223 ± 0.0529		0.382 ± 0.111	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	60.0 ± 21.8		158 ± 30.6		234 ± 69.5	
A-39432 [a] (CD)						
C_{ss} (µg/mL)	1.19 ± 0.216		2.42 ± 0.290		4.11 ± 0.694	
$AUC_{24\text{-}672h}$ (µg•hr/mL)	738 ± 72.8		1670 ± 139		2610 ± 478	

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:								
Mortality	0	0	0	0	0	0	0	1 [b]
Detailed Clinical Observations (Number Observed/Total Number of Animals)								
Material in pan/bedding, Brown	0/0	18/4	50/4	54/4	0/0	10/3	52/4	70/4
Stereotypy	2/1	1/1	4/1	129/4	0/0	0/0	8/1	47/4
Behavior aggressive	0/0	0/0	8/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Posture hunched	0/0	0/0	9/2	36/3	0/0	5/1	2/1	18/4
Activity decreased	0/0	0/0	4/2	8/3	0/0	0/0	0/0	7/3
Ataxia	0/0	0/0	0/0	6/2	0/0	0/0	0/0	1/1
Activity increased	1/1	0/0	25/4	67/4	0/0	0/0	9/2	36/4
Body Weight [c] (%)	3.238 kg	-2	-3	-10	3.350 kg	-8	-6	-15
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:								
Hematology (Mean)								
Erythrocytes (10^6/µL)								
Pretest 1	5.775	5.710	5.895	5.755	5.565	5.565	5.528	5.698
Pretest 2	5.568	5.460	5.700	5.168*	5.295	5.233	5.038	5.475
Terminal	5.323	5.358	5.610	4.800*	5.293	4.795	4.968	4.950
Hemoglobin (g/dL)								
Pretest 1	13.00	13.08	13.38	13.05	12.98	12.88	13.18	13.00
Pretest 2	12.90	12.73	13.18	12.13	12.58	12.40	12.45	12.65
Terminal	12.10	12.23	12.65	10.98*	12.83	11.25	12.25	10.90
Hematocrit (%)								
Pretest 1	41.88	42.05	44.75	44.08	42.95	43.98	44.60	43.23
Pretest 2	40.73	41.30	42.50	39.85	40.98	42.08	40.38	41.95
Terminal	40.08	41.00	42.85	38.58	40.55	37.83	39.75	36.80

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:								
Coagulation (Mean)								
Fibrinogen (mg/dL)								
Pretest 1	245.5	254.3	269.3	264.8	245.5	266.5	237.3	280.0
Pretest 2	299.3	290.8	289.5	288.5	261.5	279.3	246.0	277.8
Terminal	238.5	270.3	334.0	316.3	253.5	332.8	314.5	379.3
Clinical Chemistry (Mean)								
Sodium (mEq/L)								
Pretest 1	148.8	147.3	149.5	149.3	148.5	148.0	151.3	146.8
Pretest 2	146.0	148.5	145.3	147.3	147.0	148.0	146.5	147.8
Terminal	146.8	145.3	144.8	143.0	146.5	146.5	145.5	143.3
Phosphorus (mg/dL)								
Pretest 1	4.95	6.78*	6.08	5.60	4.38	5.43	4.88	5.75
Pretest 2	6.05	7.33**	6.18	6.18	5.43	5.95	5.98	6.85
Terminal	5.50	5.43	5.25	4.58	5.13	6.03	4.80	4.37

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:								
Clinical Chemistry (Mean) (Cont.)								
Albumin (g/dL)								
Pretest 1	4.38	4.30	4.40	4.48	4.43	3.95	4.55	4.00
Pretest 2	4.08	4.15	4.20	4.00	4.20	3.93	4.18	3.78
Terminal	3.95	3.85	3.98	3.70	4.15	3.33	3.63	3.10
Globulin (g/dL)								
Pretest 1	3.08	2.88	2.85	3.08	3.35	3.35	3.15	3.30
Pretest 2	3.43	3.30	3.05*	3.28	3.50	3.55	3.33	3.88
Terminal	3.35	3.63	3.30	3.83	2.95	3.90	3.30	4.47
Cholesterol (mg/dL)								
Pretest 1	135.5	154.5	136.5	150.3	110.3	119.0	115.5	140.3
Pretest 2	144.0	155.3	148.8	132.5	114.8	118.3	115.8	157.3
Terminal	117.0	113.3	95.0	87.8	104.0	108.0	119.8	81.3
Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa							
Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**	**0/0**	**100/25**	**200/50**	**300/75**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:								
Organ Weights [c] (%)								
Thymus/BWt	0.1040%	-5	+17	-80	0.0668%	-26	-41	-50
Thymus	3.305 g	-3	+13	-83	2.150 g	-31	-44	-57
Gross Pathology (Number Observed)								
Number Examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Thymus								
Small								
Severe	0	0	0	1	0	0	0	1
Histopathology (Number Observed)								
Number Examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Thymus								
decreased lymphocytes, generalized								
minimal	0	1	0	0	0	0	1	0
mild	0	0	2	0	0	1	1	0
moderate	0	0	0	3	0	0	1	2
severe	0	0	0	0	0	0	0	1

2.6.7.7.2 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/15/1293 (Cont.)

GLOSSARY and ENDNOTES

Abbreviation	Definition
A-21236 (LD)	Levodopa
A-39432 (CD)	Carbidopa
A-1591706 (LDP4')	Foslevodopa
A-1610308 (CDP4')	Foscarbidopa
AUC	Area under the concentration-time curve
BWt	Body weight
C_{ss}	Concentration at steady state
-	No noteworthy findings
*	$p < 0.05$
**	$p < 0.01$

a. Due to A-39432 limited stability at -20°C storage, the overall toxicokinetic exposure for A-39432 may be underestimated at most by 26%.

b. One female at 300/75 mg/kg/day (Animal 4501) was euthanized on Day 19

c. 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. All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report Title: ABBV-951: A 13-Week Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate Followed by a 4-Week Recovery Period in Beagle Dogs (R&D/18/0060)

Lot Numbers: 2391981/2392773 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	13 weeks subcutaneous infusion or cycles of 7 days of subcutaneous infusion followed by 7-day washout alternating for 13 weeks	**Report Number:**	R&D/18/0060
Initial Age:	9 to 10 months	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**AbbVie Study Number:**	TB17-097
Date of First Dose:	04 January 2018	**Route (Method) of Administration:**	Continuous subcutaneous (infusion)	[redacted] **Study Number:**	1017-2012
Vehicle/Formulation:	Bacteriostatic Water for Injection, USP (0.9% benzyl alcohol), pH 7.4; Dose volume = 2.4 mL/day			**GLP Compliant:**	Yes

