TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 3
本項で使用する用語・略語 4
1. まとめ 5
2. 単回投与毒性試験 7
2.1. イヌを用いた用量漸増経口投与毒性試験 7
3. 反復投与毒性試験 7
3.1. ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験 8
3.2. ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 9
3.3. ラットを用いた 3 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 11
3.4. ラットを用いた 6 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 13
3.5. イヌを用いた用量漸増経口投与試験 17
3.6. イヌを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験 17
3.7. イヌを用いた 4 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 18
3.8. イヌを用いた 4 週間経口投与毒性試験 22
3.9. イヌを用いた 3 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 24
3.10. イヌを用いた 9 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 26
4. 遺伝毒性試験 28
4.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験 29
4.2. In vitro 染色体異常試験 30
4.3. ラット骨髄細胞を用いた小核試験 31
5. がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 31
5.1. マウスを用いた経口投与用量設定試験 32
5.2. マウスを用いた 91 日間経口投与毒性試験 33
5.3. マウスを用いた 104 週間経口投与がん原性試験 35
5.4. ラットを用いた 104 週間経口投与がん原性試験 36
6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 37
6.1. 受胎能および初期胚発生 37
6.1.1. 雄ラットの精子形成に関する 28 日間経口投与試験 37
6.1.2. ラットにおける受胎能および初期胚発生に関する試験 38

6.2. 胚・胎児発生 40
6.2.1. 妊娠ラットを用いた経口投与用量設定試験 40
6.2.2. 妊娠ラットを用いた経口投与用量設定試験（追加試験） 41
6.2.3. 妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 42
6.2.4. 妊娠ウサギを用いた経口投与用量設定試験 43
6.2.5. 妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 44
6.3. 出生前および出生後の発生に関する試験 45
6.3.1. ラットを用いた出生前・出生後の発生に関する経口投与用量設定試験 45
6.3.2. ラットを用いた出生前・出生後の発生に関する試験 46
6.4. 幼若動物を用いた試験 48
6.4.1. 幼若ラットを用いた経口投与用量設定試験 48
6.4.2. 幼若ラットを用いた 7 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験 49
7. 局所刺激性試験 50
8. その他の毒性試験 50
8.1. 不純物を用いた試験 50
8.1.1. ＊不純物B：マイクロ Ames 試験 51
8.1.2. ＊不純物B：細菌を用いる復帰突然変異試験 51
8.1.3. ＊不純物C：細菌を用いる復帰突然変異試験 52
8.2. 光毒性試験 53
8.2.1. BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたニュートラルレッド取り込み試験 53
9. 考察及び結論 53
9.1. 一般毒性 54
9.2. 遺伝毒性 56
9.3. がん原性 57
9.4. 生殖発生毒性 58
9.5. 光毒性 60
9.6. 代謝物の安全性 60
9.7. 不純物の安全性 61
10. 図表 63
11. 参考文献 63

＊新薬承認情報提供時に置き換え

LIST OF TABLES

Table 1. 分析法バリデーション試験 8
Table 2. 生体試料中薬物濃度分析法バリデーション試験 8
Table 3. 重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比 56
Table 4. S1P 受容体調節薬による血管肉腫および血管腫に対する安全域 57
Table 5. 重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比 60
Table 6. ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモド原薬の不純物 （＊不純物I, ＊不純物Jおよび＊不純物K） 62

＊新薬承認情報提供時に置き換え

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ALP	alkaline phospahatase：アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransfearase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotrasnsferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the plasma concentration-time curve from zero to 24 hours： 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
CFR	Code of Federal Regulation：連邦規則集
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DMSO	dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HED	human equivalent dose：ヒト等価用量
HPBL	human peripheral blood lymphocytes：ヒト末梢血リンパ球
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
LOEL	Lowest observed effect level：最小影響量
MCH	mean corpuscular hemoglobin：平均赤血球ヘモグロビン
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration：平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	mean corpuscular volume：平均赤血球容積
MN-PCE	micronucleus-PCE：小核を有する PCE
MTD	maximum tolerated dose：最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level：無毒性量
NOEL	no observed effect level：無影響量
NZW	New Zealand White：ニュージーランドホワイト
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
PCE	polychromatic erythrocyte：多染性赤血球
PCE:TE	polychromatic erythrocyte : total erythrocyte：総赤血球に対する PCE の比率
PLGF	placental growth factor：胎盤増殖因子
RHD	Recommended Human Dose：臨床推奨用量
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス

1. まとめ

エトラシモド（APD334，AR401959）は，中等症から重症の潰瘍性大腸炎（UC）に対する経口治療として開発中の $S1P_{1,4,5}$ に選択的な S1P 受容体調節薬である。

エトラシモドの臨床開発と承認申請のための一連の毒性試験を実施した。エトラシモドの毒性試験は，ICH M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」に従い実施され，成人および小児の中等症から重症の UC 患者に対するエトラシモド経口投与時の安全性を裏付けている。

エトラシモドの安全性を評価するために，マウス，ラットおよびイヌに単回または反復投与した探索的および重要な毒性試験，ICH S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に準拠した遺伝毒性試験（オプション 1），ICH S1C(R2)「医薬品のがん原性試験に関するガイドライン」に準拠したげっ歯類（マウスおよびラット）を用いた 104 週間のがん原性試験，ICH S5(R3)「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」に準拠した生殖発生毒性試験，ICH S11「小児用医薬品開発の非臨床安全性試験ガイドライン」に準拠した小児患者の安全性を裏付けるための幼若動物試験を実施した。その他の毒性試験として，ICH S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」に準拠した in vitro 光毒性試験，エトラシモドの原薬に含まれる不純物の DNA 反応性を評価するための細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。In vivo 試験は，臨床で用いられる 1 日 1 回経口投与で実施した。すべての毒性試験は米国で実施し，21 CFR Part 58 に記載された FDA の GLP 規則，および欧州連合（OECD GLP 原則），日本（厚生労働省），ならびにその他の OECD データ相互受入れ制度の署名国の各規制当局の規則に準拠して重要な毒性試験を実施した。エトラシモドの毒性試験の概要を M2.6.7.1 に示した。

毒性試験では，エトラシモド L-アルギニン塩として投与し，用量および濃度についてはすべて遊離酸に換算して表記した。ラットおよびイヌを用いた短期間の探索的な用量設定試験では，エトラシモド遊離酸を 0.5%メチルセルロースの懸濁液として投与した。その後に実施したより長期間の反復投与毒性試験では，エトラシモド L-アルギニンを脱イオン水に溶解して投与した。ただし，イヌの 4 週間反復投与毒性試験では，エトラシモド L-アルギニンを 20% v/v エタノール含有脱イオン水に溶解して投与した。ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する用量設定試験ならびに本試験では，エトラシモド L-アルギニンを 0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に溶解して投与した。

Sprague Dawley ラットおよびビーグル犬は，薬物動態学的特性（M2.6.4.5）および効力を裏付ける薬理試験（M2.6.2.2）に基づき，ヒトのリスク評価に適した動物種であると判断されたことから，エトラシモドの毒性試験に用いるげっ歯類および非げっ歯類としてそれぞれ選択した。マウスにおけるエトラシモドの毒性試験を，104 週間のがん原性試験の用量設定を行うために実施した。生殖発生毒性の評価では，胚・胎児発生に関する影響を評価するための非げっ歯類としてウサギを用いた。ICH S11 ガイドラインに基づき，幼若動物試験に用いる動物種として，薬理学的に適切なげっ歯類として一般毒性試験でも用いたラットを選択した。幼若ラットの試験を実施することにより，幼若動物と成熟動物におけるエトラシモドの毒性および曝露量プロファイルの比較が可能となった。

単回投与毒性試験におけるエトラシモドの MTD は，マウスでは 300 mg/kg，イヌでは 1000 mg/kg 超であった。反復投与毒性試験において，マウス，ラットおよびイヌにエトラシモ

ドを投与したところ，それぞれ 60，150 および 15 mg/kg/日までエトラシモドに関連する死亡は認められず，忍容性は良好であった。また，認められた所見の多くは毒性学的意義の乏しい所見または投与中止により回復すると考えられる所見であった。ラットに 6 ヵ月間投与したときの NOAEL は 150 mg/kg/日であり，そのときの曝露量（AUC）は雄で 1440 μg·h/mL，雌で 3180 μg·h/mL であった。また，イヌに 9 ヵ月間投与したときの NOAEL は 15 mg/kg/日であり，そのときの曝露量（AUC）は雄で 879 μg·h/mL，雌で 861 μg·h/mL であった。

マウス，ラットおよびイヌで認められた主なエトラシモドに関連する所見は，血中および主要リンパ組織ならびに二次リンパ組織におけるリンパ球数に対する影響であり，想定される薬理作用である $S1P_1$ 調節作用に基づくものであった。マウス，ラット，ウサギおよびイヌで体重（実体重，体重増加量）の抑制も認められた。いずれの動物種にも共通してみられた主要毒性標的臓器は，リンパ組織，肺および肝臓であった。さらに，イヌでは心臓が標的臓器として特定された。エトラシモドに関連した所見の多くは，毒性学的意義の乏しい変化，臨床でモニタリング可能な変化，または投与中止により回復可能な変化であった。

標準的な一連の遺伝毒性試験において，エトラシモドは変異原性および染色体の構造異常誘発性/異数性誘発性を示さなかったため，ヒトで遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

マウスにエトラシモド（0，2，6 または 20 mg/kg/日）を最長 104 週間経口投与したところ，6 mg/kg/日以上の雌雄で血管肉腫または血管腫の発現率が上昇した。これらの所見は，既存の S1P 受容体調節薬で評価したマウスで認められているクラスエフェクトであり，S1P 受容体に対する薬理作用に起因すると考えられる。一方，ラットにエトラシモド（0，2，6 または 20 mg/kg/日）を最長 91 週間（当初 104 週間の投与を予定していた）経口投与したところ，検討したいずれの用量においても発がん作用は認められなかった。

生殖発生毒性試験において，ラットの雌雄受胎能ならびに出生前および出生後の発生にエトラシモドによる影響は認められなかったが，ラットおよびウサギで胚・胎児発生毒性が認められ，そのときの母動物曝露量（AUC）は，臨床推奨用量である 2 mg/日における曝露量のそれぞれ 5 倍および 5.8 倍であった。

幼若動物の毒性試験において，ラット（生後 21 日）にエトラシモドを 7 週間投与したとき，成熟ラットで同等の用量および曝露量レベルにおいて認められた所見と比較して新たな毒性または標的臓器は認められなかった。

ヒトのマスバランス試験（APD334-107 試験）では，非臨床で安全性評価が必要となるようなエトラシモドのヒト特異的代謝物また不均衡な代謝物は認められていない。ヒトで最も多く認められた代謝物である M3 および M6 は，いずれも総放射能の 10%未満であった。

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」に基づき，原薬中の遺伝毒性不純物に関する適切な規格を設定するため，エトラシモド関連物質不純物について細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。市販用原薬ロットで検出可能な 2 つの不純物である *不純物I および *不純物J はエトラシモド原薬中に安全性確認の必要な閾値 0.15%を超えて 0.5%以下で存在していた。また，*不純物I は，ラットおよびイヌの 13 週間投与毒性試験，ラットの 26 週間投与毒性試験ならびにイヌの 39 週間投与毒性試験において，in vivo での安全性が明らかにされた。*不純物J は，ラットお

よびイヌの 4 週間毒性試験において，in vivo での安全性が明らかにされた。ICH M7（R1）ガイドラインに基づく in silico による解析により， *不純物I および *不純物J はクラス 5 の不純物に分類された。このことから，ICH Q3A(R2)ガイドラインに基づき， *不純物I および *不純物J を非変異原性不純物として管理した。

3T3 ニュートラルレッド取り込みアッセイでは，エトラシモドによる光毒性は認められなかった。したがって，エトラシモドはヒトにおいて直接的な光毒性誘発作用を有しないと考えられる。

以上，エトラシモドの一連の毒性試験結果は，中等症から重症の活動性 UC 患者の治療を目的としたエトラシモドの長期経口投与時の安全性を裏付けるものと考えられた。

2. 単回投与毒性試験

用量設定試験に単回投与期を組み入れ，マウス単回投与毒性試験（参考資料 TX[redacted]003）およびイヌ単回投与毒性試験（参考資料 TX[redacted]007）を実施した。マウス単回投与毒性試験はマウスを用いたがん原性試験のための用量設定試験として実施したため，当該試験は 5.1 項に記載する。

2.1. イヌを用いた用量漸増経口投与毒性試験

参考資料 TX[redacted]007，概要表 2.6.7.5 Table 5

ビーグル犬（雄 1 例および雌 1 例）にエトラシモド遊離酸を 0（0.5% w/v メチルセルロース），100，300 および 1000 mg/kg の用量で試験 1 日，3 日，9 日および 15 日にそれぞれ用量を漸増して単回経口投与した。なお，当該試験には反復投与試験パートも含まれる（3.5 項）。

死亡，一般状態，体重および摂餌量，ならびに血液学的検査値を評価した。エトラシモド投与動物において，投与前ならびに各投与後 1，3，6，8，12，24 および 48 時間にトキシコキネティクス（TK）解析用に血液試料を採取した。

いずれの動物も，用量漸増の単回投与期間が終了した後，継続して反復投与期間に移行した。特記すべき所見は 100 および 300 mg/kg で認められたリンパ球数および未分類細胞数の減少のみであり，これらはエトラシモドの薬理作用によるものと考えられた。

本試験において MTD は得られず，MTD は 1000 mg/kg 超と判断した。評価した最高用量である 1000 mg/kg における C_{max} は，雄で 77.8 µg/mL および雌で 123 µg/mL，AUC_{last} は雄で 2790 µg·h/mL および雌で 4160 µg·h/mL であった。

3. 反復投与毒性試験

投与液中および血漿中のエトラシモドの定量に用いる分析法および生物学的分析法について，重要な毒性試験に用いるためのフルバリデーションを実施した。バリデーションは GLP 規制に従い実施した。分析法バリデーション試験（Table 1）ならびにマウス，ラット，ウサギおよびイヌの生物学的分析法バリデーション試験（Table 2）の最終報告書を申請資料に含め，以下に示す。生体試料中薬物濃度分析法は M2.6.4.2 に記載する。

エトラシモドの毒性試験では，げっ歯類および非げっ歯類としてそれぞれラットおよびイヌを用いた。2 年間のマウスがん原性試験のための用量設定試験として，マウスを用いた 2 つの反復投与毒性試験を実施した（5.1，5.2 項）。

Table 1.　分析法バリデーション試験

報告書番号	製剤
MC[redacted]F-0035	水に溶解した遊離酸および水に溶解した L-アルギニン塩（MicroConstants）
MC[redacted]F-0026	水に溶解した遊離酸および水に溶解した L-アルギニン塩（低濃度～0.15 mg/mL，MicroConstants）
MC[redacted]F-0026	20%メタノールに溶解した遊離酸
APD334.MV.002	水に溶解した L-アルギニン塩（がん原性試験）
APD334.MV.006	0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L トリス緩衝液（出生前および出生後の発生に関する試験）

Table 2.　生体試料中薬物濃度分析法バリデーション試験

動物種	報告書番号	
マウス	APD334.MV.001	
ラット	CA16857-01	AA95243-01
ウサギ	CA16858-01	CA15809-01
イヌ	AA96474-01	AA95242-01

3.1. ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験

参考資料 TX[redacted]036，概要表 2.6.7.6 Table 6

Sprague Dawley ラットにおけるエトラシモドの毒性を評価し，GLP 適用の 4 週間反復投与毒性試験（3.2 項）の用量を選択するための試験を実施した。ラット（雌雄各 3 匹/群）にエトラシモド遊離酸を 0（0.5% w/v メチルセルロース），30，100，300 または 1000 mg/kg/日の用量で最長 14 日間反復経口投与した。死亡の有無ならびに一般状態観察，体重および摂餌量の測定，臨床病理検査および病理組織学的検査を実施しエトラシモドの毒性を評価した。

エトラシモドを 3 日間投与後，1000 mg/kg/日の雌 1 例が試験 4 日に死亡し，この用量のその他すべての雌雄を試験 6 日または試験 7 日に安楽殺した。その他のすべての投与群の動物は，予定解剖日まで生存した。

30 または 100 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する明らかな一般状態変化は認められなかった。300 mg/kg/日では散発的で軽微な粗毛および落ち着きがない状態が認められた。1000 mg/kg/日では頭部振戦および円背位がもっとも頻繁にみられ，その結果，3 日間の投与後にこれらの動物への投与を中止した。1000 mg/kg/日の雌雄で，投与初期に体重増加量抑制および摂餌量の減少がみられた。エトラシモドを投与した全例で，対照群と比較してリンパ球数および白血球数が減少したが，明らかな用量反応関係は認められなかった。

雌雄の胸腺，肝臓および腎臓に軽微から中等度の病理組織学的変化が認められた。1000 mg/kg/日の雄でのみ，脾臓のリンパ球壊死が認められた。雌雄で認められた主な病理組織学的変化は

胸腺の萎縮であった。1000 mg/kg/日の雄 2 例で重度の胸腺壊死が認められた。1000 mg/kg/日では胸腺重量が減少した。1000 mg/kg/日で急性の胸腺壊死が認められ，胸腺萎縮に先立って起きたものと考えられた。主に 1000 mg/kg/日において，肝臓および腎臓の微細な小胞形成が認められた。

全体として，ラットに 30，100 または 300 mg/kg/日のエトラシモドを 1 日 1 回 14 日間反復経口投与したときの忍容性は概ね良好であった。1000 mg/kg/日を反復投与した場合，死亡および中枢神経系の一般状態変化が認められた。1000 mg/kg/日では投与初期に摂餌量の減少に関連する体重減少（投与前値との比較）が認められたが，雄では試験 6 日頃，雌では試験 5 日頃に回復に転じた。すべての投与群で認められたリンパ球数の減少，ならびに胸腺およびその他の組織で認められた病理組織学的変化は，エトラシモドの薬理作用によるものと考えられた。

本試験では，高用量である 1000 mg/kg/日で死亡および毒性所見が認められ，中用量である 300 mg/kg/日では毒性所見が認められなかった。そのため，ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，その後のラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験（3.2 項）における高用量として 500 mg/kg/日を選択した。

3.2. ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]010，概要表 2.6.7.7 Table 7

Sprague Dawley ラットにエトラシモド L-アルギニンを 4 週間反復経口投与したときの毒性および TK プロファイル，4 週間の休薬期間後における回復性，増悪または遅発毒性を評価した。

当初，ラット（雌雄各 10 匹/群，対照群および 500 mg/kg/日では雌雄各 15 匹）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，150 および 500 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で経口投与した。500 mg/kg/日で認められた毒性および死亡（雄 15 匹中 9 例および雌 15 匹中 12 例が，試験 4～6 日に死亡発見または瀕死状態により安楽殺された）に基づき，この用量での評価を中止し，新規投与群である 350 mg/kg/日（雌雄各 15 匹）への投与を開始した。その後，350 mg/kg/日では毒性および死亡（雄 15 匹中 3 例および雌 15 匹中 5 例が試験 4 日または 5 日に死亡または瀕死状態により安楽殺された）が認められ，試験 5 日から試験 7 日まで 3 日間休薬した後に，試験 8 日に 250 mg/kg/日に減量して投与を再開したところ，それ以上の死亡は認められなかった。

死亡の有無ならびに一般状態観察，体重および摂餌量の測定，臨床病理検査および病理組織学的検査を実施し，エトラシモドの毒性を評価した。死亡あるいは瀕死状態により安楽殺した 500 mg/kg/日の毒性評価動物の組織を採取し保存したが，この群の病理組織学的検査は実施しなかった。眼科学的検査は，投与開始前ならびに投与終了時および休薬期間終了時の剖検前に実施した。

TK 評価のため，別途，雌雄各 9 匹/群にエトラシモドを投与し，対照群（雌雄各 3 匹）に対照物質である L-アルギニン塩酸塩を投与した。また，試験 1 日および試験 28 日の投与前および投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に採血し，エトラシモドの血漿中濃度を測定した（M2.6.4.3.3）。

500 mg/kg/日ではエトラシモド投与に関連した一般状態変化として，瀕死状態，衰弱，活動性低下，四肢の開脚，正向反射の異常，立毛，四肢機能の異常，振戦，皮膚の冷触感，平伏歩行，鼻口周囲の赤褐色物，浅速呼吸，肛門性器周囲の被毛の黄/褐色変色，流涙（両眼）および流涎が，試験 6 日の早期投与中止前に認められた。350/250 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する一般状態変化として，糞便減少/無便，活動性低下，衰弱，立毛，削痩，鼻/眼/口周囲の赤/黒/褐色物，肛門性器周囲の被毛の黄/褐色変色，爪先立ち歩行，円背位，平伏歩行，四肢の開脚，呼吸困難，側臥位，正向反射の消失・異常，軟便および流涎が，3 日間の休薬および試験 8 日の前に認められた。これらは試験 8 日の投与再開前までに回復し，250 mg/kg/日の残りの投与期間中または休薬期間中に投与に関連した一般状態変化は認められなかった。

25 mg/kg/日以上の雌雄では，対照群と比較してエトラシモドに関連した体重増加抑制および摂餌量の減少が認められ，350/250 mg/kg/日では毒性と考えられた。投与前（試験開始 1 日前）から試験 28 日（投与期間終了時）までの体重増加量は，溶媒対照と比較して 25，150 および 350/250 mg/kg/日の雄でそれぞれ 13%，20%および 32%，雌でそれぞれ 20%，18%および 39%低かった。休薬期間中において，対照群と比較したときの 350/250 mg/kg/日の体重増加量は，雄で 22%および雌で 21%の低値であったが，回復傾向が認められた。これらの体重増加抑制は，25 mg/kg/日以上の雌雄で認められた摂餌量の用量依存的な減少（対照群との比較）と関連していた。しかしながら，摂餌量に対する影響は，投与期間の進行に伴い緩和した。4 週間の回復期間では，350/250 mg/kg/日の雌の摂餌量は対照群と同程度であったが，350/250 mg/kg/日の雄の摂餌量は対照群よりもわずかに少なかった。

25 mg/kg/日以上の雌雄でリンパ球数が 73～77%減少し，これはエトラシモドの薬理作用として想定される変化であった。変化の程度またはその傾向を鑑み，他の血液学的パラメータで認められた変化はエトラシモドに関連するものではないと判断した。血液凝固パラメータに毒性と判断される変化は認められなかったが，主に雄を中心に全用量で軽度の APTT 延長がみられ，25 mg/kg/日および 150 mg/kg/日の雄で軽度の PT 延長が認められた（統計学的な有意差はないものの 350/250 mg/kg/日でも延長が認められた）。血液生化学検査では，25 mg/kg/日以上でコレステロールの上昇（雄で最大 2.89 倍および雌で最大 2.41 倍）が認められた。25 mg/kg/日以上では総ビリルビンが対照群と比較して有意に増加した（雄で最高 2.30 倍，雌で最高 2.90 倍）。回復期間終了時には，臨床病理パラメータへの影響はすべて消失した。

投与期間終了時の剖検時には，エトラシモドと関連した臓器重量の変化が認められた。
25 mg/kg/日以上の雄ならびに 150 mg/kg/日以上の雌では，脾臓重量の減少が認められ，病理組織学的検査で認められたリンパ球の減少と関連していた。150 mg/kg/日以上の雌雄で肝重量の増加が認められ，病理組織学的検査で認められた汎小葉性肝細胞肥大と関連していた。
350/250 mg/kg/日の雌における副腎重量の増加が認められ，病理組織学的検査で認められたびまん性の皮質肥大と関連していた。25 mg/kg/日以上の雌ならびに 150 mg/kg/日以上の雄では，関連する病理組織学的所見を伴わない肺重量の増加が認められた。25 mg/kg/日以上の雄では，関連する病理組織学的所見を伴わない前立腺重量の減少が認められた。回復期間終了時の剖検では，エトラシモドに関連した臓器重量の変化は認められなかった。

投与期間終了時の剖検所見は，350/250 mg/kg/日の雌雄各 1 例で認められた脾臓サイズの縮小のみであり，脾臓におけるリンパ球の減少と関連していた。

25 mg/kg/日以上では，投与期間終了時に用量依存的なエトラシモドに関連する病理組織学的所見（リンパ球の減少；脾臓，胸腺および腸間膜リンパ節におけるリンパ球の壊死および過形成；リンパ節および小腸における貪食細胞の大きさ・数の増加；散発的な肝細胞壊死を伴う肝細胞肥大）が認められた。350/250 mg/kg/日（雄 12 匹中 5 例および雌 12 匹中 1 例）で認められた軽微な肝細胞壊死は毒性と判断した。

リンパ球の減少は，種々のリンパ器官で認められた。一部の死亡例では，種々のリンパ器官の全リンパ球領域（全身性）で壊死性リンパ球が認められた。ストレスはリンパ球の減少および壊死の一因である可能性がある。リンパ球過形成が，腸間膜リンパ節の傍皮質，脾臓の胚中心および胸腺の髄質と，特定のリンパ領域で認められた。リンパ球過形成がエトラシモドの直接的な作用，リンパ球の減少に対する代償性反応，またはこれらの要因の組み合わせによるものか否かは不明である。

毒性所見である肝細胞壊死は，汎小葉性肝細胞肥大とともに認められ，小葉全体にわたる肝細胞の大型化を主体とする変化が軽度の肝細胞索の配列の乱れを伴っていた。より重症度の高い肝細胞肥大が認められた一部の動物では，肝細胞の単細胞壊死が散見され，核の濃縮または欠損を伴う肝細胞の好酸性化が認められた。

死亡動物では副腎におけるびまん性皮質肥大および骨髄における混合性細胞減少が認められ，ストレスまたは瀕死状態に関連する可能性が高いと判断した。

回復期間終了時の剖検では，眼科学的検査，尿検査または病理組織学的検査において，エトラシモドに関連した変化は認められなかった。

以上，エトラシモドを 25，150 または 350/250 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 28 日間まで経口投与したとき，すべての用量で薬理作用から予測される所見が認められた。350 mg/kg/日では，用量を 250 mg/kg/日に減量する前に死亡および毒性症状が認められた。25 mg/kg/日以上の雌雄で体重増加抑制および摂餌量の減少が認められたが，350/250 mg/kg/日のみ毒性変化と判断した。休薬期間終了時には，すべての所見で回復性が認められた。

350/250 mg/kg/日で死亡，毒性学的意義のある一般状態変化，体重および摂餌量への影響が認められたため，NOAEL は 150 mg/kg/日と判断した。150 mg/kg/日の試験 28 日における C_{max} は，雄で 56.2 µg/mL および雌で 83.4 µg/mL，AUC_{last} は雄で 700 µg·h/mL および雌で 1290 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 12 に示した。

本試験の所見および中用量（150 mg/kg/日）で毒性が認められなかったことに基づき，その後のラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験の高用量としては 200 mg/kg/日を選択した（3.3 項）。この用量では，投与 1 週目で体重増加抑制および摂餌量の減少がみられると予測され，ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，MTD として妥当であると考えられた。

3.3. ラットを用いた 3 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]004，概要表 2.6.7.7 Table 8

雌雄 Sprague Dawley ラットにエトラシモド L-アルギニンを 13 週間（3 ヵ月間）経口投与した後，4 週間（28 日間）の回復期間を設け，エトラシモドの毒性を評価した。ラット（雌雄各 15

匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，100 または 200 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回経口投与した。91 日間の投与期間終了後，雄雌各 5 匹/群について，回復期間後における回復性，増悪または遅発毒性を評価した。

さらに各エトラシモド投与群に雌雄各 11 匹/群，対照群に雌雄各 5 匹を追加し TK 評価に供した。試験 1 日および 90 日の投与前ならびに投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に，エトラシモドを投与した動物から採血した。

死亡の有無および一般状態観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。投与開始前ならびに投与期間終了時および休薬期間終了時の剖検前に眼科学的検査を実施した。

生存率，一般状態観察，眼科学的検査，尿検査および剖検時にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。

25 mg/kg/日以上の雌および 200 mg/kg/日の雄で，エトラシモドに関連した体重増加抑制（対照群との比較）が認められた。試験前日（投与前）から試験 91 日の投与期間全体では，25，100 および 200 mg/kg/日における体重増加率は，対照群と比較したとき雄でそれぞれ 2.9，1.1 および 13.9%低く，雌でそれぞれ 21.7，19.4 および 26.1%低かった。これらの体重増加抑制は主に投与初期に認められたが，動物の健康状態に影響せず，試験の進行とともに回復したことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。25 mg/kg/日以上の雌雄で，エトラシモドに関連した用量依存的な摂餌量の減少（対照群との比較）が認められ，体重への影響と関連していた。4 週間の回復期間中，摂餌量および体重増加量は対照群と同程度か概して対照群を上回り，エトラシモドの影響は可逆的であることが示唆された。

投与期間終了時における臨床病理検査では，25 mg/kg/日以上の雌雄でリンパ球数が 63%～82%減少し（対照群との比較），総白血球数が減少した。これらの変化は，病理組織学的検査で認められた脾臓および腸間膜リンパ節におけるリンパ球の減少と関連しており，薬理作用と符合していた。休薬期間終了時までに，これらの作用は部分的に回復したが，25 mg/kg/日以上の雌雄で 43%～63%（対照群との比較）の減少が継続して認められた。25 mg/kg/日以上の雌雄で血小板数が軽度に増加したが，休薬後までに概ね回復し，毒性学的意義の乏しい変化と判断した。さらに，25 mg/kg/日以上で好酸球数，好塩基球数および未分類細胞数の散発的かつ可逆的な減少が認められ，100 mg/kg/日以上の雌では軽度かつ可逆的な赤血球数の減少が認められた。

投与期間終了時に，100 mg/kg/日以上の雄では，APTT（対照群と比べて 18%～48%延長）および PT（対照群と比べて 10%～32%延長）が可逆的に延長した。25 mg/kg/日以上の雌雄で軽度かつ可逆的な総ビリルビンの増加（対照群と比較して 21%～157%増加）および雄で ALP の増加（対照群と比較して 31%～34%増加）が認められた。これらの変化はいずれも概して用量依存的であり，エトラシモドに関連する変化と考えられたが，休薬期間終了までに回復した。

投与期間終了時に，100 mg/kg/日以上の雌雄でクレアチニンが 20%～43%増加（対照群との比較）した。200 mg/kg/日の雌雄でクロールの増加（2%，対照群との比較）またはカルシウムの増加（5%，対照群との比較）が認められ，200 mg/kg/日の雄では尿素窒素の増加（19%，対照群との比較）が認められた。これらはエトラシモドに関連した無症状性の脱水と考えられた。さ

らに，25 mg/kg/日以上の雌雄で，グルコースおよびトリグリセリドの減少と同時にコレステロール増加が認められ，摂餌量減少に伴うエトラシモドに関連する変化と考えられた。
25 mg/kg/日以上の雌では，軽度で散発性の総蛋白またはグロブリンの減少も認められたが，これは摂餌量の減少によるものと考えられた。概して，これらの変化はいずれも休薬により回復した。

投与期間終了時における臓器重量の変化として，25 mg/kg/日以上の雌雄で脾臓重量の減少（病理組織学的所見のリンパ球減少と関連），100 mg/kg/日以上の雄ならびに 25 mg/kg/日以上の雌で肝臓重量の増加（病理組織学的所見の小葉中心性肥大と関連）が認められた。200 mg/kg/日の雌雄でエトラシモドに関連した甲状腺重量の増加が認められ（病理組織学的所見の濾胞細胞肥大と関連），200 mg/kg/日の雄で前立腺重量の減少が認められた（関連する病理組織学的所見は伴わない）。回復期間終了時の剖検では，200 mg/kg/日の雌雄で甲状腺/副甲状腺重量が増加した（雄の病理組織学的所見の濾胞細胞肥大と関連していた）。

投与期間終了時，全ての投与群の雄または雌でリンパ球の減少（脾臓および腸間膜リンパ節），リンパ球過形成（胸腺髄質），洞組織球増加（下顎リンパ節および腸間膜リンパ節），小葉中心性肝細胞肥大（肝臓）が認められ，いずれもエトラシモドに関連した変化であるものの毒性学的意義の乏しい病理組織学的変化と判断した。リンパ球過形成がエトラシモドの直接作用によるものか，リンパ球の需要/減少に対する代償性反応，またはその両方によるものかは不明である。肝臓の肥大（休薬期間終了時には認められなかった）を除き，すべての所見は投与期間終了時および休薬期間終了時に認められた。甲状腺肥大は 200 mg/kg/日の雄の回復期間終了時でのみ認められ，これはエトラシモドによる二次的変化であると考えられたが，毒性変化ではないと判断した。

25，100 または 200 mg/kg/日のエトラシモドを雌雄ラットに 13 週間（3 ヵ月間）1 日 1 回経口反復投与したときの忍容性は概して良好であった。本試験におけるエトラシモドの NOAEL は 200 mg/kg/日と判断した。200 mg/kg/日を投与したときの，試験 90 日におけるエトラシモドの C_{max} は，雄で 79.7 µg/mL および雌で 150 µg/mL であり，AUC_{last} は雄で 1010 µg·h/mL および雌で 1730 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 13 に示した。

本試験では，高用量である 200 mg/kg/日で毒性所見は認められなかった。さらに，ラットを用いた 28 日間試験の 350/250 mg/kg/日では，用量を 250 mg/kg/日に減量したところ毒性所見は認められなかった。これらの結果に基づき，その後のラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験の高用量として 250 mg/kg/日を選択した（3.4 項）。この用量では，体重増加抑制および摂餌量の減少が予測され，ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，MTD として妥当であると考えられた。

3.4. ラットを用いた 6 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]009，概要表 2.6.7.7 Table 9

雌雄 Sprague Dawley ラット（雌雄各 20 匹/群，25 または 75 mg/kg/日は雌雄各 15 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，75，150 または 250 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）を 6 ヵ月間（26 週間）反復経口投与し，投与後 4 週間の休薬期間後の回復性，増悪または遅発毒性を評価した。182 日間の投与期間終了後，対照群，150 または 250 mg/kg/日の雌雄各 5 匹/群について，28 日間の休薬期間を設けた。

死亡の有無および一般状態観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。投与開始前ならびに投与期間終了時および休薬期間終了時の剖検前に眼科学的検査を実施した。

さらに各エトラシモド投与群に雌雄各 11 匹/群，対照群に雌雄各 4 匹を追加し TK 評価に供した。試験 1 日および 182 日の投与前ならびに投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に，エトラシモドを投与した動物から採血した。

試験期間中に合計 23 例が死亡した。そのうち 16 例は主試験動物，7 例は TK 評価動物であった。250 mg/kg/日以上で，エトラシモドに関連した死亡が主試験動物の雄 20 例中 7 例および雌 20 例中 5 例ならびに TK 評価動物の雄 11 例中 4 例および雌 11 例中 3 例で認められた。なお，75 mg/kg/日の雌 1 例ならびに 150 mg/kg/日の雄 1 例および雌 2 例が死亡したが，エトラシモドと関連なしと判断した。これらの死亡のうち 3 例は投与過誤による損傷に関連した死亡であり，残りの 150 mg/kg/日の雄 1 例の死因は特定されなかった。その他の動物はいずれも予定解剖日まで生存した。死亡した 250 mg/kg/日の主試験動物では，エトラシモドに関連した一般状態変化として，瀕死状態，活動性低下，円背位，正向反射の異常・消失，時計回りまたは反時計周りの旋回，頭部傾斜，運動失調，常同運動，寄りかかり，振戦，口/鼻/眼周囲の黒/赤色物，眼球突出（両眼），部分的または完全な閉眼（両眼），流涙（両眼），鼻口部の茶色の分泌物，流涎，浅呼吸/遅い呼吸/呼吸困難，削痩，糞便減少/無便，皮膚の冷感（全身），皮膚蒼白（全身），被毛の湿潤または変色（肛門性器周囲），立毛および被毛の汚れが認められた。

25 および 75 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する一般状態変化は認められなかった。150 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する一般状態変化として流涎が少数例（雄数例および雌 1 例）で認められた。250 mg/kg/日の雌雄の生存例では，削痩，円背位，糞便減少/無便，鼻/眼周囲の赤/黒/褐色物および流涎が認められた。

75 mg/kg/日以上の雌雄では，主に体重増加抑制が認められた。75，150 および 250 mg/kg/日の試験−1 日（投与前）から試験 182 日までの投与期間全体における体重増加量は，対照群と比較して雄でそれぞれ 11.4%，18.9%および 27.9%，雌でそれぞれ 16.0%，16.0%および 21.4%低値であった。75 および 150 mg/kg/日における体重増加抑制は，動物の健康状態に影響することはなく（主に投与期間早期に発現），回復性が認められたことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。250 mg/kg/日の体重増加抑制は，死亡および一般状態変化ならびに栄養状態を維持するために獣医師による介入処置（食用ゲルなど栄養補助食品）が必要となったことから，毒性変化と判断した。これらの体重増加抑制は摂餌量の顕著な減少と関連しており，摂餌量は 75 および 150 mg/kg/日では第 1 週，250 mg/kg/日では第 3 週に顕著に減少した。休薬期間中，エトラシモド投与終了に伴い摂餌量減少および体重増加抑制は回復した。しかしながら，150 mg/kg/日と比較して 250 mg/kg/日では回復の程度は低く，また雄と比較して雌の回復の程度は低かった。

眼科学的検査，尿検査および剖検において，エトラシモドに関連した影響は認められなかった。

対照群と比較して臨床病理検査値の変化が認められ，エトラシモドに関連する変化と考えられた。投与期間終了時に，エトラシモドに関連する主な血液学的所見として，25 mg/kg/日以上の

雌雄でリンパ球数の用量依存的な減少（対照群と比較して最大 78%減少）に伴う総白血球数の減少（対照群と比較して最大 70%減少）が認められた。これらの所見は，病理組織学的検査で認められたリンパ節および脾臓のリンパ球減少と関連していた。25 mg/kg/日以上では，エトラシモドに関連した軽度の単球数，好酸球数，好塩基球数または大型非分類細胞数（その他の細胞）の減少も認められ，総白血球数の減少の一因となっていたが，関連する病理組織学的所見は認められなかった。休薬期間終了時には，150 mg/kg/日以上で，総白血球数（対照群と比較して最大 50%減少）およびリンパ球数（対照群と比較して最大 61%減少）のいずれも回復性が認められたが，対照群と比較して減少傾向にあった。投与期間終了時に，150 mg/kg/日以上の雌雄で用量依存的な血小板数の増加（対照群と比較して最大 37%増加）が認められた。これらの変化は，エトラシモドに関連する変化と考えられたが，雌雄いずれも休薬期間終了時までに概して回復した。投与期間終了時に，75 mg/kg/日以上の雌で概して用量依存的に赤血球数が減少（対照群と比較して最大 12%減少）した。150 mg/kg/日以上の雌では，MCV，MCH および MCHC が軽度に減少した。これらの変化は，エトラシモドに関連する変化と考えられたが，休薬後には概して回復し，関連する病理組織学的所見は認められなかった。

凝固検査では，投与期間終了時に，150 mg/kg/日以上の雄で APTT 延長（対照群と比較して最大 2.3 倍）ならびに 75 mg/kg/日以上の雄で PT 延長（対照群と比較して最大 2.1 倍）が認められたが，関連する病理組織学的変化は認められず，休薬期間終了時までに概して回復した。250 mg/kg/日における凝固時間の延長は，その変化の程度からさらなる損傷に対応するための凝固反応として不十分と考えられ，毒性変化と判断した。

25 mg/kg/日以上の雌雄で，休薬時にエトラシモドに関連した血液生化学的パラメータの変化が認められたが，休薬後には概して回復した。投与に関連して総ビリルビンが最大 4.7 倍増加（対照群との比較）したが，関連する明確な病理組織学的所見は認められなかった。25 mg/kg/日以上の雌雄で無症状性の脱水が認められ，クレアチニン（最大 93%上昇：対照群との比較），尿素窒素（最大 34%上昇：対照群との比較）またはクロール（2%上昇：対照群との比較）が増加した。これらの変化に関連する病理組織学的所見は認められなかったが，用量依存性が示唆された。250 mg/kg/日の雄では ALT が 2.1 倍増加（対照群との比較）し，肝細胞壊死と相関していた。250 mg/kg/日の雌雄で，総蛋白（最大 6%低下：対照群との比較），アルブミン（最大 7%低下：対照群との比較）およびグロブリン（最大 7%低下：対照群との比較）の減少が認められた。また，25 mg/kg/日以上の雄でトリグリセリド減少（最大 53%低下：対照群との比較），150 mg/kg/日以上の雄および 75 mg/kg/日以上の雌でグルコース減少（最大 38%低下：対照群との比較），75 mg/kg/日の雌雄でコレステロール増加（最大 2.4 倍上昇：対照群との比較）が認められた。これらの所見はエトラシモドと関連しており，体重増加抑制，摂餌量の減少および代謝の変化に伴う二次的変化であり，雌雄ともに休薬期間終了時までに概ね回復した。

投与期間終了時の臓器重量変化として，75 mg/kg/日以上の雄および 150 mg/kg/日以上の雌で肝臓重量の増加（病理組織学的所見の肝細胞肥大と関連）ならびに 25 mg/kg/日以上の雌雄で脾臓重量の減少（病理組織学的所見のリンパ球減少と関連）が認められた。さらに，150 または 250 mg/kg/日の雌雄で甲状腺/副甲状腺重量の増加（病理組織学的検査の甲状腺濾胞細胞肥大と関連），25 mg/kg/日以上の雌で肺重量の増加（用量依存性または関連する病理組織学的所見を伴わない）が認められ，150 mg/kg/日以上の雄で前立腺重量の減少（関連する病理組織学的所見を伴わない）が認められた。回復期間終了時の剖検では，エトラシモドに関連した臓器重量変