Special Features: Assessment of local tolerability and repeat- dose toxicity

No-Observed-Adverse-Effect Level: 576/28.8 mg/day

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa			
Number of Animals/Sex	**6**	**6**	**6**	**6**
Dose Level (mg/day)	**Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks 576/28.8 (Group 2)**		**Continuous Infusion for 13 Weeks 576/28.8 (Group 3)**	
Toxicokinetics (Mean ± SD):	**Combined Sexes**			
C_{ss} (ng/mL)				
A-1591706 (LDP4')	194 ± 43.5		202 ± 60.8	
A-21236 (LD)	1740 ± 326		1820 ±385	
A-1610308 (CDP4')	9.03 ± 2.12		10.1 ± 2.78	
A-39432 (CD)	225 ± 55.2		224 ± 43.1	

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study (Recovery)	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**
Noteworthy Findings:						
Mortality	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations (Number of Observations/Number of Animals)						
Retching	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
Material Undigested Food	0/0	6/3	4/2	0/0	7/3	1/1
Material Vomitus Beige	0/0	1/1	0/0	0/0	3/3	1/1
Material Vomitus Brown	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Material Vomitus Clear	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Material Vomitus Yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Skin Lump	3/1	3/2	2/1	0/0	3/2	0/0
Skin Red	82/6	86/6	72/6	97/6	92/6	75/6
Injection site						
Swelling Firm	47/6	113/6	99/6	23/5	119/6	102/6
Swelling Soft	38/5	103/6	135/6	33/6	156/6	135/6

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study (Recovery)	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**
Body Weight (%) [a]						
Day -1	10.47 kg	+3	+4	8.35 kg	+2	0
Day 7	10.60 kg	+1	+3	8.47 kg	0	-4
Day 14	10.77 kg	+1	+1	8.47 kg	+4	-2
Day 21	10.77 kg	0	+4	8.43 kg	0	0
Day 28	10.93 kg	0	+1	8.50 kg	+4	-2
Day 35	10.88 kg	-2	+2	8.50 kg	0	0
Day 42	10.93 kg	-1	+1	8.43 kg	+3	+1
Day 49	10.98 kg	-5	0	8.33 kg	+1	0
Day 56	10.98 kg	-1	+3	8.50 kg	+3	-2
Day 63	10.97 kg	-4	+2	8.37 kg	+1	-1
Day 70	10.83 kg	-4	+2	8.43 kg	0	0
Day 77	11.13 kg	-4	+3	8.80 kg	-1	-2
Day 84	10.90 kg	-1	+2	8.55 kg	+2	-1
Day 91	11.23 kg	-3	0	8.82 kg	+1	0

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study (Recovery)	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**
Food Consumption (%) [a]						
Day 1	225.17 g/animal/day	+1	+28*	200.67 g/animal/day	+31*	-8
Day 7	247.50 g/animal/day	-18	-12	192.00 g/animal/day	+3	-43
Day 14	284.67 g/animal/day	+18	-1	235.50 g/animal/day	+27	+4
Day 21	331.67 g/animal/day	-9	-11	249.33 g/animal/day	+24	-19
Day 28	301.00 g/animal/day	+22	-10	243.50 g/animal/day	+21	-13
Day 35	284.40 g/animal/day	+3	-3	231.67 g/animal/day	+13	+2
Day 42	337.50 g/animal/day	+9	-23*	228.17 g/animal/day	+52**	-17
Day 49	345.33 g/animal/day	-27	-7	233.33 g/animal/day	+15	-20
Day 56	300.17 g/animal/day	+16	-10	222.33 g/animal/day	+57**	-23
Day 63	306.17 g/animal/day	-6	-2	220.33 g/animal/day	+21	+2
Day 70	335.67 g/animal/day	-9	-17	255.60 g/animal/day	+34	+11
Day 77	346.50 g/animal/day	-13	0	265.50 g/animal/day	+8	-16
Day 84	341.67 g/animal/day	-3	-5	320.00 g/animal/day	+1	-24
Day 91	349.67 g/animal/day	-23	-25	310.50 g/animal/day	-17	-29

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study (Recovery)	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**
Hematology	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study (Recovery)	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**	**4(2)**
Gross Pathology - Main Study (Number Observed)						
Infusion Site						
Dark discoloration; black	0	0	4	0	0	4
Lymph Node, Axillary						
Dark Area; few, brown, bilateral	0	0	0	0	1	0
Dark Discoloration; black, right	0	1	0	0	0	1
Dark Discoloration; brown, left	0	0	1	0	0	0
Lymph Node, Lumbar						
Dark Discoloration; brown, bilateral	NE	0	NE	NE	1	0

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals - Main Study	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Histopathology - Main Study (Number Observed)						
Infusion Site						
Pigmented Macrophages						
Minimal	0	2	0	0	0	0
Mild	0	1	4	0	3	4
Moderate	0	1	0	0	1	0
Lymph Node, Axillary						
Pigmented Macrophages						
Minimal	1	2	3	0	3	3
Lymph Node, Lumbar						
Pigmented Macrophages						
Minimal	NE	0	NE	NE	2	0
Mild	NE	1	NE	NE	0	0
Moderate	NE	0	NE	NE	0	1

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals Recovery	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**
Clinical Observations (Number of Observations/Number of Animals)						
Skin Red	5/2	8/2	4/2	9/2	5/1	10/2
Swelling Firm	6/2	2/1	1/1	0/0	0/0	5/1
Swelling Soft	0/0	1/1	1/1	6/2	3/1	2/1
Body Weight	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Dose Level - mg/day (Administered)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**0/0** (Continuous Infusion for 13 Weeks)	**576/28.8** (Cycles of 7-day Continuous Infusion followed by 7-day washout for 13 Weeks)	**576/28.8** (Continuous Infusion for 13 Weeks)
Number of Animals Recovery	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-
Histopathology						
Infusion Site						
Pigmented Macrophages						
Minimal	0	0	0	1	1	0
Mild	0	2	0	0	1	1
Moderate	0	0	2	0	0	1
Lymph Node, Axillary						
Pigmented Macrophages						
Minimal	0	1	1	1	1	2
Mild	0	0	1	0	0	0

2.6.7.7.3 Repeat-Dose Toxicity - Report R&D/18/0060 (Cont.)

GLOSSARY and ENDNOTES	
Abbreviation	**Definition**
A-21236 (LD)	Levodopa
A-39432 (CD)	Carbidopa
A-1591706 (LDP4')	Foslevodopa
A-1610308 (CDP4')	Foscarbidopa
C_{ss}	Concentration at steady state
GLP	Good Laboratory Practice
NE	Not examined
-	No noteworthy findings
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$

a. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Salmonella-Escherichia coli / Mammalian-Microsome Reverse Mutation Assay with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0076)

Lot Number: FT00109149 (foslevodopa)

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells

Strains: Salmonella typhimurium and Escherichia coli

Metabolizing System: Aroclor™-induced rat liver S9

Vehicle: **For Test Article:** Deionized water, adjusted to pH 5.0

Treatment: Plate Incorporation for 52 ± 4 hours

Cytotoxic Effects: Yes

Genotoxic Effects: No

No. of Independent Assays: 1

No. of Replicate Cultures: 3

No. of Cells Analyzed/Culture: ~10^9

For Positive Controls: Deionized water (sodium azide only); DMSO (all other positive controls)