化が持続し，150 mg/kg/日の雄および 250 mg/kg/日の雌雄で脾臓重量の減少（関連する病理組織学的所見を伴わない），150 mg/kg/日以上の雌雄で甲状腺または副甲状腺重量の増加（病理組織学的検査の甲状腺濾胞細胞肥大と関連），250 mg/kg/日の雌で肺重量の増加（関連する病理組織学的所見を伴わない），ならびに 150 mg/kg/日以上の雄で前立腺重量の減少（関連する病理組織学的所見を伴わない）が認められた。

投与期間終了時の病理組織学的検査では，リンパ球減少（脾臓辺縁帯および腸間膜リンパ節の傍皮質リンパ球），リンパ球または形質細胞の過形成（胸腺および腸間膜リンパ節の髄質），腸間膜リンパ節の洞組織球増加および洞赤血球増加/赤血球貪食ならびに小葉中心性肝細胞肥大（ときに肝細胞壊死を伴う）が認められた。

すべてのエトラシモド投与群で肝肥大の発現頻度および重症度が上昇した。肝肥大は，主に小葉中心性肝細胞肥大を特徴とし，細顆粒状で好酸性の細胞質の増加および肝細胞索の配列の乱れがみられた。250 mg/kg/日の一部の雄で肝臓の単細胞壊死（血清 ALT の軽度な増加に関連する可能性がある）および肝細胞肥大に関連した多核肝細胞数の増加が認められた。25 mg/kg/日以上の数例（雄または雌）に変異細胞巣が認められ，肝細胞肥大と関連する可能性が考えられた。25 mg/kg/日以上の雌雄で胆管過形成の発現頻度および重症度が上昇した。250 mg/kg/日の雄の数例で Kupffer 細胞の色素沈着または肥大/過形成の増加が認められた。150 mg/kg/日以下でみられた病理組織学的所見はエトラシモドと関連するものと考えられたが，適応性変化であり，毒性変化ではないと考えられた。

75 mg/kg/日以上の雌雄で甲状腺濾胞細胞肥大の発現率および重症度が上昇した。甲状腺の腺肥大では，濾胞細胞の肥大，濾胞細胞の空胞化の増加およびコロイドの減少/変性がみられた。機能的な肝細胞塊の増大がサイロキシン代謝の変化および下垂体からの甲状腺刺激ホルモン放出を介して甲状腺細胞の増殖を誘発する可能性があることから，甲状腺濾胞細胞肥大は肝の肥大に関連する変化と考えられた。この変化は，エトラシモドに関連した二次的変化と考えられたが，毒性変化ではないと判断した。

皮質束状層を主体とする副腎の肥大（局所性またはびまん性で両側性）が 75 mg/kg/日以上の雌の数例および 150 mg/kg/日の雄 1 例で認められた。皮質細胞の肥大は，皮質細胞の細胞質肥大および配列の乱れによる副腎容積の増加を特徴としていた。副腎皮質の肥大は，体重増加抑制からも明らかなようにストレスに起因する可能性が高い。25 mg/kg/日以上で，様々なリンパ組織の特定の領域におけるリンパ球数の増加または減少が認められた。脾臓の辺縁帯および腸間膜リンパ節の傍皮質領域でリンパ球の減少が認められた。脾臓および腸間膜リンパ節におけるリンパ球数の減少は，雌雄ともに血中リンパ球数の減少と関連していた。また，胸腺および腸間膜リンパ節の髄質では，リンパ球または形質細胞の増加（過形成）が認められ，75 mg/kg/日の雌 1 例では胸腺の軽度な異型過形成が認められた。その他，エトラシモド投与群のリンパ組織で認められた病理組織学的所見として，腸間膜リンパ節における洞赤血球増加/赤血球貪食および組織球増加の発現頻度および重症度増加，ならびに雌で胸腺の上皮細胞過形成が認められた。これらの変化はエトラシモドに関連するものであったが，毒性変化ではないと判断した。

投与期間終了時に雌雄で認められた病理組織学的所見は，4 週間の休薬期間後に回復（リンパ節，脾臓および副腎）または回復傾向（肝臓，甲状腺および胸腺）がみられた。

本試験では，ラットにエトラシモドを 25，75 または 150 mg/kg/日の用量で 26 週間 1 日 1 回反復経口投与したところ，概して忍容性は良好であり，150 mg/kg/日まで薬理作用から予測される変化が認められた。250 mg/kg/日では，重篤な毒性所見（死亡，一般状態変化，凝固時間の延長など）が認められた。すべての用量で体重増加抑制および摂餌量の減少が認められたが，150 mg/kg/日以下で認められた変化については毒性ではないと判断した。これらの所見について，休薬後に回復性が認められた。このことから，本試験の NOAEL は 150 mg/kg/日と判断した。NOAEL における試験 182 日の C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 113 および 201 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 1440 および 3180 µg·hr/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 14 に示した。

本試験結果から，ラットを用いた 104 週間投与がん原性試験（5.4 項）の高用量として，ICH S1C(R2)ガイドラインに基づき，MTD と考えられる 20 mg/kg/日を選択した。高用量である 20 mg/kg/日では，未変化体および代謝物 M3 のラットの曝露量はヒト血漿中 AUC の 25 倍を超えると予想される。

3.5. イヌを用いた用量漸増経口投与試験

参考資料 TX[redacted]007，概要表 2.6.7.6 Table 6

ビーグル犬（雌雄各 1 匹）を用いて用量漸増経口投与毒性試験を実施した。本試験の単回投与パートについては試験 15 日まで実施し，2.1 項に記載した。本試験の反復投与パートでは，エトラシモド遊離酸を 300 mg/kg/日（0.5% w/v メチルセルロースに懸濁）の用量で試験 21 日から 1 日 1 回 3 日間反復経口投与した。

動物の死亡，一般状態ならびに体重および摂餌量を評価した。TK 評価のため，すべてのエトラシモド投与動物から，試験 21 日（投与後 6 時間），22 日（投与前，投与後 1，3，6，8 および 12 時間）および試験 23 日（投与前，投与後 1，3，6，8，12，24 および 48 時間）に採血した。

300 mg/kg/日の用量で 3 日間経口投与した後の生存率，一般状態，体重および摂餌量にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。反復投与最終日（試験 23 日）の C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 94.7 および 126 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 3280 および 4350 µg·hr/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 16 に示した。

3.6. イヌを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験

参考資料 TX[redacted]008，概要表 2.6.7.6 Table 6

ビーグル犬（雌雄 2 匹/群）にエトラシモド遊離酸を 0（0.5% w/v メチルセルロース），30 または 300 mg/kg/日を 7 日間反復経口投与したときの毒性および TK を評価した。

一般状態観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。TK 評価のため，試験 1 日および試験 7 日の投与前，1，3，6，8，12，24 および 48 時間（試験 1 日のみ）に，すべてのエトラシモド投与動物から採血した。

30 または 300 mg/kg/日のエトラシモドを 1 日 1 回 7 日間経口したところ，おおむね良好な忍容性が認められた。全例が投与期間終了時の剖検まで生存した。一般状態，摂餌量または体重に，エトラシモドに関連する顕著な変化は雌雄いずれにおいても認められなかった。エトラシ

モドに関連した変化と考えられる嘔吐，水様便，体重減少（投与前値との比較）および摂餌量の減少が認められたが，これらの所見は散発的であり，必ずしも用量依存的ではなく，投与群の大半では認められなかった。しかしながら，発現頻度は対照群よりもエトラシモド群の方が高かった。試験期間が短く，1 群あたりの動物数が少なかったため，エトラシモドによる重要な影響を明らかにすることは出来なかった。

エトラシモドに関連したアルブミンおよび総蛋白の減少が雌雄ともに試験 7 日に認められたが，これらは毒性変化ではないと判断した。すべてのエトラシモド投与群で，試験 2，4 および 7 日にリンパ球数，好酸球数，好塩基球数および未分類細胞数の減少が認められ，試験 4 および 7 日に好中球数，単球数および総白血球数の減少が認められた。300 mg/kg/日の雌雄で投与 7 日にビリルビン値の上昇が認められたが，溶血または肝機能障害の徴候はみられなかったため，エトラシモド投与との関連性は不明であった。300 mg/kg/日の雄イヌ 1 例で尿糖およびケトン体の増加が認められたが，その原因およびエトラシモドとの関連性は不明であった。

剖検では，いずれの投与群においても，雌雄の臓器重量，臓器重量比および病理組織学的所見に明らかな変化は認められなかった。

以上，雌雄ビーグル犬にエトラシモドを 1 日 1 回 7 日間経口投与したとき，忍容性は概ね良好であった。エトラシモドの曝露量は，試験 1 日および試験 7 日に用量増加に伴い増加したが，用量比例性は認められなかった。雌雄ともに 300 mg/kg/日の試験 7 日に最高曝露量が得られ，そのときの C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 229 および 181 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 4405 および 3770 µg·hr/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 17 に示した。

本試験の 7 日間反復投与パートで認められた所見および最大 1000 mg/kg を単回投与した用量漸増パートで概して忍容性が認められたことから，イヌを用いた 4 週間投与毒性試験の高用量として最初に 1000 mg/kg/日を選択した（3.7 項）。これは ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，MTD として妥当であると考えられた。

3.7. イヌを用いた 4 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]008，概要表 2.6.7.7 Table 10

ビーグル犬にエトラシモド L-アルギニンを 20，100，500 または 1000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 4 週間（28 日間）反復経口投与したときのエトラシモドの毒性および TK プロファイルを評価した。また本試験では，4 週間の休薬期間後に認められた変化により，進行性，遅発性の毒性および可逆性を評価した。当初，雄雌各 4 匹（100 mg/kg/日）または雌雄各 6 匹/群（500 および 1000 mg/kg/日）に，エトラシモド L-アルギニン（脱イオン水に溶解）を投与した。さらに雌雄各 5 匹に，溶媒対照として L-アルギニン塩酸塩を溶解した脱イオン水を投与した。500 および 1000 mg/kg/日で毒性が認められたことから，これらの群では試験 7 日から 8 日まで休薬し，さらに各群 1 匹でより重度の毒性が認められたため，試験 6 から試験 8 日まで休薬した。試験 9 日に投与量をそれぞれ 200 および 300 mg/kg/日に減量し，投与を再開した。100，500/200 および 1000/300 mg/kg/日では引き続き毒性が認められたため，試験 14 日より投与を中止し，1 週間の回復期間を設けた。代替として，40 および 80 mg/kg/日の 2 群（雌雄各 6 匹/群）を追加し

た。4 週間の反復投与後，0（溶媒対照），40 および 80 mg/kg/日の雌雄各 2 匹について 4 週間の休薬期間を設けた。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。試験 22 日に 100，500/200 および 1000/300 mg/kg/日（投与中止群）を安楽殺し，それ以上の評価は行わなかった。投与前および各予定剖検前に眼科学的検査を実施した。試験前，投与前，試験 1 日の投与後 1～2 時間ならびに投与期間終了時および休薬期間終了時の剖検前に，心電図測定を実施した。TK 評価のため，試験 1 日および試験 28 日（80 mg/kg/日以下のみ）の投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間にすべてのエトラシモド投与動物から採血した。

試験 10 日に，投与時の偶発的な損傷により 80 mg/kg/日の雄 1 例を安楽殺した。80 mg/kg/日以下の他の動物は予定した投与期間終了時または休薬期間終了時まで生存した。100，500/200 および 1000/300 mg/kg/日では，一般状態の悪化および食欲不振により投与 14 日以降の投与を中止し，その後 1 週間の休薬期間を設け，投与 22 日に剖検した。試験 14 日に，一般状態の悪化により 500/200 mg/kg/日の雄 1 例を安楽殺した。

20 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する明らかな一般状態変化は認められなかった。まれに散発的な便の変化（軟便，粘液便，水様便または緑色の変色）ならびにまれに流涙，流涎および嘔吐（2 例のみ，2 匹で 1 回ずつ）が認められたが，20 mg/kg/日で認められたこれらの所見のいずれも毒性変化ではないと考えられた。40 および 80 mg/kg/日の雌雄では，エトラシモドに関連した明らかな変化が認められ，主に，嘔吐，流涎，変色便，ケージ底/床敷の赤色物質，削痩，皮膚弾性消失，糞便異常（粘液便，軟便，水様便）の発現頻度の増加および流涙を特徴としていた。80 mg/kg/日において，数例で活動性低下および 1 例で振戦（1 回のみ）が認められた。40 および 80 mg/kg/日の 4 週間の休薬期間中に回復性が認められ，一部の雌では流涙のみが休薬期間終了時まで持続したが，これは対照群の回復期の雌でも同様に認められた。投与中止した投与群では上記と同様の所見がみられたが，用量依存的に重症度が増加した。その他の所見として，500/200 mg/kg/日または 1000/300 mg/kg/日で衰弱，皮膚の冷触感，被毛の汚れ，円背位，運動失調，歯肉または皮膚の蒼白，排便困難，食欲不振などが認められた。獣医師による診察，モニタリングおよび状態改善のための処置（休薬，最高用量の減量および食欲増進のための補助的な缶詰の提供など）では，明らかな状態改善あるいは体重減少または摂餌量減少の回復はみられず，試験 14 日に投与を中止し，試験 22 日に安楽殺した。

いずれの用量においても，眼科学的検査または心電図検査に明らかな影響は認められなかった。

試験初期にエトラシモドに関連した用量依存的な体重減少（投与前値との比較）が 40 および 80 mg/kg/日の雌雄で認められ，その後の投与期間中にある程度回復した。試験−1 日と比較して，体重減少のピークは 40 mg/kg/日では試験 14 日までに雌雄で 4%，80 mg/kg/日では試験 21 日までに雄で 16%および試験 14 日までに雌で 12%であった。試験 21 日または試験 28 までに体重は増加したが，試験−1 日～試験 28 日の投与期間全体では投与前値と比較して体重減少が認められた（雄では対照群で 0.680 kg 増加したのに対し，40 mg/kg/日および 80 mg/kg/日でそれぞれ 0.225 および 0.983 kg の減少，雌では対照群で 0.360 kg 増加したのに対し，40 mg/kg/日および 80 mg/kg/日でそれぞれ 0.110 および 0.592 kg の減少であった）。一方，20 mg/kg/日の雄および

雌の投与期間中の体重増加量は，それぞれ 0.238 および 0.225 kg であった。しかしながら，40 および 80 mg/kg/日における 4 週間の回復期間中の体重増加量は対照群を上回っており，回復性が認められた。これらの摂餌量減少を伴う体重変化は，4 週間の休薬期間中に回復した。100 mg/kg/日以上における摂餌量減少を伴う体重減少は，試験 14 日に投与中止した後，試験 21 日までに部分的に回復した。

投与期間終了時（試験 29 日）における血液学的パラメータの変化は，20 mg/kg/日以上の雌雄におけるリンパ球数の顕著な減少（対照群との比較）に限定されていたが，エトラシモドは胸腺およびリンパ節からのリンパ球移出を阻害し，血中のリンパ球数を減少させることから，薬理作用に関連した変化と考えられた。好中球数を除く総白血球数についても，投与期間終了時に対照群と比べて低値の傾向がみられたが，変化の程度は軽微であった。休薬期間終了時においても，40 および 80 mg/kg/日においてリンパ球数の中等度の減少（対照群との比較）がみられた。試験 15 日に，投与中止した高用量群で血液学的パラメータの変化（試験 29 日の低用量群の変化と同程度）が認められた。いずれの時点においても，リンパ球数は，他の白血球系細胞数（好中球数を除く）と同様に中等度から重度に減少（対照群との比較）した。これらの白血球数の変化について，試験経過に伴う明らかな増悪はみられなかった。雌雄の好中球数は測定時点で変動し，個体ごとに散発的な増加または減少が認められた。好中球数の変化については，一貫性が認められなかったことから偶発的なものと考えられ，他の白血球数，特にリンパ球数の減少に続発したものと考えられた。

40 mg/kg/日以上（投与期間終了時）または 100 mg/kg/日以上（早期投与中止時）に，赤血球パラメータの変化が雌雄で認められた。40 および 80 mg/kg/日では，投与期間終了時に対照群と比較して軽度から中等度の用量依存的な赤血球数，ヘモグロビンおよびヘマトクリットの減少が認められたが，網状赤血球数の増加を伴わなかったことから，回復性のない変化と考えられた。回復期間終了時においても，対照群と比べて赤血球パラメータは低値を示したが，概して背景値の範囲内であった。投与中止した高用量群では，対照群と比べて赤血球パラメータの低値傾向（特にヘマトクリットで一貫した低値）が認められ，毒性変化と判断した。赤血球パラメータの減少は赤血球産生抑制による網状赤血球数の減少を伴っていた。

血液凝固検査において毒性変化は認められなかった。投与期間終了時（100 mg/kg/日以上では試験 15 日）に，20 mg/kg/日以上で APTT の軽微な延長傾向が認められた。回復期間終了時には，エトラシモド投与群と対照群との間に顕著な差は認められなかった。

血液生化学検査では，投与期間終了時（試験 29 日）に 20 mg/kg/日で認められた毒性変化は，総蛋白，アルブミンおよびグロブリンの減少（対照群との比較）であった（40 および 80 mg/kg/日でも同様）。投与期間終了時，20，40 および 80 mg/kg/日の雌雄でアルブミンの用量依存的な減少が認められた。総蛋白およびグロブリンの減少もみられたが，アルブミンのような明らかな用量依存性は認められなかった。投与期間終了時に尿蛋白の著しい増加は認められなかったことから，総蛋白の減少は蛋白漏出性腸症に起因する可能性が高いと考えられた。カルシウムの用量依存的な減少が認められたが，これはアルブミン減少に伴う二次的変化と考えられた。40 mg/kg/日以上の雌雄では，投与期間終了時または早期中止時にクロールおよび総ビリルビンの変化が認められた。80 mg/kg/日以下の雌雄では，クロールの概して用量依存的な増加が認められた。また，80 mg/kg/日以下の雌雄では，総ビリルビンが用量依存的に増加した。総ビリルビンの増加は，一般的に赤血球の寿命短縮（溶血）または肝胆道系の損傷に起因すると考えら

れているが，これらの機序を裏付ける他の臨床病理所見は認められなかった。まれに，ビリルビンの取り込みおよび排泄の直接阻害が認められることがある。80 mg/kg/日以下の雄では，投与期間終了時にトリグリセリドの減少が認められた。その他にも，雌雄で主に肝酵素を含む複数のパラメータに統計的有意な変化が認められたが，変化の方向性またはその程度から，毒性学的意義に乏しい変化と判断した。これらの変化はいずれも休薬後に回復した。試験 22 日に投与を中止した高用量群（100 mg/kg/日以上）において，試験 15 日の変化の程度は低用量群の投与期間終了時と同程度であった。また，試験 15 日までに総蛋白，アルブミンおよびグロブリンの減少が認められたが，試験 22 日までに明らかな増悪は認められなかった。試験 15 日に顕著なクロールの上昇がみられたが，試験 22 日までには回復傾向が認められた。いずれの測定時点においても顕著なカルシウム減少がみられ，アルブミン減少と関連していた。試験 15 日にすべての高用量群で総ビリルビンの中等度の増加が認められたが，試験 22 日までに回復傾向が認められた。これらの高用量群の雌雄では，試験 15 日に尿素窒素またはクレアチニンが軽度に増加し，試験 22 日までに軽度に減少した。これは脱水状態に続発した糸球体濾過量の低下に起因するものと考えられた。

投与期間終了時に，低用量群で尿検査パラメータの明らかな変化は認められなかった。試験前および回復期間終了時と比較して，投与期間終了時に尿潜血の発現頻度および程度の増加傾向が認められたが，尿中に糞便が混入した可能性が考えられた。

肺重量（絶対重量ならびに体重および脳重量に対する相対重量）について，対照群と比較して，20 および 40 mg/kg/日の雌雄で顕著な増加および 80 mg/kg/日の雌で増加がみられ，浮腫または肺胞組織球症と関連していた。数例では，胸腺重量が軽度に増加（対照群との比較）したが，これは病理組織学的検査で認められた浮腫と関連していた。回復期間終了時の雌雄では，エトラシモドに関連した臓器重量変化は認められなかった。

病理組織学的検査では，投与期間終了時に雌雄で気管/気管支のリンパ節および胸腺にエトラシモドに関連した剖検所見が認められた。20，40，80mg/kg/日の雄ならびに 20 および 40mg/kg/日の雌で，気管/気管支のリンパ節の肥大または赤色変化が認められた。これらの所見は，病理組織学的検査で認められた洞赤血球増加および赤血球貪食と関連していた。20 および 40 mg/kg/日の雌雄の胸腺で浮腫が認められた。休薬期間終了後の雌雄に剖検所見は認められなかった。

20，40 および 80 mg/kg/日の雌雄で，エトラシモドに関連した毒性学的意義の乏しい病理学的所見が肺，胸腺，気管/気管支リンパ節および腸間膜リンパ節に認められた。20 mg/kg/日および 80 mg/kg/日の雄ならびに 40 mg/kg/日の雌で，肺胞腔内の微細でまばらな好酸性糸状物質を伴う用量に依存しない肺浮腫が認められたが，回復期間終了時には認められず，一過性の変化と考えられた。さらに，20，40 および 80 mg/kg/日の雌雄ならびに休薬期間終了時の 40 mg/kg/日の雌雄では，肺胞腔内に，空胞化または好酸性の細胞質を伴うマクロファージの小さな凝集体が不規則に認められ，肺胞組織球症と判断した。さらに，20 および 40 mg/kg/日の雌雄および 80 mg/kg/日の雌で小葉間および小葉間の結合組織に広がる薄い好酸性の非定型物質を特徴とする胸腺の浮腫が認められたが，回復期間終了時には胸腺の浮腫は認められなかったことから，一過性の変化と考えられた。

投与期間終了時にはすべての投与群および対照群の腸間膜リンパ節に洞赤血球増加/赤血球貪食が認められたが，発現頻度は雌雄ともに用量依存的に増加した。この所見は，回復期間終了時

には 40 mg/kg/日の雄 1 匹のみで認められた。また，投与期間終了時および回復期間終了時にはすべてのエトラシモド投与動物の気管/気管支リンパ節で洞赤血球増加/赤血球貪食が認められた。潜在的な標的臓器の決定前に対照群の剖検を実施したため，対照群のこれらのリンパ節は保存されておらず，対照群の病理組織学的検査を行うことができなかった。リンパ液中の赤血球はエトラシモドに関連すると考えられるが，赤血球の供給源は特定できなかった。

以上，雌雄イヌにエトラシモドを 20，40 または 80 mg/kg の用量で 1 日 1 回 28 日間反復経口投与したとき，薬理作用に起因する臨床病理学的変化および毒性学的意義の乏しい病理組織学的変化が認められた。40 mg/kg/日以上で，毒性と考えられる一般状態変化，体重減少および摂餌量減少が認められ，20 mg/kg/日以上で毒性と考えられる血液生化学的変化が認められた。休薬期間終了時には，すべての所見に回復性が認められた。

試験 1 日および試験 28 日におけるエトラシモドの C_{max} および AUC_{last} は，用量増加に伴い増加し，概して用量比を下回っていた。低用量である 20 mg/kg/日で総蛋白，アルブミンおよびグロブリンの低下が認められ毒性と判断したことから，本試験の NOAEL は 20 mg/kg/日未満と考えられた。20 mg/kg/日を 28 日間投与したときの C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 48.8 および 47.1 µg/mL，AUC_{last} はそれぞれ 925 および 910 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 19 に示した。

この試験では，生化学検査において低用量で毒性変化が認められたことから NOAEL は得られなかった。そのため，この後イヌにエトラシモドを 0.02，0.2 および 2 mg/kg/日の用量で 4 週間反復投与する毒性試験を実施し（3.8 項），イヌにおけるエトラシモドの NOAEL または無作用量を評価した。

3.8. イヌを用いた 4 週間経口投与毒性試験

報告書番号 TX[redacted]007，概要表 2.6.7.7 Table 11

ビーグル犬（雌雄各 3 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：20% v/v エタノールを含む脱イオン水），0.02，0.2 または 2.0 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 4 週間（28 日間）反復経口投与したときの毒性および TK プロファイルを評価した。

すべての動物について，死亡および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。試験前および投与期間終了時の剖検前に眼科学的検査を実施した。心電図検査は，試験前，試験 1 日の投与前および投与後 1～2 時間ならびに投与最終週に実施した。TK 評価のため，すべてのエトラシモド投与動物から，試験 1 日および試験 28 日の投与前ならびに投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に採血した。

いずれのエトラシモド投与群の雌雄においても，死亡ならびに体重，摂餌量，心電図，眼科学的検査および尿検査にエトラシモドによる明らかな影響は認められず，血液凝固検査および血液生化学検査のいずれにおいても毒性変化は認められなかった。

エトラシモドに関連した散発的な一般状態変化が認められ，嘔吐，流涎，活動性低下，両耳の冷感および歯肉の蒼白が認められた。

臨床病理検査では，0.02 mg/kg/日の雄では統計学的に有意なリンパ球数の減少（対照群との比較）が認められたが，減少の程度は予測の範囲内であった。0.2 および 2.0 mg/kg/日の雌雄でリンパ球数の顕著な減少がみられたが，エトラシモドの既知の作用機序に起因する変化と考えられ，試験中の健康状態および一般状態への影響は認められなかった。エトラシモド投与動物で好塩基球数の散発的な減少（対照群との比較）が認められたが，特異的な影響は伴わなかった。

0.2 mg/kg/日以上の雌雄において，エトラシモドに関連した肺重量の増加（絶対重量ならびに体重および脳重量に対する相対重量）が認められた。これは，病理組織学的検査で認められたエトラシモドに関連する肺の肺胞組織球症と関連していた。

エトラシモドに関連した剖検所見として，0.2 mg/kg/日の雄 1 例および 2.0 mg/kg/日の雌 1 例で気管/気管支リンパ節における軽度の赤色化，0.2 mg/kg/日雄 1 例で肺における中等度の黄褐色化が認められた。これらの所見は，それぞれ病理組織学的検査で認められた気管/気管支リンパ節の洞赤血球増加/赤血球貪食および肺の肺胞組織球症と関連していた。

病理組織学的変化として，2.0 mg/kg/日の雄 3 例および雌 1 例で肺の線維化，0.2 mg/kg/日以上の雌雄で肺の肺胞組織球症，0.2 mg/kg/日以上の雄および 0.02 mg/kg/日以上の雌で気管/気管支リンパ節の洞赤血球増加/赤血球貪食が認められた。肺の線維化の主な特徴は，コラーゲン増加による胸膜の軽微から軽度の肥厚であった。肺胞組織球症は，個々の肺胞腔内のマクロファージの凝集体を特徴としていた。この施設では一般的なイヌの背景所見として肺胞組織球症が認められるが，0.2 mg/kg/日以上の雌雄で認められた変化の程度は，本試験の対照群および他の試験の対照群で一般的に認められる変化の程度を上回っていた。リンパ節における洞赤血球増加/赤血球貪食は，貪食作用による洞内またはマクロファージ内の遊離赤血球を特徴としていた。この変化は検査したリンパ節の大部分では軽微であったが，0.2 mg/kg/日以上の雄および 0.02 mg/kg/日以上の雌では，気管/気管支リンパ節における軽度の洞赤血球増加/赤血球貪食が認められた。気管/気管支リンパ節の洞赤血球数の増加の原因は特定できなかった。

イヌにエトラシモドを 0.02，0.2 または 2.0 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 28 日間経口投与したとき，概して良好な忍容性を示した。軽度の一般状態変化が認められたほか，薬理作用から想定される血液学的変化が認められた。さらに，一部の高用量 2.0 mg/kg/日で認められた軽微から軽度の肺の線維化を除き，本試験でも TX[redacted]008 試験（3.7 項）の 20，40 および 80 mg/kg/日で認められた肺および気管/気管支リンパ節の病理組織学的所見が認められた。この特異的な変化の原因は不明であったが，より高い用量を投与した場合（報告書番号 TX[redacted]008）では認められず，本試験の動物の健康状態に影響を及ぼさなかった。

以上のことから，本試験の NOAEL は高用量の 2.0 mg/kg/日と判断した。試験 28 日における C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 5.84 および 5.31 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 112 および 104 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 18 に示した。

イヌを用いた最初の 4 週間投与毒性試験の結果（NOAEL：20 mg/kg/日未満）と併せ，その後のイヌを用いた 3 ヵ月間投与毒性試験の高用量として 15 mg/kg/日を選択した（3.9 項）。これは ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，MTD として妥当であると考えられた。

3.9. イヌを用いた 3 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]005，概要表 2.6.7.7 Table 12

ビーグル犬（雌雄 6 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），1，5 または 15 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回 3 ヵ月間（91 日間）経口投与したときの毒性を評価し，投与後 4 週間（28 日間）の休薬期間を設け，回復期間後における回復性，増悪または遅発毒性を評価した。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定，眼科学的検査，心電図ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施し毒性を評価した。TK 評価のため，試験 1 日および試験 90 日の投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に，すべてのエトラシモド投与動物から採血した。

いずれの投与群においても，死亡は認められず，眼科学的検査，心電図または尿検査の結果にエトラシモド投与に関連した影響は認められなかった。

エトラシモドに関連する一般状態変化として，削痩（5 および 15 mg/kg/日の各雌 1 匹）ならびに対照群と比較した摂餌量減少および体重増加抑制が認められた。1 および 15 mg/kg/日の雄で流涎が認められたが，回復期間中には認められなかった。エトラシモド投与群で粘液便，軟便，水様便の発現がわずかに増加したが，明らかな用量依存性は認められなかった。

5 mg/kg/日以上の雌雄で，エトラシモドに関連した体重増加抑制（対照群との比較）が認められた。4 週間の回復期間中におけるエトラシモド投与群の体重増加量は，概して対照群と同程度であったが，15 mg/kg/日の雄でのみ 0.075 kg 減少（対照群では 0.225 kg 増加）した。しかしながら，回復期間中に 15 mg/kg/日の雄で摂餌量が対照群と比較して増加したことから，この変化は偶発的なものであることが示唆された。1 mg/kg/日の雌ならびに 5 mg/kg/日以上の雌雄で，エトラシモドに関連した摂餌量の減少（対照群との比較）が認められた。この変化は 5 mg/kg/日以上で認められた体重への影響と関連しており，試験第 1 週に最も顕著に認められ，その後の減少の程度はより緩徐であったが，5 mg/kg/日の雌および 15 mg/kg/日の雌雄で統計学的に有意な変化が認められることもあった。回復期間中の雌雄の摂餌量は対照群と同程度またはそれ以上である場合が多く，回復性が示唆された。

エトラシモド投与により，臨床病理検査値に変化が認められた。投与期間終了時にすべてのエトラシモド投与群（1 mg/kg/日以上）の雌雄で，リンパ球数が 75%～86%減少（対照群との比較）し，総白血球数が減少した。これらはエトラシモドに関連する変化と考えられ，エトラシモドの薬理作用と符合しており，病理組織学的検査で認められたリンパ節におけるリンパ球減少と相関していた。この変化は休薬期間終了時までに部分的に回復したが，1 mg/kg/日以上の雌および 5 mg/kg/日以上の雄ではリンパ球数の減少（31%～80%低値：対照群との比較）が持続した。また，1 mg/kg/日以上の雌雄で好酸球数，好塩基球数またはその他の未分類細胞数の軽度の減少が認められ，血中の総細胞数が低下したことから，エトラシモドに関連する変化と考えられた。これらの変化は休薬期間終了時までに回復した。

1 mg/kg/日以上の雌雄では，軽度で用量依存的な APTT の延長（対照群との比較）が認められ，エトラシモドに関連する変化と考えられた。これらの変化は休薬期間終了時までに回復し，関連する病理組織学的変化は認められなかった。

1 mg/kg/日以上の雌雄では，総蛋白，アルブミン，グロブリンおよびコレステロールの軽度から中等度の減少（対照群との比較）が認められた。これらは用量依存性が示唆されたことからエトラシモドに関連する変化と考えられたが，雌雄ともに回復期間終了時までにおおむね回復し，摂餌量の低下に関連する可能性が考えられた。アルブミンの減少に伴う二次的変化として，5 mg/kg/日以上の雌雄でカルシウムが減少した。投与期間終了時には，1 mg/kg/日以上の雌雄でクロールの増加が認められ，対照群の値を 1%～2%上回っていた。これらはエトラシモドに関連する変化と考えられたが，原因は不明であり，休薬期間終了時までに完全な回復性は認められなかった。投与終了期間時に，15 mg/kg/日の雌雄で総ビリルビンが対照群と比較して軽微に増加した。これはエトラシモドに関連する変化と考えられたが，関連する病理組織学的所見は認められず，回復期間終了時までに回復した。主に 5 mg/kg/日以上の雌雄で ALP，GGT，AST または ALT の軽微な減少（対照群との比較）が認められた。これらの変化はエトラシモドと関連する可能性が高いと考えられたが，生物学的または毒性学的に意義のある変化ではないと判断した。これらの変化と他の評価パラメータとの間に相関はみられず，休薬期間終了時までに概ね回復した。その他の血液生化学検査の値については，ときに平均値の統計学的に有意な変化が認められたものの，生物学的または実験手技の変動から予想される範囲内と判断した。

投与期間終了時に，雌雄でエトラシモドに関連した肺重量および胸腺重量の変化が認められた。5 mg/kg/日以上の雄ならびに 1 mg/kg/日以上の雌で肺重量が有意に増加した。肺の絶対重量は，1，5 および 15 mg/kg/日の雄ではそれぞれ 29%，38%および 48%，雌ではそれぞれ 18%，18%および 34%対照群を上回っていた。肺重量の増加は，病理組織学的検査で認められた肺の肺胞組織球症と関連していた。休薬期間終了時の肺の絶対重量は，継続して対照群よりもやや高値であり，1，5 および 15 mg/kg/日の雄でそれぞれ 8%，31%および 24%，雌でそれぞれ 11%，11%および 14%対照群を上回っていた。回復時に，肺重量の増加に関連する病理組織学的変化は認められなかった。胸腺重量の増加が 1 mg/kg/日以上の雌および 5 mg/kg/日の雄（絶対重量のみ）ならびに 15 mg/kg/日の雌雄で認められ，いずれも病理組織学的検査で認められた浮腫と関連していた。回復期間終了時，これらの胸腺重量の変化は様々であり，関連する病理組織学的所見は認められず，エトラシモドと関連する可能性は低いと判断された。

投与期間終了時，5 mg/kg/日以上の雄の胸腺にエトラシモドに関連した剖検所見が認められた。胸腺の浮腫が 5 mg/kg/日の雄 1 例で，胸腺肥大が 15 mg/kg/日の雄 2 例で認められ，病理組織学的検査で認められた浮腫と関連していた。回復期間終了時には，雌雄いずれにおいてもエトラシモドに関連した剖検所見は認められなかった。

病理組織学的検査では，すべてのエトラシモド投与群（胸腺については 1 mg/kg/日以外）の投与期間終了時に，心臓，肺，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節および胸腺にエトラシモドに関連する所見が認められた。心臓では主に左心室の動脈における中膜の肥大/過形成が認められた。平滑筋細胞の数およびサイズの増加により，心臓の左心室内の中小動脈の筋肉壁（中膜）が肥厚していた。血管壁はしばしば好塩基性に染色され，その内腔はスリット状に狭窄していた。この変化は回復期間終了時における 1 mg/kg/日以上の雌雄の大半でみられ，エトラシモドに関連す

る変化と考えられた。肺の線維化は，主にコラーゲンの増加による胸膜の軽微な肥厚を特徴としていた。胸膜を覆う中皮細胞はごく軽度に肥大し，隆起が増大した。回復期間終了時にも，15 mg/kg/日の雄 1 例で肺の線維化が認められた。肺の肺胞組織球症は，肺胞腔内に無秩序な空胞化または好酸性細胞質を伴うマクロファージの小さな凝集体を特徴としていた。休薬期間終了時に，肺胞組織球症は認められなかった。これらの肺の変化はエトラシモドに関連すると考えられたが，変化の程度が小さいことから毒性変化ではないと考えられた。

1 mg/kg/日以上で，下顎リンパ節および腸間膜リンパ節におけるリンパ球減少が認められた。リンパ球減少は，傍皮質および髄索領域におけるリンパ球減少を特徴としていた。回復期間終了時の雌雄でもリンパ球減少は持続していた。これはエトラシモドと関連する変化と考えられ，臨床病理検査におけるリンパ球数の減少と関連していたが，変化の程度が小さいことから毒性ではないと判断した。5 mg/kg/日以上で，小葉間および小葉間結合組織に広がる薄い好酸性の非定型物質を特徴とする胸腺の浮腫が認められた。回復期間終了時に胸腺浮腫は認められず，エトラシモドに関連する変化ではあるものの一過性で毒性学的意義の乏しい変化と判断した。投与期間終了時に 15 mg/kg/日の雄 1 例の胸腺において軽度のアポトーシス増加が認められた。アポトーシス小体は，壊死性リンパ球の凝集体であり，同群の他の動物と比較して皮質で増加したが，単発的であったことからストレスに関連する変化と考えられた。

以上，雌雄イヌにエトラシモドを 1，5 または 15 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 3 ヵ月間経口投与したとき，概して忍容性は良好であり，エトラシモドの薬理作用に起因する影響が認められた。いずれの用量においても体重増加抑制および摂餌量減少が認められたが，毒性変化ではないと考えられた。4 週間の休薬期間終了後に，すべての変化に回復性が認められたが，例外として心臓における軽微から軽度の中膜の肥大/過形成が認められ，本試験よりも長い期間投与する試験において毒性変化となる可能性がある。しかしながら，本試験の心電図検査ではエトラシモドに関連する所見または異変は認められず，全般的な動物の健康状態に影響しなかった。

毒性が認められなかったことから，本試験の NOAEL は最高用量である 15 mg/kg/日と判断した。15 mg/kg/日における試験 90 日の C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 52.3 および 49.6 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 1030 および 1000 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 20 に示した。

この 3 ヵ月間投与毒性試験の結果に基づき，その後のイヌを用いた 9 ヵ月間投与毒性試験の高用量として 15 mg/kg/日を選択した（3.10 項）。これは ICH M3(R2)ガイドラインに基づき，MTD として妥当であると考えられた。

3.10. イヌを用いた 9 ヵ月間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 TX[redacted]008，概要表 2.6.7.7 Table 13

雌雄ビーグル犬（0，10，15 mg/kg/日：雌雄各 6 匹/群；2，5 mg/kg/日：雌雄各 4 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），2，5，10 または 15 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回 39 週間反復経口投与したときの毒性および TK を検討するとともに，4 週間の休薬期間後における変化の回復性，増悪または遅発性毒性を評価した。0，10，15 mg/kg/日群の雌雄各 2 匹について，投与期間終了後に 4 週間の休薬期間を設けた。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。試験前，投与期間終了時および休薬期間終了時の剖検前に眼科学的検査を実施した。心電図検査は，試験前，試験 1 日の投与前および投与後 1～2 時間，投与最終週の投与前および投与後 1～2 時間ならびに休薬期間終了時の剖検前に実施した。TK 評価のため，試験 1 日および試験 273 日の投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に，すべてのエトラシモド投与動物から採血した。

死亡は認められず，心電図または尿検査におけるエトラシモドの影響は認められなかった。試験中に認められた一般状態変化は，概して便の変化（粘液便，軟便または水様便）に関連するものであった。5 mg/kg/日以上で結膜炎が認められたが可逆的であり，2 mg/kg/日では眼における一般状態変化は認められなかった。

投与期間終了時の剖検前の眼科学的検査において，5 mg/kg/日以上の雄および 10 mg/kg/日以上の雌で流涙または結膜炎の様々な症状が認められた。より詳細なスリットランプ検査においてこの所見が認められ，主に 10 mg/kg/日以上で結膜炎および眼の分泌液（透明または化膿）が認められる傾向にあった。これらの所見は対照群では認められず，エトラシモドに関連する変化と考えられたが，獣医師による治療を要したのは投与期間中に流涙，分泌または強膜充血のみられた少数の動物であり，毒性変化ではないと判断した。休薬期間終了時の剖検前の眼科学的検査では，これらの所見が認められた 10 mg/kg/日以上の動物で回復性が認められた。

投与期間終了時に，5 mg/kg/日以上の雄でエトラシモドに関連するものの軽微な体重の低値（対照群との比較）が認められた。試験の経過とともに，2 mg/kg/日以上の雄で対照群と比較して用量依存的で顕著な体重増加抑制が認められたが，2 mg/kg/日以上の雌では抑制の程度は雄に比べて緩徐で明らかな用量依存性は認められず，高用量群の雌を除き 10 mg/kg/日以上で回復性が認められた。

5 mg/kg/日以上の雄および 15 mg/kg/日の雌で，対照群と比較して摂餌量の減少が認められ，概ね体重への影響と関連していた。4 週間の回復期間中，10 mg/kg/日以上の雌雄の摂餌量は対照群と比較して概して低かった。

すべてのエトラシモド投与群でリンパ球数の減少が認められた。休薬期間に回復傾向が認められたが，4 週間回復期間終了時においてもリンパ球数の低値が認められた。これらの変化に明らかな用量依存性は認められず，薬理作用と考えられる胸腺重量の増加と関連していた。これらの用量では，単球数，好酸球数，好塩基球数または大型未分類細胞数（その他の細胞）の軽度な減少もみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。