Report Number: R&D/16/0076

AbbVie Study Number: TX15-281

[redacted] **Study Number:** 8336923

GLP Compliance: Yes

Date of Treatment: 20 January 2016

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Metabolic Activation	Treatment	Concentration Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Without Activation	Deionized water, pH = 5.0	-	28 ± 4	97 ± 8	21 ± 4	19 ± 5	29 ± 6
	Foslevodopa	1.60	30 ± 8	100 ± 12	21 ± 4	18 ± 4	27 ± 6
		5.00	24 ± 5	95 ± 9	20 ± 6	21 ± 10	27 ± 8
		16.0	26 ± 6	117 ± 21	26 ± 6	21 ± 6	28 ± 7
		50.0	33 ± 3	98 ± 12	21 ± 2	26 ± 8	32 ± 5
		160	35 ± 4	92 ± 11	24 ± 3	24 ± 1	21 ± 5
		500	36 ± 8	91 ± 13	23 ± 5	25 ± 6	27 ± 10
		1600	31 ± 9	110 ± 10	26 ± 5	21 ± 8	20 ± 4[P]
		5000	35 ± 8	96 ± 4	20 ± 5	20 ± 9	26 ± 7[P]
	2-nitrofluorene	1.0	126 ± 15	-	-	-	-
	sodium azide	2.0	-	956 ± 23	864 ± 16	-	-
	ICR-191	2.0	-	-	-	295 ± 9	-
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0	-	-	-	-	190 ± 30

Criteria for a positive response (increase over corresponding control): ≥ 2-fold for TA98, TA100, and WP2uvrA; ≥ 3-fold for TA1535 and TA1537)

[P]: Precipitation of test article observed

- Not applicable

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Metabolic Activation	Treatment	Concentration Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ±SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
With Activation	Deionized water, pH = 5.0	-	31 ± 7	123 ± 8	17 ± 6	25 ± 10	33 ± 2
	Foslevodopa	1.60	34 ± 4	109 ± 18	18 ± 2	20 ± 4	28 ± 3
		5.00	36 ± 8	107 ± 6	20 ± 2	16 ± 5	25 ± 3
		16.0	38 ± 3	120 ± 8	15 ± 3	21 ± 7	35 ± 5
		50.0	37 ± 6	117 ± 7	19 ± 5	15 ± 3	31 ± 5
		160	39 ± 8	116 ± 8	14 ± 4	21 ± 2	28 ± 8
		500	35 ± 9	117 ± 18	21 ± 6	19 ± 9	30 ± 4
		1600	38 ± 1[P]	110 ± 13[P]	24 ± 6[P]	13 ± 3[P]	29 ± 4[P]
		5000	31 ± 12[P]	125 ± 6[P]	25 ± 1[P]	15 ± 7[P]	26 ± 5[P]
	benzo[a]pyrene	2.5	351 ± 33	-	-	-	-
	2-aminoanthracene	2.5	-	2354 ± 142	283 ± 22	372 ± 23	-
	2-aminoanthracene	25.0	-	-	-	-	345 ± 18

Criteria for a positive response (increase over corresponding control): ≥ 2-fold for TA98, TA100, and WP2uvrA; ≥ 3-fold for TA1535 and TA1537)

[P]: Precipitation of test article observed

- Not applicable

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Lot Number: 1000109143 (foscarbidopa)

Test for Induction of:	Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:**	2	**Report Number:**	R&D/16/0076
Strains:	Salmonella typhimurium and Escherichia coli	**Number of Replicate Cultures:**	3	**AbbVie Study Number:**	TX15-281
Metabolizing System:	Aroclor™-induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	~10^9	[redacted] **Study Number:**	8336923
Vehicle: **For Test Article:**	Deionized (DI) water, adjusted to pH 5.0	**For Positive Controls:**	Deionized Water (sodium azide only); DMSO (all other positive controls)	**GLP Compliant:**	Yes

Treatment: Plate Incorporation for 52 ± 4 hours

Date of Treatment: 20 January 2016

Cytotoxic Effects: Yes

Genotoxic Effects: Yes. A-1610308 was positive in tester strain WP2uvrA in the absence of S9

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Metabolic Activation	Treatment	Concentration Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
Without Activation	Deionized water, pH = 5.0	-	39 ± 8	89 ± 12	20 ± 4	17 ± 1	32 ± 4
	Foscarbidopa	1.60	31 ± 13	101 ± 9	24 ± 5	18 ± 5	26 ± 3
		5.00	36 ± 8	102 ± 12	20 ± 3	22 ± 3	27 ± 16
		16.0	29 ± 7	89 ± 10	18 ± 2	20 ± 7	27 ± 8
		50.0	37 ± 5	88 ± 5	28 ± 8	27 ± 2	29 ± 6
		160	24 ± 6	90 ± 7	24 ± 5	18 ± 6	29 ± 3
		500	36 ± 7	93 ± 10	24 ± 6	14 ± 6	30 ± 6
		1600	42 ± 8	83 ± 7	27 ± 6	25 ± 7	35 ± 11
		5000	37 ± 2	103 ± 9	46 ± 6	19 ± 2	102 ± 9
	2-nitrofluorene	1.0	116 ± 10	-	-	-	-
	sodium azide	2.0	-	1001 ± 89	747 ± 6	-	-
	ICR-191	2.0	-	-	-	292 ± 32	-
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0	-	-	-	-	239 ± 41

Criteria for a positive response (increase over corresponding control): ≥ 2-fold for TA98, TA100, and WP2uvrA; ≥ 3-fold for TA1535 and TA1537)

- Not applicable

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Metabolic Activation	Treatment	Concentration Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ±SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
With Activation	Deionized water, pH = 5.0	-	35 ± 6	107 ± 14	25 ± 6	25 ± 2	33 ± 15
	Foscarbidopa	1.60	30 ± 5	101 ± 6	26 ± 6	21 ± 4	31 ± 6
		5.00	37 ± 11	98 ± 8	25 ± 8	22 ± 4	24 ± 13
		16.0	39 ± 5	105 ± 12	23 ± 6	21 ± 8	33 ± 8
		50.0	41 ± 12	97 ± 11	22 ± 8	22 ± 6	28 ± 9
		160	30 ± 8	99 ± 13	23 ± 11	17 ± 4	35 ± 6
		500	32 ± 7	95 ± 17	22 ± 2	27 ± 10	33 ± 8
		1600	39 ± 9	82 ± 11	21 ± 4	17 ± 4	21 ± 3
		5000	28 ± 6[R]	93 ± 13[R]	21 ± 5[R]	20 ± 6[R]	12 ± 4
	benzo[a]pyrene	2.5	334 ± 40	-	-	-	-
	2-aminoanthracene	2.5	-	1911 ± 76	276 ± 31	305 ± 9	-
	2-aminoanthracene	25.0	-	-	-	-	416 ± 116

Criteria for a positive response (increase over corresponding control): ≥ 2-fold for TA98, TA100, and WP2uvrA; ≥ 3-fold for TA1535 and TA1537)

[R] Reduced background bacterial lawn

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Lot Number: 1000109143 (foscarbidopa)

Test for Induction of:	Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:**	2	**Report Number:**	R&D/16/0076
Strains:	Salmonella typhimurium and Escherichia coli	**Number of Replicate Cultures:**	3	**AbbVie Study Number:**	TX15-281
Metabolizing System:	Aroclor™-induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	~10^9	[redacted] **Study Number:**	8336923
Vehicle:	**For Test Article:** Deionized water adjusted to pH 5.0	**For Positive Controls:**	Deionized Water (sodium azide only); DMSO (all other positive controls)	**GLP Compliant:**	Yes
Treatment:	Plate Incorporation for 52 ± 4 hours			**Date of Treatment:**	03 February 2016

Cytotoxic Effects: No

Genotoxic Effects: Yes. A-1610308 was positive in tester strain WP2uvrA in the absence of S9 in the confirmatory trial.