2 mg/kg/日以上の雄で，エトラシモドに関連した前立腺重量の減少ならびに肺重量および胸腺重量の増加が認められた。2 mg/kg/日以上の雌でも対照群と比較して肺重量が 18～30%増加し，10 mg/kg/日以上で胸腺重量が 23～40%増加した。雌の肺重量の増加は，雄の前立腺重量の減少と同様に，休薬期間を通じて持続した。

投与期間終了時の剖検では，15 mg/kg/日の雄の肺（4 例中 2 例）で褐色化が認められた。これらの所見は，局所性の肺胞組織球症または局所性の胸膜線維化の病理組織学的所見と関連していた。休薬後の雄では剖検所見は認められなかった。その他の剖検所見は，試験施設における同

系統，性別および週齢のイヌで認められる典型的な背景所見または偶発的なものであると考えられた。

病理組織学的検査では，すべてのエトラシモド投与群で肺重量の増加を伴う局所性の胸膜線維化および局所性の肺の炎症が認められたが，明確な用量依存性は認められなかった。これらの変化には回復性が認められた。15 mg/kg/日で胸腺の浮腫がみられ，回復性が認められたが，2 mg/kg/日以上の胸腺重量増加について回復性は認められなかった。2 mg/kg/日以上の心臓では，左心室の心筋内動脈の中膜および外膜の多くが肥厚しており，肥厚した動脈を動脈性の微小血管が取り囲んでいた。この変化に用量依存性はみられず，回復性は認められなかったが，関連する他の所見は認められず，心電図にも変化はみられなかった。

投与期間終了時に 2 mg/kg/日以上の雌雄で，腸間膜リンパ節における軽微から軽度の洞赤血球増加/赤血球貪食の発現頻度または重症度の増加が認められた。休薬期間後に，これらの発現頻度および重症度は対照群と同程度まで回復した。

以上，イヌにエトラシモドを 2，5，10 または 15 mg/kg/日の用量で 9 ヵ月間反復経口投与した後に 4 週間休薬したところ，忍容性は良好であり，瀕死または死亡は認められなかった。投与期間中に，エトラシモドに関連した顕著な体重増加抑制が 2 mg/kg/日以上の雄で認められ，雌では変化の程度は小さく用量依存性も認められなかったが，高用量の雌を除き，10 mg/kg/日以上では回復性がみられた。5 mg/kg/日以上で結膜炎が認められたが可逆的であり，2 mg/kg/日では眼科学的所見は認められなかった。すべてのエトラシモド投与群でリンパ球数の減少が認められ，休薬期間中に回復傾向が認められたが，4 週間の休薬後もリンパ球数の減少は持続した。眼および肺における変化は可逆的であったが，心筋血管における変化について回復性は認められなかった。本試験で認められた変化はいずれも毒性学的意義の乏しい変化と判断した。

以上の結果から，本試験の NOAEL は雌雄ともに最高用量である 15 mg/kg/日と判断した。15 mg/kg/日の投与 273 日（定常状態）における C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 46.9 および 45.7 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 879 および 861 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 21 に示した。

4. 遺伝毒性試験

ICH S2(R1)ガイドラインに準拠した遺伝毒性試験（オプション 1）として，細菌を用いる復帰突然変異試験（報告書番号 TX[redacted]011），ヒト末梢血リンパ球（HPBL）を用いた in vitro 染色体異常試験（報告書番号 TX[redacted]012）およびラット骨髄を用いた in vivo 小核試験（報告書番号 TX[redacted]013）を実施した。これらの試験結果を以下に要約する。

雌ラットにエトラシモドを投与したとき，エトラシモドは 300 mg/kg/日で統計学的に有意に小核を誘発したが，OECD ガイドライン 474[1]「哺乳類赤血球小核試験」に記載される明らかな小核誘発性と判定する 3 つの基準のすべてを満たしていなかった。OECD ガイドライン 474 に基づくと，以下 a~c のすべてに該当する場合に，被験物質は明らかに陽性と判定される。a) 少なくとも 1 つの投与群で，小核含有幼若赤血球の出現頻度が同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており，b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合に，少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性が見られ，c) 当該結果は陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。当該試験においては傾向検定を実施しな

かったが，300 mg/kg/日の雌で認められた小核細胞の発現頻度は陰性対照の 95%管理限界の範囲内であり，試験施設の過去の背景データの範囲内であった。In vitro の遺伝毒性試験結果はいずれも陰性であったこと，および in vivo 小核試験の高用量（300 mg/kg/日）で骨髄毒性が認められたことを含めた科学的根拠の重要度（Weight-of-Evidence）の評価に基づき，エトラシモドはラットで遺伝毒性を示さず，ヒトでも遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた。

潜在的な変異原性の可能性が示唆される不純物の評価については 8.1 項に記載した。

4.1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号 TX[redacted]011，概要表 2.6.7.8 Table 14

Aroclor 誘導ラット肝 S9 代謝活性化系の存在下および非存在下において，ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* 試験菌株（TA98，TA100，TA1535，TA1537）および *Escherichia coli* 試験菌株（WP2 uvrA）を用いる復帰突然変異試験でエトラシモドの変異原性を評価した。予備試験および本試験のいずれにおいても，DMSO を用いてエトラシモド L-アルギニン濃度が 100 mg/mL 以下となるよう保存液を調製した。

予備試験では，エトラシモドを 25，50，100，250，500，1000，2500 および 5000 µg/プレートで 3 回実施した。5000 µg/プレートでは，代謝活性化系存在下の全菌株において沈殿物が認められた。また，細胞毒性（背景の細菌の生育または平均復帰突然変異コロニー数の減少）が，以下の濃度で認められた。

- 代謝活性化系非存在下の TA100 株の 100 µg/プレート以上
- 代謝活性化系非存在下の TA1537 株の 250 µg/プレート以上
- 代謝活性化系非存在下の TA1535 株の 500 µg/プレート以上
- 代謝活性化系非存在下の TA98 株の 1000 µg/プレート以上
- 代謝活性化系存在下の TA1537，TA100 および TA1535 株の 2500 µg/プレート以上

本試験は，以下の濃度で実施した。

- 代謝活性化系非存在下の TA100 株：2.5，5.0，10，25，50 および 100 µg/プレート
- 代謝活性化系非存在下の TA1537 株：5.0，10，25，50，100 および 250 µg/プレート
- 代謝活性化系非存在下の TA1535 株：10，25，50，100，250 および 500 µg/プレート
- 代謝活性化系存在下の TA1537，TA100 および TA1535 株：50，100，250，500，1000 および 2500 µg/プレート
- 代謝活性化系の存在下および非存在下の TA98 および WP2 uvrA 株：50，100，250，500，1000，2500 および 5000 µg/プレート

代謝活性化系の存在下の TA98 および WP2 uvrA 株では，5000 µg/プレートで沈殿物が認められた。

また以下の試験条件で細胞毒性が認められた。

- 代謝活性化系非存在下の TA1537 株の 250 µg/プレート
- 代謝活性化系非存在下の TA1535 株の 500 µg/プレート以上
- 代謝活性化系非存在下の TA98 株ならびに代謝活性化系の存在下の TA1537，TA100 および TA1535 株の 2500 µg/プレート以上

いずれの試験においても，代謝活性化系の存在下および非存在下にかかわらず，すべての濃度のすべての菌株において復帰突然変異コロニー数は背景データと同程度であり，すべての菌株で陰性の基準を満たした。溶媒および陽性対照の結果から，代謝活性化系の存在下および非存在下において被験物質の変異原性を検出する本試験系の妥当性および感度が裏付けられた。

本試験の条件下では，代謝活性化系の存在下および非存在下のいずれにおいてもエトラシモドの変異原性は陰性（非変異原性）と判断した。

4.2. In vitro 染色体異常試験

報告書番号 TX[redacted]012，概要表 2.6.7.8 Table 15

HPBL を用いて，代謝活性化系の存在下または非存在下で短時間（3 時間）および長時間（22 時間）処理し，エトラシモド L-アルギニンの染色体異常誘発性を評価した。DMSO を用いエトラシモド L-アルギニン濃度が 300 mg/mL 以下となるよう保存液を調製した。培養液中の最終 DMSO 濃度は 1% v/v であった。Aroclor-1254 誘導ラット肝 S9 ミクロソーム分画の存在下および非存在下で，エトラシモド，陽性対照または溶媒対照とともに HPBL を培養した。用量設定試験で用いたエトラシモド濃度範囲は 5.86～3000 µg/mL であり，最高濃度は溶媒に対する溶解度により制限される濃度であった。3 時間処理では 375 µg/mL 以上で代謝活性化系の存在下および非存在下にかかわらず，また 22 時間処理では 188 µg/mL 以上で代謝活性化系の非存在下で，試験終了時に沈殿または溶血が認められた。

以下の細胞毒性に基づき，本試験における染色体異常の評価に用いる濃度を選択した。

- 代謝活性化系の非存在下で 3 時間処理した場合，50 µg/mL（細胞毒性なし），100 µg/mL（18%）および 125 µg/mL（63%）
- 代謝活性化系の存在下で 3 時間処理した場合，10 µg/mL（4%），50 µg/mL（23%）および 150 µg/mL（49%）
- 22 時間処理した場合，10 µg/mL（3%），30 µg/mL（21%）および 40 µg/mL（46%）

溶媒対照および各条件における 1 濃度の陽性対照と併せ，エトラシモドの染色体異常誘発性を評価した。200 個の分裂中期細胞（可能な場合）または 30 個以上の異常細胞に基づき，各濃度

につき染色体構造異常をスコア化した。また各濃度につき 400 個の分裂中期細胞において数的異常を評価した。

染色体構造異常を示す細胞の割合について，いずれの試験条件においても，溶媒対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。1 つを超える染色体異常が認められた細胞の割合は，エトラシモド処理群および溶媒対照群で同程度であった。代謝活性化系の非存在下において 100 µg/mL（中濃度）で 3 時間処理した場合，倍数性を有する細胞の割合が統計学的に有意に上昇（p 値：≤0.01）したが，用量依存性は認められなかった。これは，生物学的意義の乏しい変化と考えられた。溶媒対照および陽性対照における染色体異常の割合は，背景データと同等であった。

この試験条件下では，エトラシモドは代謝活性化系の存在下および非存在下にかかわらず，染色体の構造異常および数的異常を誘発する可能性は低いと考えられた。

4.3. ラット骨髄細胞を用いた小核試験

報告書番号 TX[redacted]013，2.6.7.9 Table 16

ラット骨髄細胞中の多染性赤血球（PCE）を測定し，エトラシモドによる小核誘発の可能性を評価した。用量設定試験に基づき，Sprague Dawley ラット（雌雄各 6 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，150 または 300 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回 3 日間反復経口投与した。陽性対照群（雌雄各 6 匹）として，試験 2 日に 60 mg/kg のシクロホスファミドを単回経口投与した。

大腿骨から骨髄を採取し，骨髄塗抹標本を作製し，試験 3 日の最終塗抹標本に基づき，多染性，正染性および小核を有する PCE（MN-PCE）について計数した。骨髄採取に割り付けた群に加えて，試験 2 日の投与後 4 時間に雄雌各 3 匹/群から採血し血漿中曝露量を測定した。

死亡は認められなかった。300 mg/kg/日の雌雄では，一般状態の変化として，皮膚の弛緩，排便減少，口腔周囲および腹側頸部の透明な物質または体表面の様々な部位の黄色の物質が認められた。150 および 300 mg/kg/日では，試験 0～3 日に摂餌量の減少に関連した体重減少（投与前値との比較）が認められた。

25 mg/kg/日以上の雌で総赤血球に対する PCE の比率（PCE:TE）の低下，300 mg/kg/日の雌で%MN-PCE の増加が認められた。最高用量である 300 mg/kg/日の雌で，骨髄の小核誘発性の統計学的に有意な増加がみられ陽性基準を満たしていたが，%MN-PCE の平均値は背景データの範囲内（0.00～0.35）であり，雄では%MN-PCE の統計学的に有意な増加はみられなかった。このことから，300 mg/kg/日の雌のエトラシモドによる骨髄小核形成能は弱陽性と判断した。

In vivo でエトラシモド 300 mg/kg/日を投与したところ，この試験条件下では弱いものの遺伝毒性が認められた。

5. がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

マウス（報告書番号 APD334.TOX.003）およびラット（報告書番号 APD334.TOX.002）を用いた 2 つの長期がん原性試験を実施し，エトラシモドのがん原性を評価した。

ICH S1C(R2)ガイドラインに基づき，マウスがん原性試験の高用量として，ヒト曝露量に対するマウスの未変化体の血漿中 AUC に対する比が 25 倍を超える用量を選択した。そのため，トランスジェニックマウスを用いた 6 ヵ月間のがん原性試験ではなく，2 年間のがん原性試験を実施した。

5.1. マウスを用いた経口投与用量設定試験

参考資料 TX[redacted]003，概要表 2.6.7.10 Table 17

Crl:CD1（ICR）マウスにエトラシモド L-アルギニンを単回（A 相）または反復（B 相）経口投与し，MTD を推定するための忍容性試験を実施した。A 相では，マウス（雌雄各 3 匹/群）にエトラシモド L-アルギニンを，30，100，300 または 1000 mg/kg（脱イオン水に溶解）を単回経口投与し，試験 8 日に剖検せずに安楽殺した。B 相では，マウス（各群雌雄各 10 例）にエトラシモド L-アルギニンを，0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），30，100 または 300/200 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回 28 日間反復経口投与した。

TK 評価のため，さらに雌雄各 41 匹/群に 30，100 または 300/200 mg/kg を投与した。試験 1 日の投与後 1，2，4，8，12 および 24 時間ならびに試験 28 日の投与後 0.5，1，2，4，8，12 および 24 時間に雌雄各 3 匹/群から採血した。

A 相では，死亡の有無，一般状態，体重および摂餌量に基づいて毒性評価を行った。B 相では，死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，投与期間終了時（試験 29 日）の臨床病理検査および病理組織学的検査に基づき毒性評価を行った。

A 相では，試験 4 日に 1000 mg/kg の雌 1 例を瀕死状態のため安楽殺した。この動物では，試験 4 日の安楽死前に活動性低下，呼吸困難/浅呼吸/緩徐呼吸，瀕死状態および振戦が認められた。他の動物はすべて，予定解剖日まで生存した。

単回投与後に認められたエトラシモドに関連する体重の変化は，1000 mg/kg の雌雄で試験−1～7 日に軽微な体重減少（投与前値と比較して雄で-1.47g，雌で-0.45g）に限定された。その他の用量群では，いずれも評価期間中の体重増加が認められた。このことから，エトラシモド単回経口投与時の MTD は 300 mg/kg と考えられた。

B 相では，300 mg/kg/日を反復投与したとき 3 例が死亡したため（試験 3 日に雄 1 例および試験 5 日に雌 1 例を状態悪化のため安楽殺，試験 6 日に雌 1 例を死亡発見），試験 7 日から用量を 200 mg/kg/日に減量して投与した。減量後，さらなる死亡例は認められず，体重および摂餌量は回復した。死亡した 3 例のいずれについても，生存中の一般状態観察または病理組織学的検査で死因を特定できなかった。死亡した 3 例では，脾臓のリンパ球壊死および胸腺のリンパ球減少または壊死が認められ，これらはストレスに続発した可能性が高く，エトラシモドに関連した変化ではないと考えられた。

28 日間の投与期間終了時に認められた臨床病理検査パラメータの変化として，全用量の雌雄で中等度のリンパ球数減少が認められたが，関連する病理組織学的所見は認められなかった。300/200 mg/kg/日の雌雄および 100 mg/kg/日の雌で軽度の好中球数増加が認められ，100 mg/kg/日の雌 1 例に好中球の細胞質に変化がみられたことから炎症反応が示唆されたが，関連する病理組織学的所見は認められなかった。100 mg/kg/日以上の雌雄で無症状性の脱水が示唆される軽微

な尿素窒素増加および 300/200 mg/kg/日の雌 1 例において中等度の血清中トリグリセリド増加が認められ，これらはエトラシモドに関連する可能性が考えられた。

剖検では，エトラシモドに関連した臓器重量変化として，全用量の雌雄で肺重量の増加，ならびに 30 mg/kg/日の雌および 100 mg/kg/日以上の雌雄で肝重量の増加が認められた。肺重量の増加は病理組織学的検査の肺胞組織球症と相関し，肝重量の増加は病理組織学的検査の肝細胞肥大と相関していた。さらに，すべての用量の雌雄で脾臓における髄外造血の増加が認められ，この造血反応は主に赤芽球系であった。試験中に認められた臨床病理検査または病理組織検査における変化はいずれも毒性ではないと判断した。血中のリンパ球数の減少は，エトラシモドの薬理作用によるものと考えられた。

300 mg/kg/日で試験 6 日までに死亡ならびに関連する試験 1 週の体重減少および摂餌量の減少が認められ，試験 7 日に 200 mg/kg/日に減量したことから，本試験におけるエトラシモドの NOAEL は 200 mg/kg/日と考えられた。このときの定常状態（試験 28 日）における C_{max} は，雄および雌でそれぞれ 168 および 96.7 µg/mL，AUC_{last} は雄および雌でそれぞれ 2180 および 1400 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 9 に示した。

この 28 日間試験結果に基づき，その後のマウスを用いた 91 日間経口投与毒性試験の高用量として 200 mg/kg/日を選択した（5.2 項）。この用量は，ICH M3(R2)ガイドラインに基づく MTD として妥当であると考えられた。

5.2. マウスを用いた 91 日間経口投与毒性試験

報告書番号 APD334.TOX.001，概要表 2.6.7.10 Table 18

Crl:CD1（ICR）マウス（雌雄各 25 例/群）にエトラシモド L-アルギニンを，0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），20，60 または 200 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 91 日間反復経口投与した。

TK 評価のため，さらにエトラシモド投与群に雌雄各 41 匹/群を，対照群に雌雄 8 匹を追加し，試験 1 日および試験 90 日の投与前（試験 90 日のみ），投与後 1，2，4，8，12 および 24 時間に雌雄各 3 匹/群/時点から採血した。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定ならびに臨床病理検査および病理組織学的検査を実施した。投与開始前および投与期間終了時の剖検前に眼科学的検査を実施した。

試験期間中に 6 例が死亡し，うち 1 例はエトラシモドと関連していた。主試験群では 200 例中 4 例，TK 群では 262 例中 2 例が死亡した。エトラシモドに関連した死亡は，瀕死状態となり投与 64 日に安楽殺した 200 mg/kg/日の雄 1 例であり，両眼の部分的または完全な閉眼，皮膚の弾力性の低下，被毛の汚れ，皮膚の冷感（全身），活動性低下，皮膚の白色化（全身），呼吸困難/努力呼吸，脱水，円背位，糞便減少，または削痩が認められた。この動物では，重度の肺胞組織球症および肺の慢性炎症に起因する一般状態の悪化が認められた。別の主試験群の 3 例の死亡は，エトラシモド投与との関連性はないと判断した。200 mg/kg/日の雄 1 例では，病理組織学的検査で重度の皮膚膿瘍に起因する一般状態の悪化が認められたため，安楽殺した。20 mg/kg/日の雄 1 例および対照群の雌 1 例が死亡発見されたが，剖検所見または病理組織学的所見から

死因を特定できなかった。TK 群では 200 mg/kg/日の雄 2 例について，うち 1 例を瀕死状態のため投与 4 日に安楽殺し，もう 1 例を投与 12 日に安楽殺したが，いずれも剖検所見は認められなかった。その他の動物はすべて，予定剖検時まで生存した。

特記すべき臨床病理パラメータの変化として，投与期間終了時に 20 mg/kg/日以上の雌雄で総白血球数およびその他の細胞数の減少を伴うリンパ球数の減少が認められ，これらはリンパ組織における病理組織学的変化に関連している可能性が考えられた。また，20 mg/kg/日以上の雌雄で総蛋白濃度またはアルブミン/グロブリン比の増加を伴うグロブリンの軽微な減少が認められ，これらはリンパ球数減少と関連する可能性が考えられた。無症状性の脱水を示唆する所見として，20 mg/kg/日以上の雌で赤血球数の増加，200 mg/kg/日の雌雄でクレアチニンの増加が認められた。さらに，20 mg/kg/日の雌ならびに 60 mg/kg/日以上の雌雄で，用量依存的な総ビリルビンの上昇が認められたが，他の臨床病理検査または病理組織学的検査で対応する所見は認められなかった。

投与期間終了時の剖検では，エトラシモドに関連した剖検所見は，200 mg/kg/日の雌 1 例の肺表面の異常のみであり，中等度の肺胞組織球症および慢性炎症と関連していた。20 mg/kg/日以上でエトラシモドに関連した肺および肝臓の重量増加ならびに脾臓重量の減少が認められた。さらに，200 mg/kg/日の雌雄で甲状腺/副甲状腺重量が増加した。