2.6.7.8.1 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0076 (Cont.)

Metabolic Activation	Treatment	Concentration Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
			WP2uvrA	-	-	-	-
Without Activation	Deionized water, pH = 5.0	-	22 ± 2	-	-	-	-
	Foscarbidopa	100	19 ± 3	-	-	-	-
		500	20 ± 4	-	-	-	-
		1000	24 ± 3	-	-	-	-
		2000	42 ± 9	-	-	-	-
		3000	53 ± 8	-	-	-	-
		4000	79 ± 6	-	-	-	-
		5000	131 ± 9	-	-	-	-
	4-nitroquinoline-N-oxide	1.0	171 ± 5	-	-	-	-

Criteria for a positive response (increase over corresponding control): ≥ 2-fold for WP2uvrA;
- = Not applicable.

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0077)

Lot Number: FT00109149 (foslevodopa)

Test for Induction of:	Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:**	2	**Report Number:**	R&D/16/0077
Strains:	Primary human lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:**	2	**AbbVie Study Number:**	TX15-282
Metabolizing System:	Aroclor™ 1254 -induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	300 (or ≥ 15 if > 15% cells with aberrations)	[redacted] **Study Number:**	8336924
Vehicles:	**For Test Article:** Deionized water, adjusted to pH 5.0	**For Positive Controls:**	Deionized water	**GLP Compliant:**	Yes
Treatment:	Pulse treatment 3 hr and recovery time 21 hr with and without S9; Continuous treatment 24 hr without S9			**Dates of Treatment:**	21 January 2016 25 February 2016

Cytotoxic Effects: Yes

Genotoxic Effects: No

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0077 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	1	0.33	2	1	0.00	-
	Foslevodopa	141	7	1	0.33	3	1	0.00	NS
		188	0	2	0.67	6	2	0.67	NS
		250	9	2	0.67	5	2	0.33	NS
	Mitomycin C	1.00	37	60	65.9	109	107	0.00	$p \leq 0.001$
24-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	1	0.33	2	1	0.00	-
	Foslevodopa	194	1	1	0.33	4	1	0.00	NS
		226	20	2	0.67	4	2	0.67	NS
		238	45	2	0.67	4	2	0.33	NS
	Mitomycin C	0.300	43	60	57.7	91	90	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, GLP = Good Laboratory Practice, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0077 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour with activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 mL/mL	-	0	0.00	1	0	0.00	-
	Foslevodopa	141	16	2	0.67	5	2	0.67	NS
		188	11	1	0.33	6	1	0.00	NS
		250	11	1	0.33	4	1	0.33	NS
	Cyclophosphamide	15.0	42	60	51.7	93	93c	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, GLP = Good Laboratory Practice, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes),

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

c. Cell which contained >4 aberrations (multiple aberrations) were calculated as having 5 aberrations; ≥ is used in these instances since the exact number of aberrations was not recorded.

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0077 (Cont.)

Lot Number: 1000109143 (foscarbidopa)

Test for Induction of:	Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:**	3	**Report Number:**	R&D/16/0077
Strains:	Primary human lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:**	2	**AbbVie Study Number:**	TX15-282
Metabolizing System:	Aroclor™ 1254 -induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	300 (or ≥ 15 if > 15% cells with aberrations)	[redacted] **Study Number:**	8336924
Vehicles:	**For Test Article:** Deionized water, adjusted to pH 5.0	**For Positive Controls:**	Deionized water	**GLP Compliant:**	Yes
Treatment:	Pulse treatment 3 hr and recovery time 21 hr with and without S9; Continuous treatment 24 hr without S9			**Dates of Treatment:**	28 January 2016, 25 February 2016, 17 March 2016
Cytotoxic Effects:	Yes				
Genotoxic Effects:	No				

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0077 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/mL)	MIH (%) [a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance [b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 mL/mL	-	0	0.00	0	0	0.00	-
	Foscarbidopa	141	24	2	0.67	5	2	0.67	NS
		188	24	2	0.67	9	2	0.33	NS
		250	25	5	1.67	11	5	0.00	$p \leq 0.05$
	Mitomycin C	1.00	53	60	70.6	107	107	0.00	$p \leq 0.001$
24-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 mL/mL	-	1	0.33	3	1	0.33	-
	Foscarbidopa	10.6	18	3	1.00	6	3	0.00	NS
		14.1	26	0	0.00	1	0	0.33	NS
		18.8	31 [c]	1	0.33	4	1	0.33	NS
	Mitomycin C	0.300	48	60	35.9	94	89 [d]	0.33	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

c. Precipitate observed at the end of the treatment period.

d. Cell which contained >4 aberrations (multiple aberrations) were calculated as having 5 aberrations; ≥ is used in these instances since the exact number of aberrations was not recorded.

2.6.7.8.2 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0077 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (mg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour with activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 mL/mL	-	1	0.33	1	1	0.00	-
	Foscarbidopa	141	1	0	0.00	1	0	0.00	NS
		188	0	0	0.00	3	0	0.33	NS
		250	0	2	0.67	4	2	0.00	NS
	Cyclophosphamide	15.0	55	60	57.1	95	95	0.00	$p \leq 0.001$

MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes),

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report Title: Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes with A-1591706.0 Free Form and A-1610308.0 Trihydrate (R&D/16/0698)

Lot Number: FT00105980 (foslevodopa)

Test for Induction of:	Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:**	2	**Report Number:**	R&D/16/0698
Strains:	Primary human lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:**	2	**AbbVie Study Number:**	TX16-144
Metabolizing System:	Aroclor™ 1254 -induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	150 (or ≥ 15 if > 15% cells with aberrations)	[redacted] **Study Number:**	8347555
Vehicles:	**Test Article:** Deionized water, adjusted to pH 5.0	**Positive Control:**	Deionized water	**GLP Compliant:**	Yes
Treatment:	Pulse treatment 3 hour and recovery time 21 hour with and without S9; Continuous treatment 24 hour without S9			**Dates of Treatment:**	02 June 2016 and 15 June 2016

Cytotoxic Effects: 3 and 24 hours without S9; 29% and 51% reduction in mitotic index, respectively

Genotoxic Effects: No

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0698 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	1	0.33	6	1	0.00	-
	Foslevodopa	250	24	0	0.00	7	0	0.33	NS
		260	33	1	0.33	5	1	0.67	NS
		280	29	1	0.33	4	1	0.33	NS
	Mitomycin C	1.00	89	60	45.5	101	94	0.00	$p \leq 0.001$
24-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	0	0.00	4	0	0.00	-
	Foslevodopa	21.0	22	0	0.00	1	0	0.67	NS
		230	30	0	0.00	3	0	0.00	NS
		280	51	3	1.00	7	3	0.67	NS
	Mitomycin C	0.300	64	60	43.2	101	93	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0698 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour with activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	0	0.00	3	0	0.00	-
	Foslevodopa	250	0	0	0.00	5	0	0.00	NS
		260	0	0	0.00	4	0	0.00	NS
		280	0	0	0.00	7	0	0.00	NS
	Cyclophosphamide	15.0	70	58	34.9	107	90	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0698 (Cont.)