病理組織学的検査では，60 mg/kg/日以上の雌および 200 mg/kg/日の雄の肺（肺胞組織球症）ならびに 200 mg/kg/日の雌雄の甲状腺（変性/炎症）に毒性変化が認められた。さらに，20 mg/kg/日以上の雌雄で，肺（フィブリン沈着），肝臓（小葉中心性肥大）およびリンパ組織（胸腺，脾臓および腸間膜リンパ節）にもエトラシモドに関連した変化が認められ，60 mg/kg/日以上で認められた肺のフィブリン沈着は毒性と判断した。胸腺，脾臓および腸間膜リンパ節にみられた変化は毒性変化ではなく，エトラシモドの主要な薬理作用に関連するリンパ球移出の変化を反映している可能性が考えられた。

200 mg/kg/日の雌雄でエトラシモドに関連した軽微かつ一過性の体重の低値（対照群との比較）が認められたが（雄のみ統計学的に有意な変化），これは投与 1 週（投与 7 日までの間）のみであった。試験前日（−1）～7 日の間に，200 mg/kg/日の雄では 0.3 g および雌では 0.96 g 増加したが，対照群の雄では 1.53 g および雌では 1.46 g 増加した。200 mg/kg/日では投与 1 週目にエトラシモドに関連する統計学的に有意な摂餌量の減少が雄（対照群と比較して−21.8%）および雌（対照群と比較して−23.5%）で認められ，体重への影響と関連していた。

眼科学的検査および尿検査では，エトラシモドに関連する所見は認められなかった。

20 mg/kg/日では病理組織学的検査における毒性所見は認められなかったことから，本試験の NOAEL は 20 mg/kg/日と判断した。20 mg/kg/日を投与したときの試験 90 日における C_{max} は，雄で 22.4 µg/mL および雌で 14.9 µg/mL，AUC_{24} は雄で 331 µg·h/mL および 220 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 10 に示した。

本試験結果に基づき，マウスを用いた 104 週間投与がん原性試験（5.3 項）における高用量として 20 mg/kg/日を選択し，これは ICH S1C(R2)ガイドラインに基づき，MTD と考えられた。本試験の 20 mg/kg/日における AUC はヒトの定常状態における曝露量（$AUC_{24,ss}$）である 2.163 µg·h/mL を上回り，雄で約 153 倍および雌で 102 倍であった。高用量として選択した

20 mg/kg/日は，ICH S1C(R2)ガイドラインに示された高用量の設定基準である，ヒト曝露量（AUC）に対する曝露量比である 25 倍を満たしていた。

5.3. マウスを用いた 104 週間経口投与がん原性試験

報告書番号 APD334.TOX.003，概要表 2.6.7.10 Table 19

雌雄 Crl:CD1（ICR）マウスにエトラシモド L-アルギニンを 104 週間経口投与したときの発がん性を評価した。また，試験 364 日に，エトラシモドの定常状態における曝露量を評価した。マウス（雌雄各 65 匹/群）に，2，6 または 20 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）のエトラシモド L-アルギニンを 1 日 1 回反復投与した。これらとは別の 2 群（雌雄各 75 匹/群）に脱イオン水または対照物質として L-アルギニン塩酸塩を溶解した脱イオン水を投与した。死亡/生存および一般状態観察，体重，体重増加量，摂餌量の測定ならびに剖検および病理組織学的検査を実施した。さらに試験 364 日に，エトラシモド投与群（雄雌各 27 匹/群）ならびに脱イオン水および対照物質を投与した対照群（雄雌各 6 匹/群）の TK を評価した。

6 mg/kg/日以上の雌雄でエトラシモドに関連した早期安楽殺例または死亡例が認められ，血管腫/血管肉腫と関連していた。これにより，20 mg/kg/日の雄および全ての投与群の雌について，FDA の基準に則った試験実施計画書に従い早期投与中止または早期剖検をした。

20 mg/kg/日の雌では，試験 588 日（試験 84 週）における生存例は 20 例となったため，試験 589 日（試験 84 週）にこの群における投与を中止した。20 mg/kg/日の雌では，試験 637 日（試験 91 週）に生存していた 15 例を剖検した。6 および 2 mg/kg/日の雌では，それぞれ試験 640 日および 685 日（試験 92 および 98 週）に生存例が 20 例となったため，投与を中止した。6 mg/kg/日の雌では試験 672 日（試験 96 週）に生存していた 15 例を剖検した。試験 699 日（第 100 週）に脱イオン水を投与した対照群の雌が 20 例となったため，この群の 20 例ならびに対照物質を投与した対照群および 2 mg/kg/日の雌を剖検した。

20 mg/kg/日の雄では，試験 637 日（試験 91 週）に生存例が 20 例となり，この群における投与を中止した。20 mg/kg/日の雄では，試験 689 日（試験 99 週）に生存していた 15 例を剖検した。6 mg/kg/日の雄では試験 691 日（99 週）に生存例が 20 例となり，投与を中止した。しかしながら，6 mg/kg/日の雄では，試験期間終了時の計画剖検前までの生存例は 15 例を下回らなかった。脱イオン水または対照物質を投与した対照群，および 2 mg/kg/日の雄には，それぞれ投与期間終了時（104 週）まで 1 日 1 回反復投与した。

いずれの投与群においても，一般状態に明らかなエトラシモドに関連した影響は認められなかった。

2 mg/kg/日以上で，脱イオン水のみまたは対照物質を投与した対照群と比較してエトラシモドに関連した体重の低値（統計的に有意な変化を伴うこともある）が認められた。これらの体重の低値は試験 13 週目と早期に認められ，投与期間を通じて持続した。体重への影響は摂餌量の減少と関連していたが，その変化の程度はエトラシモド投与群間で同程度であった。

6 mg/kg/日以上の雌雄で，用量依存的に血管肉腫および血管腫の発現率が上昇し，これらの用量では死亡率が上昇した。20 mg/kg/日の雄および全用量の雌について早期に投与を中止し，20 mg/kg/日の雄および全用量の雌について早期に剖検をした。血管肉腫は，20 mg/kg/日の雄の

肝臓の嚢胞および皮下組織の浮腫ならびに 20 mg/kg/日の雌の皮下組織の腫瘤の一部の赤色化の剖検所見と関連していた。これらの影響が認められた主な組織は，肝臓，皮下組織，心臓，骨髄および脾臓であった。血管肉腫/血管腫は，子宮，腸管，骨格筋，肺，胸腺，副腎，腎臓，眼，腸間膜リンパ節，腸間膜/腹膜，脊髄および精巣上体にもわずかに認められた。6 mg/kg/日以上の雌雄で，脱イオン水のみまたは対照物質を投与した対照群より早期に血管肉腫および血管腫が認められた。さらに，6 mg/kg/日以上の雄および 20 mg/kg/日の雌では，血管肉腫および血管腫の発現例数が増加した。

病理組織学的検査では，エトラシモドに関連する非腫瘍所見として，20 mg/kg/日の雄および 6 mg/kg/日以上の雌（主に子宮）の種々の臓器で血管腫様過形成，2 mg/kg/日以上の雌雄で肺の様々な変化（肺胞組織球症，肺胞の好酸性物質蓄積，骨化生および線維化），6 mg/kg/日以上の雌雄で胸腺髄質のリンパ球増加の重症度の上昇が認められた。

マウスにエトラシモドを 1 日 1 回反復投与したところ，6 mg/kg/日で発がん作用が認められた。がん原性に関する LOEL は 6 mg/kg/日であり，投与 364 日の定常状態における雌雄合算の C_{max} は 5.710 µg/mL，AUC_{24} は 90.60 µg·h/mL であった。

5.4. ラットを用いた 104 週間経口投与がん原性試験

報告書番号 APD334.TOX.002，概要表 2.6.7.10 Table 20

雌雄 Sprague Dawley ラットに最長約 91 週間（当初の設定時では 104 週間）経口投与したときの，エトラシモドの発がん性を評価した。また，試験 364 日に，定常状態におけるエトラシモドの曝露量を評価した。ラット（雌雄各 65 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 2，6 または 20 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）を投与した。これらとは別の 2 群（雌雄各 75 例）に脱イオン水のみまたは対照物質として L-アルギニン塩酸塩を溶解した脱イオン水を投与した。死亡/生存率，一般状態および腫瘤の観察，体重，体重増加量および摂餌量の測定ならびに剖検および病理組織学的検査を実施した。さらに試験 364 日に，エトラシモド投与群（最大雌雄各 9 匹/群）および対照群（最大雌雄各 5 匹/群）の TK を評価した。

生存率に明らかなエトラシモドの影響は認められなかった。本試験で認められた早期安楽殺/死亡の原因は多様であり，用量依存性はみられず，単発的または低発現率であり，ラットがん原性試験で報告される一般的な自然発生性/偶発的な死因と符合していたことから，エトラシモドに関連したものではないと考えられた。

20 mg/kg/日の雄では，試験 604 日（試験 86 週）に生存例が 20 例となったため，試験実施計画書に記載された FDA の規定に従い，この群への投与は試験 604 日に中止した。さらに，脱イオン水対照群では，雄および雌でそれぞれ試験 632 日（試験 90 週）および試験 629 日（試験 89 週）に生存例が 20 例となったことから，試験実施計画書に記載された FDA の規定に従い，すべての群の雌雄について剖検を実施することとなった。すなわち，生存するすべての雄の最終剖検を試験 636 日および 640 日（それぞれ試験 90 週および 91 週）に行い，生存するすべての雌の最終剖検を試験 629～633 日（それぞれ試験 89～90 週）に行った。

本試験中の生存時および剖検時にエトラシモドに関連した毒性所見および腫瘍は認められなかった。2 mg/kg/日以上の雌雄で，脱イオン水対照群および対照物質群に比べて体重の低値（し

ばしば統計学的有意差を伴う）が認められた。体重の低値は投与期間中の試験 4 週目から認められ，投与期間を通じて持続した。体重への影響は摂餌量減少と関連していたが，その影響の程度は投与群間で同程度であった。

エトラシモドに関連する剖検所見および腫瘍は認められなかった。

エトラシモドに関連する非腫瘍性の病理組織学的変化が，2 mg/kg/日以上の雌雄でリンパ組織（脾臓における辺縁帯リンパ球の減少または髄外造血の増加，胸腺髄質のリンパ球の増加あるいはリンパ節の洞組織球増加，洞赤血球増加/赤血球貪食または洞拡張）および脳（視床における局所性鉱質沈着）に認められた。また，2 mg/kg/日以上の雌および 6 mg/kg/日以上の雄では，肝臓に非腫瘍性変化（肝細胞変性巣の増加または胆管過形成の増加）も認められた。これらの発現頻度および程度は，ほとんどがエトラシモド投与群間で同程度であった。

本試験で Sprague Dawley ラットにエトラシモドを最長 91 週間反復投与したところ，発がんの徴候は認められなかった。最高用量である 20 mg/kg/日における雄の定常状態（試験 364 日）の C_{max} は 12.10 µg/mL および AUC_{24} は 172.0 µg·h/mL，雌の定常状態（試験 364 日）の C_{max} は 24.20 µg/mL および AUC_{24} は 387.0 µg·h/mL であった。

6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

Sprague Dawley ラットおよび New Zealand White ウサギを用いた一連の生殖発生毒性試験を実施した。ラットを用いた受胎能および初期胚発生に関する試験，精子形成に及ぼす影響を検討するための雄ラットを用いた 28 日間試験，妊娠ラットおよび妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験，ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する試験ならびに幼若動物試験を実施した。

6.1. 受胎能および初期胚発生

6.1.1. 雄ラットの精子形成に関する 28 日間経口投与試験

参考資料 TX[redacted]008，概要表 2.6.7.11 Table 21

Sprague Dawley ラットの精子形成に対するエトラシモドの潜在的な影響を評価した。雄ラット（12 匹/群）に 0（溶媒対照：L アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，100 または 250 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量でエトラシモド L-アルギニンを 1 日 1 回 28 日間経口投与した。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量の測定，精子形成に関する評価（運動性，形態，精巣上体および精巣における精子数測定ならびに精子産生率の算出）ならびに剖検に基づき評価した。

試験 4～7 日に，250 mg/kg/日の雄 12 匹中 5 例を体重減少（投与前値との比較），摂餌量減少または一般状態の悪化（自発運動の低下，運動失調，円背位，体の冷感または呼吸数減少）のため安楽殺した。そのため，試験 6 日から最高用量を 250 から 200 mg/kg/日に減量した。他の動物はすべて，予定解剖日まで生存した。250/200 mg/kg/日の生存した雄 3 例では，試験 4 日または 6 日の投与後約 5 時間に体の冷感が認められた。いずれの用量においても，エトラシモドに関連する他の所見は認められなかった。

250 mg/kg/日では，試験 0～6 日に投与前値からの体重減少が認められ，試験 6 日に対照群と最大の差が認められた（対照群と比較して 20.6%低値）。試験 2～20 日を通して，対照群と比較して有意な体重の低値が認められた。250 mg/kg/日から 200 mg/kg/日へ減量した後の体重増加量は，試験 6～9 日および試験 13～16 日に対照群を上回って有意に増加し，投与期間終了時まで増加傾向が認められた。試験 6 日に減量した後，体重および体重増加量に対する影響は改善したものの，投与期間全体（第 0～28 日）で評価した場合，投与 1 週目の体重減少の影響により 250/200 mg/kg/日の体重増加量は対照群と比べて有意に低かった（$p<0.05$）。100 mg/kg/日でも試験 0～2 日に体重増加量の有意な低値が認められた（対照群との比較，$p<0.01$）。これはエトラシモドに関連する変化と考えられたが，体重増加量の低値は一過性であったことから，100 mg/kg/日では投与期間全体における統計学的に有意な体重の低値は認められず，毒性変化ではないと考えられた。

体重減少および体重増加抑制が認められたことに関連して，250/200 mg/kg/日では試験 0～9 日に，100 mg/kg/日では試験 2 日までの間に，対照群に比べて有意な摂餌量減少が認められた。25 mg/kg/日では，投与 0～2 日に対照群と比較して摂餌量が有意に減少した。25 および 100 mg/kg/日にみられた摂餌量減少は毒性変化ではないと考えられた。

いずれの用量においても精子運動性，精巣上体または精巣の精子濃度，精子産生率ならびに精子形態に対するエトラシモドの影響は認められなかった。250/200 mg/kg/日（75%）の精子運動性は低かったが，対照群（82%）と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。同様に，左の精巣上体尾部における精子濃度についても対照群と比較して低値であったが，統計学的に有意な差は認められなかった。また，左の精巣における精子濃度は対照群と同程度であった。したがって，左の精巣上体尾部の精子濃度の低値はエトラシモドに関連しない変化と考えられた。

瀕死状態のため安楽殺した 250/200 mg/kg/日の雄では，剖検所見として精巣上体の一部白色化，腎の蒼白，下垂体の小型化，前立腺結節の小型化あるいは脾臓の蒼白または小型化が認められた。試験 28 日の計画剖検時には，重篤な所見は認められなかった。

250/200 mg/kg/日では，右の精巣尾部の重量（絶対重量，脳重量と比較した相対重量）が対照群と比較して有意に低かった。

以上，MTD である 200 mg/kg/日まで，エトラシモドによる精子形成への影響は認められなかった。

6.1.2. ラットにおける受胎能および初期胚発生に関する試験

報告書番号 TX[redacted]007，概要表 2.6.7.12 Table 23

雌雄 Sprague Dawley ラットに交配前/精子形成期から受胎および受胎から着床までの期間にエトラシモド L-アルギニンを投与したときの受胎能および初期胚発生への影響を検討した。雄ラット（25 匹/群）に，交配前 28 日から剖検前日までの少なくとも 63 日間，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，100 または 200 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回経口投与した。雌ラット（25 匹/群）に，交配前 14 日から妊娠 7 日までの 22 から 35 日間，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギ

ニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），1，2 または 4 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で 1 日 1 回経口投与した。雌を妊娠 15 日に安楽殺した。

雄への投与量はこれまでに実施した試験および本試験と並行して実施した試験（報告書番号 TX[redacted]010，TX[redacted]004，TX[redacted]009）における忍容性に基づき設定した（3.2 項～3.4 項）。TX[redacted]008 試験では最高用量である 250 mg/kg/日で瀕死状態および過度の体重減少が認められたため，200 mg/kg/日に減量した（6.1.1 項）。雌への投与量は 2 つの用量設定試験［報告書番号 TX[redacted]016（6.2.1 項），報告書番号 TX[redacted]025（6.2.2 項）］に基づき設定した。これらの試験では，5 mg/kg/日以上で生存胎児数の減少がみられた。このことから，本試験における雌の最高用量は 4 mg/kg/日とした。

雄の毒性は，死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，生殖能（交配，受胎能，交尾率），精子形成に関する評価項目および剖検に基づき評価した。雌は，死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量（交配前および妊娠中），性周期，生殖能（交配，受胎能，受胎率），剖検所見ならびに子宮パラメータに基づき評価した。胚，初期胚吸収，着床および黄体について数および部位を記録した。

いずれの投与群においても，雌雄ともに生存率への影響はみられず，顕著な一般状態変化も認められなかった。雄では 100 および 200 mg/kg/日で，投与前値からの体重減少あるいは対照群と比較して体重の低値，体重増加抑制および摂餌量の減少が認められ，毒性変化と考えられた。25 mg/kg/日の雄で統計学的に有意な体重増加抑制および摂餌量減少が認められたが，毒性変化ではないと考えられた。雌では，交配期間前にエトラシモドに関連した体重増加抑制および摂餌量の減少が認められたが，1 mg/kg/日以上の体重は対照群と同程度であったことから，この変化は毒性ではないと判断した。また妊娠期間中の雌では，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日で対照群に比して間欠的な体重増加抑制または摂餌量の減少がみられたが，妊娠体重に顕著な影響が認められなかったため，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

いずれの投与量においても，エトラシモドによる精子形成に関する評価項目，性周期ならびに雌雄の交配，受胎能および交配/受胎率への影響は認められなかった。

また，いずれのエトラシモド投与群においても，エトラシモドに関連した剖検所見は雌雄ともに認められなかった。

高用量（200 mg/kg/日）の雄で精巣上体重量（左の精巣上体尾部，左精巣上体，右の精巣上体尾部，右精巣上体）の有意な低下が認められたが，受胎能および精子パラメータへの影響は認められなかったことから，これらの変化はエトラシモドに関連すると考えられるものの，毒性ではないと判断した。精巣上体重量の変化以外に，雌雄いずれも他の臓器重量に変化は認められなかった。

1，2 および 4 mg/kg/日では，胚の子宮内生存率にエトラシモド投与の影響は認められなかった。評価したパラメータは，着床前胚損失率，着床後胚損失率ならびに生存胚数，黄体数および着床部位数であった。対照群との差は軽微で，統計学的に有意な差は認められなかった。

以上，雄では 100 および 200 mg/kg/日で体重減少，体重の低値，体重増加抑制および摂餌量の減少が認められたため，雄の全身毒性に対する NOAEL は 25 mg/kg/日であった。雌ではいずれの

パラメータにも毒性変化が認められなかったことから，雌の全身毒性および初期胚発生に関する NOAEL は，検討した最高用量である 4 mg/kg/日と考えられた。雌雄いずれにおいても生殖能への影響は認められなかったことから，受胎能に関する NOAEL は，検討した最高用量である 200 mg/kg/日（雄）および 4 mg/kg/日（雌）と考えられた。

6.2. 胚・胎児発生

6.2.1. 妊娠ラットを用いた経口投与用量設定試験

報告書番号 TX[redacted]016，概要表 2.6.7.11 Table 21

妊娠 Sprague Dawley ラットを用いた重要な胚・胎児発生毒性試験（6.2.3 項）におけるエトラシモド L-アルギニンの用量を検討するための用量設定試験を実施した。妊娠ラット（雌 8 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，75，150 または 250 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で妊娠 6 日～17 日まで 1 日 1 回経口投与した。妊娠 20 日に安楽殺し，子宮，胎盤および卵巣の検査を実施した。

死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，妊娠子宮重量，剖検および子宮パラメータに基づき毒性を評価した。胎児数，早期および後期胚吸収数，全着床数および黄体数を記録し，胎盤も検査した。また，胎児の外表の奇形および変異を検査した。

250 mg/kg/日の全動物を重篤な毒性により妊娠 7 日から 10 日までに安楽殺したため，この用量における子宮内の胎児の成長，生存および形態の評価はできなかった。これらの動物では，投与開始から安楽殺までの間に投与前値からの重度の体重減少および対照群と比較して摂餌量の減少が認められた。加えて，定期観察時または投与後 5 時間以内に，自発運動低下，振戦，冷感，四肢の冷感または蒼白，努力性呼吸，鼻周囲の赤色物質，白色便，排便減少が認められた。安楽殺後に剖検所見は認められなかった。

対照群，25，75 および 150 mg/kg/日の全動物が妊娠 20 日の剖検予定日まで生存した。150 mg/kg/日では，定期観察時または投与後 5 時間に，四肢の冷感または蒼白，白色便，排便減少が認められた。75 mg/kg/日でも四肢の冷感および白色便が認められたが，発現は限定的であった。25 mg/kg/日では特記すべき一般状態変化は認められなかった。予定剖検時（妊娠 20 日）において，25，75 および 150 mg/kg/日に剖検所見は認められなかった。