Lot Number: 1000132323 (foscarbidopa)

Test for Induction of:	Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:**	1	**Report Number:**	R&D/16/0698
Strains:	Primary human lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:**	2	**AbbVie Study Number:**	TX16-144
Metabolizing System:	Aroclor™ 1254 -induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:**	150 (or ≥ 15 if > 15% cells with aberrations)	[redacted] **Study Number:**	8347555
Vehicles:	**Test Article:** Deionized water, adjust to pH 5.0	**Positive Control:**	Deionized Water	**GLP Compliant:**	Yes
Treatment:	Pulse treatment 3 hour and recovery time 21 hour with and without S9; Continuous treatment 24 hours without S9			**Date of Treatment:**	02 June 2016

Cytotoxic Effects: 3 and 24 hours without S9; 10% and 40% reduction in mitotic index, respectively

Genotoxic Effects: No

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0698 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	1	0.33	1	1	0.00	-
	Foscarbidopa	270	11	2	0.67	5	2	1.00	NS
		290	6	0	0.00	0	0	0.33	NS
		310	10	2	0.67	6	2	0.00	NS
	Mitomycin C	1.00	64	59	43.1	97	88[c]	0.00	$p \leq 0.001$
24-hour without activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	1	0.33	6	1	0.33	-
	Foscarbidopa	9.82	24	3	1.00	7	3	0.33	NS
		23.3	38	2	0.67	8	2	0.00	NS
		31.0	40[d]	2	0.67	13	2	0.00	NS
	Mitomycin C	0.300	81	54	27.1	75	67	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

c. Cell which contained > 4 aberrations (multiple aberrations) were calculated as having 5 aberrations; ≥ is used in these instances since the exact number of aberrations was not recorded.

d. Precipitate observed at the end of the treatment period.

2.6.7.8.3 Genotoxicity: In Vitro - Report R&D/16/0698 (Cont.)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	MIH (%)[a]	Cells with Aberrations Excluding Gaps	Aberrant Cells Mean%	Aberrations per Cell		%P+E (mean)	Significance[b]
						+Gaps	-Gaps		
3-hour with activation	Deionized water, pH = 5.0	10.0 µL/mL	-	0	0.00	5	0	0.33	-
	Foscarbidopa	270	0	1	0.33	5	1	0.33	NS
		290	0	3	1.00	9	3	0.00	NS
		310	0	2	0.67	9	2	0.33	NS
	Cyclophosphamide	15.0	71	60	38.5	97	84[b]	0.00	$p \leq 0.001$

- Not applicable, E = endoreduplicated, MIH = mitotic inhibition, NS = Not significant, P = polyploid (greater than 68 chromosomes)

a. MIH (%) = [1 - (mean MI_T/mean MI_C)] x 100% (where T = treatment and C = vehicle control)

b. The statistical method used was Fisher's exact test

2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo

2.6.7.9.1 Genotoxicity: In Vivo - Report Title: An In Vivo Micronucleus Assay of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate by Continuous Intravenous Infusion in Sprague Dawley Rats (R&D/19/0121)

Lot Numbers: FT00273355/1000275773 (foslevodopa/foscarbidopa)

Test for Induction of:	Bone marrow micronuclei	**Treatment Schedule:**	2 consecutive days	**Report Number:**	R&D/19/0121
Species/Strain:	Rat/Sprague-Dawley	**Sampling Time:**	Approximately 18 to 24 hours after last dose	**Study Number:**	TA18-185
Age:	Approximately 9 weeks	**Method of Administration:**	Continuous 24-hour intravenous infusion	[redacted] **Study Number:**	00022510
Cells Evaluated:	TE and MN-PCEs	**Vehicle/Formulation:**	0.9% Sodium Chloride for Injection, pH 7.4/solution; Dose volume = 28.8 mL/kg/day	**GLP Compliant:**	Yes
Number of Cells Analyzed/Animal:	500 TE and 4000 PCE			**Date of Dosing:**	Phase A: 04 Feb 2019 Phase B: 15 Apr 2019

Special Features: Administration of A-1591706/A-1610308 for 2 consecutive days at 125/31.25, 250/62.5, and 500/125 mg/kg/day did not result in enough immature erythrocytes to evaluate the induction of bone marrow micronuclei; therefore, a Phase B micronucleus was conducted.

Toxic/Cytotoxic Effects: Not applicable.

Genotoxic Effects: None.

Evidence of Exposure: Exposure in the plasma was confirmed by toxicokinetics.

2.6.7.9.1 Genotoxicity: In Vivo - Report R&D/19/0121 (Cont.)

Phase A

Test Article	Dose (mg/kg)	Number of Males	Harvest Time	% Micronucleated PCEs Mean of 4000 per animal ± SD	Ratio PCE:TE Mean ± SD
0.9% Sodium Chloride for Injection	0	5	18 to 24 hours postdose	0.06 ± 0.04	0.48 ± 0.03
Foslevodopa/Foscarbidopa	125/31.25	5	18 to 24 hours postdose	0.06 ± 0.03	0.46 ± 0.02
	250/62.5	5	18 to 24 hours postdose	0.08 ± 0.02	0.48 ± 0.02
	500/125	5	18 to 24 hours postdose	0.10 ± 0.07	0.46 ± 0.03
Cyclophosphamide [a]	60	5	18 to 24 hours postdose	2.38 ± 0.26*	0.40 ± 0.01

Phase B

Test Article	Dose (mg/kg)	Number of Males	Harvest Time	% Micronucleated PCEs Mean of 4000 per animal ± SD	Ratio PCE:TE Mean ± SD
0.9% Sodium Chloride for Injection	0	6	18 to 24 hours postdose	0.07 ± 0.01	0.46 ± 0.03
Foslevodopa/Foscarbidopa	125/31.25	6	18 to 24 hours postdose	0.09 ± 0.03	0.44 ± 0.07
	250/62.5	6	18 to 24 hours postdose	0.06 ± 0.03	0.49 ± 0.01
	500/125	6	18 to 24 hours postdose	0. 07 ± 0.02	0.47 ± 0.02
Cyclophosphamide [a]	60	6	18 to 24 hours postdose	1.89 ± 0.40*	0.39 ± 0.04

* $p \leq 0.01$ when compared to the control group using Dunnett's test.

PCE = Polychromatic erythrocyte, TE = total erythrocytes.

a. Positive control reference slides, obtained from a separate experiment with cyclophosphamide administered once approximately 24 hours prior to harvest, were included in the slide set to verify scorer proficiency.

2.6.7.10 Carcinogenicity

No studies were conducted.

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity - Nonpivotal Studies

No studies were conducted.

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development

No studies were conducted.

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

No studies were conducted.

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre and Postnatal Development, Including Maternal Function

No studies were conducted.

2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals

No studies were conducted.

2.6.7.16 Local Tolerance

2.6.7.16.1 Local Tolerance – Nonpivotal Studies

Species and Strain	Route (Method) of Administration (Vehicle/Formulation); Infusion Rate	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa Doses	Sex and Number per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report Number
Dog Beagle	24-hour continuous subcutaneous (infusion) in sterile water, pH 7.4; 1 mL/hour	2 days	200/50 mg/mL	Males 1 Females 1	NA	**200/50 mg/kg/day male**: The dosing catheter was found to be removed approximately 4 hours post dose on Day 1. Dosing was terminated. Clinical observations prior to dose termination included emesis and skin swelling around injection site. **200/50 mg/kg/day female**: Dose was administered for approximately 33 hours. Clinical observations included emesis, salivation, ↓ activity, compulsive behavior, abnormal gait and lateral recumbency. No adverse infusion site pathology	R&D/16/0051
Dog Beagle	24-hour continuous subcutaneous (infusion) in sterile water, pH 7.4 0.1 or 0.25 mL/hour	14 days	480/120, 1200/300 mg/day	Males 3	NA	1200/300 mg/day: ↓ food consumption, and absent, unformed and/or watery feces. ≥ 480/120 mg/day: emesis, ↓ body weight, red/black skin discoloration around injection site	R&D/16/0886

2.6.7.16.1 Local Tolerance – Nonpivotal Studies (Cont.)

Species and Strain	Route (Method) of Administration (Vehicle/Formulation); Dose Volume or Infusion Rate	Duration of Dosing	Foslevodopa/Foscarbidopa Doses	Sex and Number per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report Number
Dog Beagle	24-hour continuous subcutaneous (infusion) in sterile water, pH 7.4 0.1 or 0.25 mL/hour	14 days	0/0 (saline; pH = 7.4), 480/120, 1200/300 mg/day	Males 2 females 2	NA	**1200/300 mg/day**: intermittent emesis mild to severe ↓ body weight and moderate to severe ↓ food consumption, lump/swelling in the lumbar region. Lump/swelling at infusion site was considered possibly exacerbated by the administration of increased volume of test item. **480/120 mg/day**: intermittent emesis, ↓ body weight and food consumption	R&D/16/1374

↓ = decreased, NA = not applicable, NOAEL = no-observed-adverse-effect level.

2.6.7.16.2 Local Tolerance - Report Title: Two to Five Day Continuous Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form and A-1610308 Trihydrate (Monophosphate Prodrugs of Levodopa and Carbidopa) in Beagle Dogs (R&D/16/0212)

Lot Numbers: FT00109149/1000109143 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	2 or 5 days	**Report Number:**	R&D/16/0212
Initial Age:	14 to 15 months old	**Duration of Postdose:**	Not applicable	**Study Number:**	TB16-016
Date of First Dose:	09 February 2016	**Route (Method) of Administration:**	24-hour continuous subcutaneous (infusion); Infusion rate 0.5 mL/hour	**GLP Compliant:**	Yes

Vehicle/Formulation: Sterile water for injection, pH 7.4

Special Features: Assessment of local tolerability; gross and histopathologic evaluation of injection site.

Local Tolerance: Continuous subcutaneous infusion of 200/50 mg/mL of the prodrugs A-1591706/A-1610308 at a rate of 0.5 mL/hour for up to five days was not associated with evidence of local intolerance at the injection site.

2.6.7.16.2 Local Tolerance - Report R&D/16/0212 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**2400/600**	**0 (Saline; pH = 7.4)**	**2400/600**	**2400/600**	**0 (Saline; pH = 7.4)**	**2400/600**
Duration of Dosing	**2 days**	**5 days**	**5 days**	**2 days**	**5 days**	**5 days**
Number of Animals	**3**	**3**	**4 [0]**	**3**	**3**	**3**
Noteworthy Findings						
Clinical Observations						
Injection site swollen - nonadverse						
Mild	2	0	4	3	0	3
Activity, decreased						
Mild	2	0	0	3	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	1
Emesis, brown, red, white, and/or yellow [b]						
Mild	3	0	1	0	0	2
Moderate	0	0	3	3	0	1
Absent feces	0	0	3	0	0	1
Body Weight (kg)						
Dosing Day 1	12.8560	12.9667	13.3175	8.3833*	7.4723	9.7803***
Dosing Day 3	12.0550	NA	NA	7.4817	NA	NA
Dosing Day 6	NA	12.5783	11.9857	NA	7.1690	8.3557*
Food Consumption [c] (%)						
Dosing Day 2	-86*	256.77 g/day	-27	-51	172.47 g/day	-96**

2.6.7.16.2 Local Tolerance – Report R&D/16/0212 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**2400/600**	**0 (Saline; pH = 7.4)**	**2400/600**	**2400/600**	**0 (Saline; pH = 7.4)**	**2400/600**
Duration of Dosing	**2 days**	**5 days**	**5 days**	**2 days**	**5 days**	**5 days**
Number of Animals	**3**	**3**	**4 [0]**	**3**	**3**	**3**
Noteworthy Findings						
Gross Pathology (Number Observed)						
Abnormal consistency of subcutis at injection site [a]	3	0	3	2	0	3
Histopathology (Number Observed)						
Injection site						
Fluid accumulation						
Minimal	0	0	1	0	0	0
Mild	1	0	1	1	0	1
Moderate	2	0	0	2	0	1

Dunnett Exact Homogenous Test: *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001

a. Animal 3005 pulled out his catheter on Day 2 and was subsequently removed from the study.

b. Each animal counted only once regardless of the number of times emesis was noted and each is tallied under the greatest degree of severity.

c. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from control are shown. Statistical significance is based on actual data, not on the percent differences. All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

2.6.7.16.3 Local Tolerance - Report Title: ABBV-951: A 28-Day Continuous Subcutaneous Infusion Local Tolerability Study of A-1591706 Free Form/A-1610308 Trihydrate in Beagle Dogs (R&D/17/0113)

Lot Numbers: FT00105980/2325814 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	28 days	**Report Number:**	R&D/17/0113
Age at Dose Initiation:	10 to 11 months old	**Duration of Postdose:**	NA	**AbbVie Study Number:**	TB16-224
				[redacted] **Study Number:**	1016-2792
Date of First Dose:	01 February 2017	**Route (Method) of Administration:**	24-hour continuous subcutaneous (infusion); Dose Volume = 2.4 mL/day for 480/120 mg/day group and 6 mL/day for 1200/300 mg/day group	**GLP Compliance:**	Yes

Vehicle/Formulation: Bacteriostatic Water for Injection, USP (0.9% Benzyl Alcohol), pH 7.4

Special Features: Assessment of local tolerability. Bacteriology and cytology evaluations were conducted on animals presenting a severe reaction at the infusion site.