妊娠 6～9 日に，75 および 150 mg/kg/日で体重の低値，ならびに 25 mg/kg/日で体重増加抑制（対照群との比較）が認められた。妊娠 9～16 日では，これらの群の体重増加量は対照群と同程度であった。しかし，胚吸収の発現頻度が高いことから，25，75 および 150 mg/kg/日では妊娠 16～18 日に対照群と比較した体重増加抑制または体重の低値が認められ，投与後期間（妊娠 18～20 日）まで持続した。その結果，妊娠 7～20 日では 75 mg/kg/日および 150 mg/kg/日（それぞれ 5.2%～21.5%および 7.9%～23.3%低値：対照群との比較），妊娠 17～20 日では 25 mg/kg/日（6.3%～19.6%低値：対照群との比較）で体重の低値が認められた。150 mg/kg/日では対照群と比較して正味の体重増加量の低値が認められた。25 mg/kg/日および 75 mg/kg/日の正味の体重増加量ならびに 25，75 および 150 mg/kg/日の正味の体重は対照群と同程度であった。25，75 および 150 mg/kg/日の摂餌量は，投与期間中（妊娠 6～18 日）は対照群よりも低値であったが，投与期間終了後（妊娠 18～20 日）は対照群と同程度であった。

さらに，25，75 および 150 mg/kg/日では胚吸収の発現頻度が高かったことから，これらの群の妊娠子宮重量は対照群よりも低値であった。25，75 および 150 mg/kg/日の子宮内胎児の生存に重度の影響が認められた。75 および 150 mg/kg/日では生存胎児は認められず（着床後胚損失率 100%），25 mg/kg/日群では生存胎児 1 例（着床後胚損失率 99.2%）のみであり，その胎児の体重は低値であり，外表奇形として髄膜ヘルニアが認められた。

母動物毒性および子宮内生存率に対する重度の影響が，すべてのエトラシモド投与群で認められた。この結果に基づき，これに続く妊娠 Sprague Dawley ラットの用量設定試験では 2，5，10 または 20 mg/kg/日を選択した（6.2.2 項）。

6.2.2. 妊娠ラットを用いた経口投与用量設定試験（追加試験）

報告書番号 TX[redacted]025，概要表 2.6.7.11 Table 21

妊娠 Sprague Dawley ラットを用いる重要な胚・胎児発生に関する試験（6.2.3 項）におけるエトラシモド L-アルギニンの用量を検討するためのより低用量での用量設定試験を実施した。妊娠ラット（雌 8 匹/群）に，0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），2，5，10 または 20 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で妊娠 6～17 日に経口投与した。妊娠 20 日に安楽殺し，子宮，胎盤および卵巣を検査した。

死亡の有無および一般状態の観察，体重および摂餌量，妊娠子宮重量，剖検および子宮パラメータ（妊娠 20 日）に基づき毒性を評価した。胎児数，早期および後期胚吸収数，全着床数および黄体数を記録し，胎盤も検査した。また，胎児の外表の奇形および変異を検査した。

評価した全動物が妊娠 20 日の予定剖検日まで生存し，特記すべき母動物毒性は認められなかった。2 mg/kg/日以上で投与期間にわたる摂餌量減少が認められたが，概して体重および体重増加量への影響との関連は認められなかった。対照群と比較したときの体重増加抑制が，20 mg/kg/日で妊娠 16～18 日，5 mg/kg/日以上で投与中止後（妊娠 18～20 日）に認められた。これらの妊娠後期にみられた体重パラメータへの影響は，5 mg/kg/日以上で胚吸収の発現頻度上昇および胎児体重の低値が認められたことに起因していた。

5，10 および 20 mg/kg/日における胎児体重は，対照群と比較して低値であった（それぞれ最大 10.5%，17.5%および 10.3%低値）。さらに，5，10 および 20 mg/kg/日では，対照群と比較して着床後胚損失率が高く，その後の生存胎児数の減少が認められた。5 mg/kg/日以上では，子宮内胎児の成長および生存率への影響に伴い，対照群と比較して妊娠子宮重量の低値が認められた。2 mg/kg/日では子宮内胎児の成長および生存率に対する影響は認められなかった。

5 mg/kg/日以上では，対照群と比較し胎児の外表奇形として，胎児の局所性浮腫および胎児の全身性浮腫の発現頻度が上昇した。さらに，単発性の他の外表奇形として，5，10 または 20 mg/kg/日では髄膜ヘルニア，短尾，二分脊椎が認められた。2 mg/kg/日では胎児の外表奇形は認められなかった。

以上，5 mg/kg/日以上のエトラシモドを投与したときに胎児毒性が認められ，本試験結果に基づき，ラットを用いた重要な胚・胎児発生毒性試験の用量を 1，2 または 4 mg/kg/日とした（6.2.3 項）。

高用量では母動物に何らかのごく軽度の毒性が発現することが望ましいとされることから（ICH S5(R3)ガイドライン），重要な試験の高用量として 4 mg/kg/日とすることは妥当と考えられた。

6.2.3. 妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書番号 TX[redacted]017，概要表 2.6.7.13 Table 24

妊娠 Sprague Dawley ラットにエトラシモド L-アルギニンを投与し，器官形成期における発生毒性および母体毒性を評価し，母体毒性および発生毒性に対する NOAEL を明らかにした。妊娠ラット（雌 25 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），1，2 または 4 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で妊娠 6～17 日まで経口投与した。妊娠 20 日に安楽殺し，子宮，胎盤および卵巣を検査した。

対照群またはエトラシモド投与群に，さらに 8 匹/群を加え TK 評価に供した。妊娠 6 日および 17 日の 0（投与前），投与後 0.5，1，2，4，8 および 24 時間に 4 匹/群を採血し，TK 評価を行った。TK 評価に供したすべての動物を妊娠 18 日に安楽殺し，妊娠の有無を評価した。

死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，妊娠子宮体重，剖検および子宮パラメータ（妊娠 20 日）に基づき毒性を評価した。胎児数，早期胚吸収数および後期胚吸収数，総着床数ならびに黄体数を記録した。胎児の体重および性別，外表，内臓および骨格の奇形ならびに変異について評価した。

全ての動物が妊娠 20 日の剖検予定日まで生存した。いずれの用量においても母体毒性は認められなかった。

2 mg/kg/日以上で，投与 2 日の投与後（妊娠 7～8 日）に対照群と比較してエトラシモドに関連した体重増加抑制が認められた。しかしながら，この変化は妊娠 6～9 日の累積体重増加量に影響せず，その他の投与期間では対照群と概して同程度であったため，毒性学的意義に乏しい変化と判断した。すべての投与群で，対照群と比較して摂餌量減少が認められた。2 mg/kg/日以上でみられた妊娠 7～8 日の変化を除き，これらの摂餌量減少と体重の顕著な変化に関連はみられなかった。

投与期間終了後，4 mg/kg/日で妊娠 18～20 日に摂餌量減少を伴わない体重増加抑制が認められたため，妊娠 20 日に対照群と比較してわずかな体重の低値（-4.2%）が認められた。4 mg/kg/日の妊娠子宮重量も対照群と比較して低値であった。4 mg/kg/日で投与期間終了後に認められた体重の低値および体重増加抑制ならびに妊娠子宮重量の低値は，子宮内胎児の生存率への影響に起因するものであった。2 mg/kg/日における投与期間終了後の体重および体重増加量，妊娠子宮重量，2 mg/kg/日以上における正味の体重および正味の体重増加量は対照群と同程度であった。1 mg/kg/日の母動物の体重，体重増加量，正味の体重，正味の体重増加量および妊娠子宮重量にエトラシモド投与の影響は認められなかった。

妊娠 20 日の計画剖検時に，いずれの投与群においても母動物に剖検所見は認められなかった。

全ての投与群で胚・胎児発生毒性が認められた。エトラシモドに関連した毒性所見として，4 mg/kg/日では対照群と比べて着床後胚損失率（主に早期胚吸収）の高値が認められ，生存胎児数および生存胎児割合の低値が認められた。これらは 2 mg/kg/日以下では認められなかった。

1 mg/kg/日以上で対照群と比較して胎児体重の低値が認められた。しかしながら，エトラシモド投与群の値は背景データと同程度であり，用量依存性はみられなかったため，胎児体重の低値はエトラシモドに関連しない変化と考えられた。

外表奇形（4 mg/kg/日で胎児の全身性浮腫，胎児の局所性浮腫）および内臓奇形（1 mg/kg/日以上で大動脈弓離断，大動脈狭窄，後食道大動脈弓，痕跡大動脈弓，大動脈弓絞窄，大動脈肺動脈中隔欠損，心室中隔欠損），ならびに内臓変異（1 mg/kg/日以上で腕頭動脈短小）が認められた。

本試験で認められた母動物の所見に基づき，母動物毒性に関する NOAEL は最高用量である 4 mg/kg/日と判断した。4 mg/kg/日における C_{max} および AUC_{last} は妊娠 6 日でそれぞれ 2.74 µg/mL および 34.2 µg·h/mL，妊娠 17 日でそれぞれ 3.62 µg/mL および 44.5 µg·h/mL であった。

また，本試験で認められた胚・胎児発生に関する毒性に基づき，胚・胎児発生に関する NOAEL は 1 mg/kg/日未満と判断した。1 mg/kg/日における母動物の C_{max} および AUC_{last} は，妊娠 6 日で 0.452 µg/mL および 7.00 µg·h/mL，妊娠 17 日で 0.804 µg/mL および 11.0 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 48 に示した。

6.2.4. 妊娠ウサギを用いた経口投与用量設定試験

報告書番号 TX[redacted]018，概要表 2.6.7.11 Table 21

妊娠 NZW ウサギを用いる重要な胚・胎児発生に関する試験におけるエトラシモド L-アルギニンの用量を評価するための用量設定試験を実施した。妊娠ウサギ（雌 6 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），2，25，75 または 150 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で妊娠 7 日～20 日まで経口投与した。妊娠 29 日に安楽殺し，子宮，胎盤および卵巣の検査を実施した。

死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，妊娠子宮重量，剖検および子宮パラメータ（妊娠 29 日）に基づき毒性を評価した。胎児数，早期および後期胚吸収数，全着床数および黄体数を記録した。また，胎児の外表の奇形および変異を検査した。

150 mg/kg/日の 3 例を，投与前値からの体重減少，摂餌量減少および一般状態変化（排便減少，削痩，ケージ床の赤色物質）により妊娠 19 日に安楽殺した。妊娠 21～26 日に，25，75 および 150 mg/kg/日のそれぞれ 1，5 および 1 例が流産した。流産した動物の大部分で，瀕死状態により安楽殺した動物と同様の一般状態変化および投与前値からの軽微な体重減少（主に早期胚吸収による）が認められた。その他の動物はいずれも期間終了時の剖検まで生存した。

150 mg/kg/日の生存した 2 例のうち 1 例では，投与最終週（妊娠 13～21 日）に排便減少が，妊娠 22 日および 23 日に削痩が認められた。これ以外に，いずれの用量においても，一般状態観察および投与後約 5 時間に特記すべき一般状態変化はみられなかった。

150 mg/kg/日では妊娠 7 日から投与前値からの体重減少または対照群と比較して体重増加抑制が認められ，摂餌量減少を伴っており，すべての妊娠動物の安楽殺（妊娠 22 日）または流産まで持続した。妊娠 19 日の体重は対照群と比較して最大 17.6%低値であった。75 mg/kg/日では，全投与期間（妊娠 7～21 日）に対照群と比較して体重の低値および摂餌量減少が認められた。

25 mg/kg/日では体重増加量は対照群と比較して低値であったが，体重または摂餌量の変化との関連は認められなかった。75 mg/kg/日で妊娠後期に体重の低値が認められ，25 および 75 mg/kg/日で対照群と比較して妊娠子宮重量の低値が認められ，着床後胚損失に起因したものと考えられた。2 mg/kg/日では対照群と比較して体重または妊娠子宮重量に変化は認められなかった。

25，75 および 150 mg/kg/日の流産または瀕死状態により安楽殺した動物では，特記すべき剖検所見として褐色または暗赤色の腟内容物が認められた。妊娠 29 日の剖検時に，対照群，25 および 75 mg/kg/日の各 1 例で，褐色または暗赤色の子宮または腟の内容物が認められた。これらの所見は，これらの群で対照群と比較して着床後胚損失率が高かったことに関連していた。

75 mg/kg/日では，計画剖検時まで生存した妊娠動物 1 例の着床後胚損失率は 90.9%であり，生存胎児数は 1 例であった。25 mg/kg/日では対照群と比較して，主に早期胚吸収に基づく着床後胚損失率上昇（54.0%）およびそれに伴う生存胎児割合の低値（46.0%，対照群では 91.6%）が認められた。2 mg/kg/日および 25 mg/kg/日の子宮内胎児発達ならびに 2 mg/kg/日の生存率にエトラシモドの影響は認められなかったが，25 mg/kg/日における評価可能な生存胎児は少数であった。

25 mg/kg/日の胎児 1 例で外表奇形として屈曲手が認められた。いずれの胎児にも外表変異は認められなかった。

以上，25 mg/kg/日以下では母動物毒性は認められなかった。本試験の結果から，重要なウサギ胚・胎児発生毒性試験（6.2.5 項）の投与量を 2，10 または 20 mg/kg/日に設定した。

高用量では母動物に何らかのごく軽度の毒性が発現することが望ましいとされることから（ICH S5(R3)ガイドライン），重要な試験の高用量として 20 mg/kg/日とすることは妥当と考えられた。

6.2.5. 妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書番号 TX[redacted]019，概要表 2.6.7.13 Table 25

妊娠 NZW ウサギにエトラシモド L-アルギニンを投与し，器官形成期における発生毒性および母体毒性を評価し，母体毒性および発生毒性に対する NOAEL を明らかにした。妊娠ウサギ（雌 22 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），2，10 または 20 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で妊娠 7～20 日まで経口投与した。妊娠 29 日に安楽殺し，子宮，胎盤および卵巣を検査した。

対照群またはエトラシモド投与群に，胚・胎児発生期に相当する動物をさらに 4 匹/群加え TK 評価に供した。エトラシモド投与群では妊娠 7 日および 20 日の 0（投与前），投与後 1，2，4，8 および 24 時間に，対照群では 0（投与前），投与後 1 および 24 時間にすべての動物から採血した。TK 評価に供したすべての動物を妊娠 21 日に安楽殺し，妊娠の有無を評価した。

死亡の有無および一般状態，体重および摂餌量，妊娠子宮重量，剖検および子宮パラメータ（妊娠 29 日）に基づき毒性を評価した。胎児数，早期胚吸収数および後期胚吸収数，総着床数ならびに黄体数を記録した。胎児の体重および性別，外表，内臓および骨格の奇形ならびに変異について評価した。

対照群の 1 例を，投与過誤または誤嚥と考えられる瀕死状態により，妊娠 22 日に安楽殺した。その他の動物はすべて投与期間終了時の剖検まで生存した。一般状態変化および剖検所見は認められなかった。いずれの用量においても，摂餌量および体重の変化を含む母動物毒性は認められなかった。

20 mg/kg/日では生存胎児数が少なかったため対照群と比較して妊娠子宮重量の低値が認められた。2 mg/kg/日および 10 mg/kg/日の妊娠子宮重量にエトラシモド投与の影響は認められなかった。

10 および 20 mg/kg/日では，着床後胚損失率（主に早期胚吸収）が高く，生存胎児数の減少が認められた。2 mg/kg/日における子宮内生存率ならびに 2，10 および 20 mg/kg/日における胎児体重および性比にエトラシモド投与の影響は認められなかった。

エトラシモドに関連する大動脈弓の奇形が，10 mg/kg/日（球状大動脈弓および大動脈弓狭窄）および 20 mg/kg/日（大動脈弓および後食道大動脈弓の狭窄）で認められた。また，20 mg/kg/日における胸骨分節癒合の発現頻度上昇もエトラシモドに関連するものと考えられた。10 および 20 mg/kg/日では，骨格変異として，第 1 胸骨分節より前の過剰骨化の発現頻度上昇が認められた。2 mg/kg/日ではエトラシモドに関連する奇形または変異は認められなかった。

いずれの用量においても母動物毒性は認められなかったことから，本試験における母動物毒性に関する NOAEL は 20 mg/kg/日（検討した最高用量）と判断した。この用量における C_{max} および AUC_{last} は，妊娠 7 日でそれぞれ 4.89 µg/mL および 35.0 µg·h/mL，妊娠 20 日でそれぞれ 2.88 µg/mL および 24.2 µg·h/mL であった。

胚・胎児発生に関する評価の結果から，本試験における胚・胎児発生に関する NOAEL は 2 mg/kg/日（評価した最低用量）と判断した。この用量における C_{max} および AUC_{last} は，妊娠 7 日でそれぞれ 0.258 µg/mL および 2.21 µg·h/mL，妊娠 20 日でそれぞれ 0.234 µg/mL および 1.70 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 52 に示した。

6.3. 出生前および出生後の発生に関する試験

6.3.1. ラットを用いた出生前・出生後の発生に関する経口投与用量設定試験

参考資料 APD334.TOX.012，概要表 2.6.7.11 Table 21

妊娠 Sprague Dawley ラットを用いる重要な出生前および出生後の発生に関する試験（報告書番号 APD334.TOX.011，6.3.2 項）におけるエトラシモド L-アルギニンの用量を評価するための用量設定試験を実施した。エトラシモドが妊娠ラットに及ぼす影響，ならびに妊娠，分娩および離乳までの出生児の発達に及ぼす影響について予備的に評価した。さらに，エトラシモドの TK を予備的に評価した。

F0 世代として自然繁殖ラット（雌 8 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を 0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に溶解），0.05，0.20，1.0 および 2.0 mg/kg/日（0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に溶解）の用量で，妊娠 6 日から授乳 20 日まで（妊娠 24 日に相当）に経口投与した。F1 世代の出生児にはエトラシモド L-アルギニンを直接投与しなかったが，在胎中（子宮内曝露）または授乳期間中に母乳を介し

て曝露された可能性がある。エトラシモド L-アルギニンの不溶性および 1 mg/mL 未満で生じる非特異的結合の増加を防止するため（M2.6.4.3.3），本試験ではエトラシモド L-アルギニンの溶媒対照を脱イオン水から 0.5% v/v TWEEN® 20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に変更した。

F0 世代では，母動物の生存率，母動物の観察所見，一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，自然分娩所見（妊娠持続期間，同腹児数および出生児生存率），卵巣および子宮の所見ならびに剖検所見に基づき評価した。

F1 世代では，生存率，一般状態，体重および剖検所見を評価した。

妊娠 17 日の投与後 2 時間および 4 時間ならびに授乳 20 日の投与後約 0.5，1，2，4，8 および 24 時間に，TK 用の母動物から採血した。

エトラシモドに関連した母動物の死亡，一般状態および剖検所見は認められなかった。また，妊娠期および授乳期の母動物（F0）の体重，体重増加量および摂餌量に対する影響はみられず，分娩に対する影響も認められなかった。

1.0 および 2.0 mg/kg/日では死産児の数がわずかに増加し，生存率がわずかに低下した。生後 20 日および 21 日に，0.20，1.0 および 2.0 mg/kg/日の胎児体重（雌雄合算値）が減少した。

2.0 mg/kg/日の授乳 20 日の母動物におけるエトラシモドの C_{max} は 1430 ng/mL，AUC_{last} は 9710 ng·h/mL であった。

以上，1.0 および 2.0 mg/kg/日では死産児の数がわずかに増加し，生存率がわずかに低下したが，これは背景データと類似していた。ラット胚・胎児発生に関する試験（報告書番号 TX[redacted]017，6.2.3 項）では，4 mg/kg/日で妊娠 20 日に胚吸収数の増加および生存胎児数の減少が認められ，またすべての用量（1，2，4 mg/kg/日）で内臓奇形の増加が認められた。胚・胎児発生に関する毒性試験（6.2.3 項）および本試験の結果から，重要なラットを用いた出生前・出生後の発生に関する試験（6.3.2 項）の投与量を 0.4，2 または 4 mg/kg/日に設定した。

高用量では母動物に何らかのごく軽度の毒性が発現することが望ましいとされることから（ICH S5(R3)ガイドライン），重要な試験の高用量として 4 mg/kg/日とすることは妥当と考えられた。

6.3.2. ラットを用いた出生前・出生後の発生に関する試験

報告書番号 APD334.TOX.011，概要表 2.6.7.14 Table 26

妊娠 Sprague Dawley ラットに妊娠 6～授乳 20 日（胚の着床から分娩，授乳および離乳）までエトラシモド L-アルギニンを投与し，母動物および次世代の発達への影響を評価した。F1 児の性成熟をとおして成長，発達，神経行動および生殖能を観察した。母動物を用いた妊娠および授乳期間中の TK 評価を実施し，授乳期間中の出生児の血漿中濃度を測定した。