Local Tolerance: The highest tolerated dose level after 28 days of continuous subcutaneous infusion of ABBV-951 in male and female beagle dogs was considered to be the low dose of 480/120 mg/day A-1591706/A-1610308.

2.6.7.16.3 Local Tolerance – Report - R&D/17/0113 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**0/0**	**480/120**	**1200/300**	**0/0**	**480/120**	**1200/300**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings						
Mortality	0	0	3 [a]	0	0	2 [a]
Clinical Observations (Number of Days/Number of Animals)						
Material Undigested Food	0/0	3/3	5/3	0/0	3/3	3/3
Material Vomitus, Beige	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1
Material Vomitus, Brown	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1
Material Vomitus, White	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0
Material Vomitus, Yellow	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Skin Lump	1/1	3/2	5/3	0/0	0/0	1/1
Skin Red	61/4	64/4	50/4	58/4	56/4	55/4
Skin Swelling Soft	26/4	24/4	16/4	18/4	11/4	32/4
Skin Swelling Firm	0/0	5/3	13/4	0/0	2/2	7/3
Skin Wound	10/3	3/2	8/2	2/2	16/4	6/3
Skin Wound with Discharge	9/4	5/2	8/2	6/3	0/0	12/4

2.6.7.16.3 Local Tolerance – Report - R&D/17/0113 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**0/0**	**480/120**	**1200/300**	**0/0**	**480/120**	**1200/300**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Body Weight (%) [b]						
Day -1	9.85 kg	-5	+12	9.30 kg	-7	-5
Day 3	9.85 kg	-8	+8	9.23 kg	-7	-6
Day 7	9.83 kg	-8	+9	9.35 kg	-6	-3
Day 14	9.90 kg	-7	-4	9.38 kg	-9	-10
Day 21	9.88 kg	-9	-1	9.08 kg	-7	-7
Day 28	9.65 kg	-8	-9 (n=1)	8.95 kg	-7	-8 (n=3)
Food Consumption (%) [b]						
Day 1	190.25 g/animal/day	-24	+39	191.75 g/animal/day	+23	-9
Day 3	215.25 g/animal/day	-36	-39	237.25 g/animal/day	-20	-30
Day 7	234.50 g/animal/day	+1	+2	221.00 g/animal/day	-4	+8
Day 14	215.00 g/animal/day	+30	-66	283.75 g/animal/day	-23	-42
Day 21	300.00 g/animal/day	-15	-5	296.50 g/animal/day	-16	-9
Day 28	352.00 g/animal/day	-22	-9 (n=1)	329.75 g/animal/day	-17	+15 (n=2)

2.6.7.16.3 Local Tolerance – Report - R&D/17/0113 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**0/0**	**480/120**	**1200/300**	**0/0**	**480/120**	**1200/300**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Clinical Pathology						
Hematology	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-
Histopathology:						
Infusion site						
Inflammation; Subcutaneous; Neutrophilic						
Minimal	1	1	1	1	1	0
Mild	2	0	0	0	0	0
Moderate	1	1	0	2	0	1
Marked	0	0	0	1	1	2
Severe	0	0	3	0	0	1
Inflammation; Subcutaneous; Mononuclear						
Minimal	0	1	0	0	1	0
Mild	2	2	2	0	1	0
Moderate	2	1	0	3	0	3
Marked	0	0	2	1	1	1

2.6.7.16.3 Local Tolerance – Report - R&D/17/0113 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**0/0**	**480/120**	**1200/300**	**0/0**	**480/120**	**1200/300**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Clinical Pathology						
Hematology	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-
Histopathology:						
Infusion site						
Inflammation; Subcutaneous; Neutrophilic						
Minimal	1	1	1	1	1	0
Mild	2	0	0	0	0	0
Moderate	1	1	0	2	0	1
Marked	0	0	0	1	1	2
Severe	0	0	3	0	0	1
Inflammation; Subcutaneous; Mononuclear						
Minimal	0	1	0	0	1	0
Mild	2	2	2	0	1	0
Moderate	2	1	0	3	0	3
Marked	0	0	2	1	1	1

2.6.7.16.3 Local Tolerance – Report - R&D/17/0113 (Cont.)

	Foslevodopa/Foscarbidopa					
Sex	**Males**			**Females**		
Daily Dose (mg/day)	**0/0**	**480/120**	**1200/300**	**0/0**	**480/120**	**1200/300**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Histopathology (Cont.):						
Infusion site (Cont.)						
Fibroplasia; Subcutaneous						
Minimal	0	2	0	1	1	0
Mild	1	1	1	1	1	1
Moderate	3	0	2	2	1	0
Marked	0	0	1	0	0	3
Fibrosis; Subcutaneous						
Minimal	0	2	0	0	1	0
Mild	4	0	3	2	2	2
Moderate	0	2	1	2	0	2

- No noteworthy findings

a. Preterminal euthanasia between Days 22 and 28 was due to clinical signs related to severe reactions at the infusion site correlating with cytologic findings of suppurative/septic inflammation and positive bacterial cultures or presence of a procedure related abscess at the subcutaneous port region.

b. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

2.6.7.17.1 Other Toxicity Studies – Antigenicity

No studies were conducted.

2.6.7.17.2 Other Toxicity Studies – Immunotoxicity

No studies were conducted.

2.6.7.17.3 Other Toxicity Studies - Mechanistic Studies

No studies were conducted.

2.6.7.17.4 Other Toxicity Studies – Dependence

No studies were conducted.

2.6.7.17.5 Other Toxicity Studies – Metabolites

No studies were conducted.

2.6.7.17.6 Other Toxicity Studies – Impurities

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity – Impurities - Report Title: A GLP 13-Week Study of A-1591706 Free Form, A-1610308 Trihydrate, and Associated Impurities (co-formulated) by Subcutaneous Infusion in Beagle Dogs (R&D/19/1129)

Lot Numbers: 2593081/2593082 (foslevodopa/foscarbidopa)

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Report Number:**	R&D/19/1129
Age at Dose Initiation:	Approximately 14 to 17 months	**Duration of Postdose:**	Not applicable	**Study Number:**	TB19-103
				[redacted] **Study Number**	2100-418
Date of First Dose:	24 October 2019	**Route (Method) of Administration:**	24-hour continuous subcutaneous infusion	**GLP Compliant:**	Yes

Vehicle/Formulation: Bacteriostatic water for injection USP (0.9% Benzyl Alcohol); Dose rate = 0.0087 mL/kg/hr

Special Features: None

Conclusion: Continuous subcutaneous infusion of A-1591706/A-1610308 was tolerated systemically based on the general maintenance in body weight with food enrichment/supplementation, and the absence of any clinical pathology changes suggestive of toxicity.

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity - Impurities - Report R&D/19/1129 (Cont.)

Sex	Males		Females	
Treatment	Foslevodopa/Foscarbidopa	Foslevodopa/Foscarbidopa (+ Impurities)	Foslevodopa/Foscarbidopa	Foslevodopa/Foscarbidopa (+ Impurities)
Dose Level (mg/kg/day)	**50/2.5**	**50/2.5**	**50/2.5**	**50/2.5**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**
Toxicokinetics: (Means)				
A-1591706 (LDP4')				
C_{ss} (ng/mL)	148 ± (21.2)	146 ± (27.0)	84.6 ± (21.6)	92.0 ± (9.54)
A-1610308 (CDP4')				
C_{ss} (ng/mL)	17.6 ± (2.66)	21.2 ± (5.86)	10.7 ± (2.09)	15.6 ± (1.24)
A-21236 (LD)				
C_{ss} (ng/mL)	1290 ± (50.8)	1350 ± (164)	963 ± (151)	1420 ± (234)
A-39432 (CD)				
C_{ss} (ng/mL)	166 ± (23.8)	141 ± (22.5)	138 ± (18.3)	175 ± (10.1)

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity - Impurities - Report R&D/19/1129 (Cont.)

Sex	**Males**			**Females**		
Treatment	**Vehicle**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)**	**Vehicle**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)**
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings:						
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations (Number Observed/Number Affected)						
Swelling	46/3	168/4	305/4	87/4	111/4	465/4
Thin	10/1	4/2	45/2	7/1	0/0	9/3
Inappetence	0/0	0/0	9/3	1/1	4/1	8/3
Body Weight – Day 91	8.963 kg	-	-	6.8 kg	-	-
Body Weight Change – Days 88 to 91	0.113 kg	-	-	-0.238 kg	-	-
Food Consumption [a] (g/animal/day) (%)						
Day 1→2	231.3	-40	-73**	168.3	-44	-12
Day 31→32	217.3	-27	-52	159.5	-7	+6
Day 61→62	251.5	-12	-51	205.3	-15	-29
Day 91→92	203.3	+7	-27	209.3	-42	-22
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity - Impurities - Report R&D/19/1129 (Cont.)

Sex	Males			Females		
Treatment	Vehicle	Foslevodopa/ Foscarbidopa	Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)	Vehicle	Foslevodopa/ Foscarbidopa	Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings (cont.):						
Hematology	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Number Observed)						
Number Examined	4	4	4	4	4	4
Infusion site						
swollen/thickened	0	1	3	0	1	2
fluid, clear	0	0	0	1	0	2
cyst	0	0	0	0	1	0
Skin, subcutis						
edema	0	0	1	0	0	0

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity - Impurities - Report R&D/19/1129 (Cont.)

Sex	**Males**			**Females**		
Treatment	**Vehicle**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)**	**Vehicle**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa**	**Foslevodopa/ Foscarbidopa (+ Impurities)**
Dose Level (mg/kg/day)	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**	**0/0**	**50/2.5**	**50/2.5**
Number of Animals	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Noteworthy Findings (cont.):						
Histopathology (Number Observed)						
Number Examined	4	4	4	4	4	4
Infusion site						
mineralization						
mild	0	0	2	0	0	0
moderate	0	0	0	0	0	3
marked	0	0	2	0	0	1
erosion/ulcer						
mild	0	0	0	0	1	0
marked	0	0	1	0	0	0
macrophages, pigmented						
minimal	2	1	3	0	3	3
mild	0	2	1	0	1	1
Lymph node, inguinal						
macrophages, pigmented						
minimal	0	0	1	0	0	1

2.6.7.17.6.1 Other Toxicity - Impurities - Report R&D/19/1129 (Cont.)

GLOSSARY and ENDNOTES	
Abbreviation	**Definition**
A-21236 (LD)	Levodopa
A-39432 (CD)	Carbidopa
A-1591706 (LDP4')	Foslevodopa
A-1610308 (CDP4')	Foscarbidopa
NA	Not Applicable
-	No noteworthy findings
**	ANOVA & Dunnett; Significantly different from control: ($p < 0.01$)

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. All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

2.6.7.17.6.2 Other Toxicity Studies – Impurities – Hydrazine Monohydrate

Highest Concentration Tested	Result	GLP Compliant	Test Facility	Report Number (Module)
250 µg/well	Positive in the 6-well bacterial reverse mutation assay.	No	AbbVie	R&D/19/0390
20.62 M	↑ cytotoxicity in the XR1 cells, cell line deficient in XRCC4 indicating that hydrazine monohydrate induces DSBs that require NHEJ for their repair. In addition, 2 cell lines deficient in nucleotide excision repair show ↑ sensitivity to hydrazine monohydrate in the clonogenic survival assay. Hydrazine sensitizes cells that are defective in nucleotide excision repair and NHEJ, indicating these DNA repair pathways are important for recognizing and repairing DNA damage associated with exposure to hydrazine	No	[redacted]	R&D/19/1160
1000 µg/mL	Does not induce mutations in FE1 cells with and without metabolic activation.	No	AbbVie	R&D/18/0858
501 µg/mL	Positive for the ability to induce forward mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells in the presence of an exogenous metabolic activation system and negative in the absence of exogenous metabolic activation system.	Yes	[redacted]	R&D/18/0227
10.9 mg/kg/day	Negative for the induction of *cII* mutants in liver and lung of Big Blue® mice.	Yes	[redacted]	R&D/18/1285

DNA = deoxyribonucleic acid, DSBs = DNA strand breaks, NHEJ = Non-Homologous End-Joining

2.6.7.17.6.3 Other Toxicity Studies – Impurities – Bacterial Mutation Assays for Potential Impurities

Impurity	Highest Concentration Tested (µg/well)	Result	GLP Compliant	Test Facility	Report Number (Module)
[redacted]	1000	Negative	Yes	AbbVie	R&D/18/0795
[redacted]	1000	Negative	Yes	AbbVie	R&D/19/0682
不純物A＊	1000	Negative	Yes	AbbVie	R&D/20/0378
[redacted] ([redacted])	5000	Negative	Yes	[redacted]	R&D/11/884
[redacted] ([redacted])	5000	Negative	Yes	[redacted]	R&D/11/1023

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.17.7 Other Toxicity Studies - Other

2.6.7.17.7.1 Other Toxicity Studies – Other – Report Title: Compatibility/ Stability of A-1591706 Free Form and A-1610308 Trihydrate in Water pH 7.4 with Material Used for Subcutaneous Infusion in Beagle Dogs (R&D/16/1419)

Concentration Foslevodopa/Foscarbidopa Tested	Infusion Rates	Result	GLP Compliant	Test Facility	Report Number
0/0 (Sterile Water for Injection, pH 7.4) and 200/50 mg/mL	0.1 and 0.25 mL/hour	The objective of this study was to assess if the test item was compatible with the dosing apparatus; no animals were dosed. **200/50 mg/mL** A-1591706/A-1610308 formulation was a clear solution and did not to adhere to the infusion syringe, catheters, subcutaneous port and swivel/connectors. Infusion materials were considered compatible with the A-1591706/A-1610308 formulation at this concentration	No	[redacted]	R&D/16/1419