F0 動物（雌 22 匹/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を 0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に溶解），0.4，2 または 4 mg/kg/日（0.5% v/v TWEEN®20 含有 10 mmol/L Tris 緩衝液に溶解）の用量で妊娠 6 日から授乳 20 日（分娩した動物）または妊娠 6 日から妊娠 24 日（分娩しなかった動物）まで 1 日 1 回経口投与した。投与容

量は，直近の体重に基づき 5 mL/kg とした。さらに 28 匹（陽性対照群 4 匹およびエトラシモド投与群 8 匹/群）を加えて TK 評価に供した。

F0 動物は自然分娩させた。生後 21 日に，雌雄 F1 出生児を離乳し，成長および行動への影響を評価するために試験を継続する群として雌雄 1 匹/同腹児を選択した。生後 21 日に，すべての母動物および評価を継続しなかった出生児を安楽殺した。

すべての F0 動物について，生存率，一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，自然分娩所見，TK パラメータおよび剖検所見を評価した。

すべての F1 動物について，生存率，一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，自発運動量，聴覚性驚愕反応および馴化，Morris 水迷路学習および記憶，TK パラメータ，性周期，性成熟，生殖能ならびに卵巣および子宮の検査ならびに剖検所見を評価した。成熟した F1 動物の生殖能および F2 世代出生能を評価するため，生後 92～95 日に成熟 F1 動物を交配した。

F0 世代

F0 動物へのエトラシモド投与後の忍容性は良好であり，いずれの用量においてもエトラシモドに関連する死亡は認められず，妊娠または授乳期間においていずれの用量においてもエトラシモドに関連する一般状態変化は認められなかった。4 mg/kg/日の 1 例を，分娩中の重度の一般状態の悪化により安楽殺した。妊娠 6～9 日の 2 mg/kg/日以上，妊娠 12～15 日の 4 mg/kg/日，妊娠 6～18 日の 2 mg/kg/日以上，また妊娠 18～20 日の 4 mg/kg/日で母動物の摂餌量が統計学的に有意に減少した。母動物の摂餌量の減少は授乳期間中にも継続して認められ，2 mg/kg/日では授乳 1～4 日，14～17 日，17～21 日，ならびに 4 mg/kg/日では授乳 1～21 日までの各期間で認められた。2 および 4 mg/kg/日では母動物の体重および体重増加量への影響を伴わなかったことから，母動物の摂餌量減少は毒性変化ではないと考えられた。しかしながら，授乳期間中の摂餌量減少は，離乳前の出生児の成長抑制の一因となった可能性がある。

自然分娩におけるエトラシモドの影響として，4 mg/kg/日の 1 例で難産に伴う早期の分娩終了，2 mg/kg/日以上で対照群と比較して統計学的に有意な妊娠期間延長および死産児の認められる母動物数の増加が認められた。これらの変化は，2 mg/kg/日以上で対照群と比較して死産児数の顕著な増加（2 mg/kg/日で統計学的に有意）ならびに 2 mg/kg/日で対照群と比較して統計学的に有意な出生率の低下が認められたことと一致していた。

F1 世代

F1 児の死亡が，2 および 4 mg/kg/日の主試験群でそれぞれ計 20 例と計 54 例，生後 1 日と 20 日の間（大部分は生後 0 から 4 日の間）に認められた。2 および 4 mg/kg/日の死亡動物のうち，それぞれ 8 例および 4 例が死産，それぞれ 12 例および 50 例が死亡発見であった。さらに，4 mg/kg/日では生存率および哺育率が対照群と比較して低下した（生存率の低下は統計学的に有意）。4 mg/kg/日で 1 腹あたりの生存児数が減少した。

離乳前の児では，4 mg/kg/日で脱水の疑い（皮膚弾力に基づく），胃にミルクバンドを認めない，皮膚変色，皮膚蒼白，ならびに 2 または 3 組の同腹児で腫脹が認められた。さらに，

2 mg/kg/日の 3 組の同腹児にミルクバンドが認められなかった。生後 4 日に同腹児を除いた後，4 mg/kg/日の 4 または 5 組の同腹児で脱水の疑い（皮膚弾力に基づく）が認められた。

生後 7 日に，0.4 mg/kg/日以上で出生児の体重の低値（対照群との比較）が認められた。出生児の体重低値の程度は生後 21 日まで持続したが，0.4 および 2 mg/kg/日では用量依存性がみられないこともあった。母動物へのエトラシモド投与により，全投与群で出生児の体重に影響が認められ，4 mg/kg/日で最も顕著であった。

いずれの用量においても，エトラシモドに関連した眼瞼開裂または耳介開展に対する影響は認められなかった。剖検時，いずれの用量においても離乳前の F1 動物にエトラシモドに関連した剖検所見は認められなかった。

4 mg/kg/日の雄 F1 動物においては，離乳前に認められたエトラシモドの体重への影響が離乳後も持続した。しかしながら，生後 22～92 日の離乳後期間全体にわたり，すべての用量における雌雄 F1 動物の体重増加量は対照群と同程度であった。0.4，2 または 4 mg/kg/日において，生後 22～92 日の雄 F1 動物ならびに交配前（生後 22～92 日）または妊娠期間中の雌 F1 動物に，エトラシモドに関連した摂餌量への影響は認められなかった。さらに，いずれの用量においてもエトラシモドに関連した離乳後の死亡は認められず，性成熟，生殖能および神経行動学的パラメータにエトラシモドに関連した影響は認められなかった。

雌 F1 動物では，いずれの用量においても性周期の回数または期間へのエトラシモドの影響は認められなかった。0.4，2 および 4 mg/kg/日の F1 動物における交配率，受胎率および妊娠率は，F0 母動物の対照群と同程度であった。4 mg/kg/日では着床数が対照群と比較して減少し，着床前胚損失率が対照群と比較して上昇した。そのため，4 mg/kg/日で総胚数が減少した。2 mg/kg/日以下では，卵巣，子宮および同腹児パラメータのいずれにおいてもエトラシモドによる影響は認められなかった。

本試験結果に基づき，母動物毒性に関する NOAEL は 4 mg/kg/日（検討した最高用量）であり，妊娠 17 日における母動物の C_{max} 値は 3.52 µg/mL および AUC_{last} 値は 51.20 µg·h/mL であった。分娩に対する NOAEL は 2 mg/kg/日であり，妊娠 17 日における母動物の C_{max} は 1.64 µg/mL および AUC_{last} は 21.60 µg·h/mL であった。すべてのエトラシモド投与群で出生児の体重の低値が認められたため，離乳前の発生に関する NOAEL は得られなかった。また，雌雄 F1 動物における離乳後の発生に関する NOAEL は 2 mg/kg/日であり，授乳 20 日における母動物のエトラシモド C_{max} は 1.340 µg/mL および AUC_{last} は 11.40 µg·h/mL であった。

6.4. 幼若動物を用いた試験

小児患者におけるエトラシモドの安全な使用を裏付けるため，幼若ラットを用いた毒性試験を実施した。なお，幼若動物を用いた毒性試験は，ICH S11 ガイドライン発出前に実施された。

6.4.1. 幼若ラットを用いた経口投与用量設定試験

報告書番号 APD334.TOX.008，概要表 2.6.7.11 Table 22

幼若 Sprague Dawley ラットにエトラシモド L-アルギニンを投与し，全身への影響および TK プロファイルを評価した。幼若 Sprague Dawley ラット（雌雄 6 匹/群）に，エトラシモド L-アルギ

ニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），25，100 または 200 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で，生後 21 日から生後 34 日までの 14 日間 1 日 1 回経口投与した。

TK 評価のため，さらにエトラシモド投与群に雌雄各 39 匹/群を，溶媒対照群に雌雄各 9 匹を加えて投与した。試験 1 日および試験 14 日（25，100 mg/kg/日のみ）の投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に採血した。

死亡の有無，一般状態，体重および摂餌量，剖検所見ならびに臓器重量に基づき毒性を評価した。

200 mg/kg/日の TK 評価群の雌 1 例を，瀕死状態のため試験 6 日（生後 26 日）に安楽殺した。動物愛護の観点から，生存した 200 mg/kg/日の主試験群および TK 評価群の動物を，試験 7 日（生後 27 日）に安楽殺した。200 mg/kg/日では，エトラシモドに関連する毒性所見として，早期中止前に体重の低値，摂餌量減少ならびに円背位，削痩，皮膚弾力消失および立毛が認められた。その他の動物はすべて，予定剖検時まで生存した。

25 および 100 mg/kg/日の雌雄で，対照群と比較して体重の低値および摂餌量減少，肝重量の増加ならびに脾臓重量の減少が認められた。

この用量設定試験結果に基づき，重要な幼若ラットを用いた毒性試験の用量として，200 mg/kg/日未満が推奨された。100 mg/kg/日の定常状態（投与 14 日）における C_{max} および AUC_{last} は，それぞれ 30.5 µg/mL および 370 µg·h/mL であった。

6.4.2. 幼若ラットを用いた 7 週間経口投与毒性試験および 4 週間回復性試験

報告書番号 APD334.TOX.009，概要表 2.6.7.15 Table 27

幼若 Sprague Dawley ラット（生後 21 日）にエトラシモド L-アルギニンを 1 日 1 回 7 週間（49 日間）経口投与し，毒性および TK を評価した。幼若 Sprague Dawley ラット（雌雄各 15 例/群）に，エトラシモド L-アルギニンを 0（溶媒対照：L-アルギニン塩酸塩を脱イオン水に溶解），10，30 または 100 mg/kg/日（脱イオン水に溶解）の用量で経口投与した。

TK 評価のため，さらにエトラシモド投与群に雌雄各 28 匹/群を，溶媒対照群に雌雄各 4 匹を追加し投与した。試験 1 日（雌雄 28 匹/エトラシモド投与群）および試験 49 日（雌雄 10 匹/エトラシモド投与群）に，投与前，投与後 0.5，1，2，4，6，8，12 および 24 時間に採血した。

死亡の有無，一般状態，体重および摂餌量，眼科学的検査，機能観察総合評価，性成熟，性周期初日，自発運動，Morris 水迷路学習，聴覚性驚愕反応，臨床病理検査，骨および体長，剖検所見，臓器重量ならびに病理組織学的検査に基づき，毒性を評価した。

エトラシモドを 1 日 1 回経口投与したとき，いずれの用量においても 7 週間の投与期間における忍容性は良好であった。エトラシモドに関連した死亡は認められず，評価したいずれのパラメータおよび評価項目においてもエトラシモドによる毒性変化は認められなかった。

対照群と比較してエトラシモドに関連した体重の低値および体重増加抑制ならびに摂餌量減少が，すべての投与群の雌雄で認められた。しかしながら，いずれの投与群においても，同時期

の対照群よりも遅いものの，投与期間を通して体重は増加し続けたため，体重への影響はわずかであった。したがって，これらの変化は毒性ではないと判断した。

30 mg/kg/日以下の雄では，性成熟への影響は認められなかった。100 mg/kg/日の雄では，エトラシモドに関連した変化として包皮分離の週齢延長がみられたが（対照群 43.7 日に対して 47.0 日：統計学的に有意な延長），体重増加量の減少に伴う二次的な変化であり，毒性ではないと判断した。雌では，いずれの投与群においてもエトラシモドに関連した変化は認められなかった。

投与期間終了時の臨床病理検査では，10 mg/kg/日以上において，全例で中等度の白血球数およびリンパ球数の減少（休薬期間中に回復傾向が認められた），全例で軽度の造血抑制（好酸球数，単球数およびその他の細胞数の減少，休薬期間中に完全に回復した），全ての雌で軽微な赤血球パラメータ減少（赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，病理組織学的所見を伴わない），全例で軽微な蛋白パラメータへの影響（総蛋白，アルブミンおよびグロブリンの低下，回復性あり）が認められた。100 mg/kg/日では，全例で可逆的な反応性血小板数増加が認められた。これらの所見はいずれも変化の程度が小さい，または臓器機能の障害を示唆する所見を伴わない，あるいは関連する一般状態変化が認められなかったことから，毒性ではないと判断した。

エトラシモドと関連するものの用量依存性のみられない脾臓重量の減少が，すべての用量の雌雄で認められた。投与期間終了時に，すべての用量の雌雄で脾臓，胸腺，下顎および腸間膜リンパ節におけるリンパ球が減少したが，休薬期間終了時には回復または回復傾向を示した。100 mg/kg/日では，腎臓にエトラシモドに関連した慢性進行性腎症の増悪が認められ，回復期間終了時まで持続した。これらの所見はいずれも変化の程度が小さく，臓器機能障害を示唆する所見を伴わず，一般状態変化も認められなかったことから，毒性ではないと考えられた。

本試験の結果に基づき，エトラシモドの NOAEL は 100 mg/kg/日と考えられた。100 mg/kg/日の試験 49 日における C_{max} は，雄で 60.2 µg/mL および雌で 72.3 µg/mL，AUC_{24} は雄で 631 µg·h/mL および雌で 957 µg·h/mL であった。TK パラメータの詳細については，M2.6.5 Table 23 に示した。

7. 局所刺激性試験

エトラシモドを用いた局所刺激性試験は実施していないが，ラットに 26 週間までおよびイヌに 39 週間までエトラシモドを 1 日 1 回反復経口投与した重要な毒性試験を通してエトラシモドの局所（消化管）の忍容性を評価した。その結果，特記すべき消化管の病理組織学的所見は認められなかった（3 項）。

8. その他の毒性試験

8.1. 不純物を用いた試験

ICH M7(R1)ガイドラインに準拠し，エトラシモド L-アルギニンおよびその類縁物質について遺伝毒性/変異原性のハザード評価試験を実施した。エトラシモド原薬の製造工程に関連するまたは分解生成物となる可能性がある 38 の不純物を，DEREK Nexus®および SARAH Nexus®システムを用いた（Q）SAR 分析，または既存の文献のレビューあるいは他の関連情報により評価し

た。M7 に基づく分類の結果を M3.2.S.3.2.2.2 に要約した。遺伝毒性のリスクが低いと評価された化合物と構造的に類似している化合物または将来ロットの原薬に含まれる可能性が低い化合物については評価しなかった。

検討した不純物または潜在的不純物のうち，8 種（ *不純物A ， *不純物B，*不純物C， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F， *不純物G および *不純物H）が潜在的遺伝毒性不純物として同定された。 *不純物A は，エトラシモドの合成における出発物質の 1 つである *不純物B の製造に用いられる原料である。 *不純物E は出発物質である *不純物C の製造に用いられる。 *不純物D は出発物質である AR431929 の製造に用いられる原料である。 *不純物F および *不純物G は *不純物B の製造工程で生じる可能性のある工程由来不純物である。 *不純物H は AR431929 および *不純物C が AR423796/AR423800 へ変換される過程で生じる単離されない中間体（潜在的な工程由来不純物）である。 *不純物B は Ames 試験で変異原性を示さないためクラス 5 に分類されたが， *不純物A ， *不純物C および *不純物D はクラス 2 に，*不純物E ， *不純物F， *不純物G および *不純物H はクラス 3 に分類されると考えられた。すべてのクラス 2 およびクラス 3 の化合物は，ICH M7 が規定する管理戦略のオプションに従い管理される（M3.2.S.3.2）。評価した他のすべての化合物は，in silico 解析（DEREK Nexus®および SARAH Nexus®）または専門家レビューに基づき非変異原性と予測/評価された。これには市販用原薬ロットで検出される 2 つの不純物である *不純物I および *不純物J が含まれる。 *不純物I は工程由来不純物および分解生成物であり，クラス 5 の不純物に分類される。 *不純物I はマウスを用いた 91 日間投与試験，ラットを用いた 4 週間，3 ヵ月間および 6 ヵ月間毒性試験，ならびにイヌを用いた 3 ヵ月間および 9 ヵ月間毒性試験で用いたロットにおいて検出された。 *不純物J はエトラシモドの合成工程で得られる中間体であり，クラス 5 の不純物に分類される。 *不純物J はラットおよびイヌの 4 週間毒性試験で用いたロットにおいて検出された。

8.1.1. *不純物B：マイクロ Ames 試験

参考資料 TX[redacted]015，概要表 2.6.7.16 Table 28

マイクロ Ames スクリーニングアッセイを用いて， *不純物B（エトラシモドの不純物）の変異原性を評価した。Aroclor 誘導ラット肝 S9 代謝活性化系の存在下および非存在下で，*S. typhimurium* 試験菌株 TA97a，TA98 および TA100 を 0（溶媒対照：DMSO），0.25，2.5，12.5，25，75 または 250 µg/ウェルにてインキュベートした。

TA97a および TA100 を代謝活性化系の存在下で 250 µg/ウェルにてインキュベートしたとき，細胞毒性（復帰変異コロニー数の減少）が認められた。 *不純物Bは，試験したいずれの菌株においても変異原性を示さなかった。

8.1.2. *不純物B：細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号 APD334.TOX.010，概要表 2.6.7.16 Table 29

Aroclor 誘導ラット肝 S9 代謝活性化系の存在下および非存在下で，*S. typhimurium* 試験菌株 TA98，TA100，TA1535，TA1537 および *E. coli* 試験菌株 WP2 uvrA を用いて *不純物B（エトラシモドの不純物）の変異原性を評価した。 *不純物B の潜在的な変異原性は，以前にマイクロ

Ames スクリーニングアッセイで評価されているが（8.1.1 項），GLP 適用の細菌を用いる復帰突然変異試験において *不純物B をさらに評価した。 *不純物B の溶媒として DMSO を用いた。

試験は 2 部構成で実施した。すなわち，被験物質の沈殿および細胞毒性ならびに各菌株の処理濃度設定（S9 活性化系の存在下および非存在下）を検討する予備試験ならびに重要な変異原性試験である本試験を実施した。

予備試験では，6.67，10.0，33.3，66.7，100，333，667，1000，3333 または 5000 µg/プレートで評価した。細胞毒性は認められなかったが，すべての条件下において 1000 µg/プレート以上で沈殿が認められた。

本試験では，50.0，150，500，1500 または 5000 µg/プレートで評価した。細胞毒性は認められなかったが，すべての条件下において 1500 µg/プレート以上で沈殿が認められた。S9 活性化系の存在下および非存在下にかかわらず，いずれの試験菌株においても変異原性陽性は認められなかった。

以上，本試験において，代謝活性化系の存在下および非存在下にかかわらず， *不純物B は数種のヒスチジン要求性の *S. typhimurium* 試験菌株およびトリプトファン要求性の *E. coli* 試験菌株 WP2 uvrA において復帰突然変異を誘発しなかった。

8.1.3. *不純物C：細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書番号 APD334.TOX.006，概要表 2.6.7.16 Table 30

Aroclor 誘導ラット肝 S9 代謝活性化系の存在下および非存在下で，*S. typhimurium* 試験菌株 TA98，TA100，TA1535，TA1537 および *E. coli* 試験菌株 WP2 *uvr*A を用いて *不純物C（エトラシモドの不純物）の変異原性を評価した。 *不純物C の溶媒として DMSO を用いた。

試験は 2 部構成で実施した。すなわち，被験物質の沈殿および細胞毒性ならびに各菌株の処理濃度設定（S9 活性化系の存在下および非存在下）を検討する予備試験ならびに重要な変異原性試験である本試験を実施した。

予備試験では，6.67，10.0，33.3，66.7，100，333，667，1000，3333 および 5000 µg/プレートで評価した。3333 µg/plate 以上のすべての菌株（代謝活性化系の存在下および非存在下における WP2 *uvrA* を除く）において，沈殿物が認められた。33.3，66.7，100，667，1000 または 3333 µg/プレート以上のすべての条件下（代謝活性化系の存在下および非存在下における WP2 *uvrA* を除く）で細胞毒性が認められた。WP2 *uvr*A（代謝活性化系の存在下および非存在下）は，溶媒対照で試験成立条件が満たされなかったため評価しなかった。TA98 および TA1537 では代謝活性化系の存在下および非存在下で，ならびに TA100 では代謝活性化系の存在下で，変異原性を示す復帰突然変異の増加（溶媒対照と比較して最大で 3.2～6.1 倍）が認められた。

細胞毒性および沈殿の結果に基づき，本試験の最高濃度を 333 µg/プレート（代謝活性化系の非存在下において TA98，TA100，TA1535 および TA1537），3333 µg/プレート（代謝活性化系の存在下において TA100，TA1535，TA1537）および 5000 µg/プレート（代謝活性化系の存在下において TA98，WP2 uvrA，ならびに代謝活性化系の非存在下において WP2 *uvr*A）とした。

本試験では，33.3，100，333，667，1000 または 3333 µg/プレート以上では，すべての条件下で細胞毒性が認められた。3333 µg/プレート以上では，代謝活性化系の存在下において全菌株で，代謝活性化系の非存在下において WP2 *uvr*A で沈殿物が認められた。TA98 および WP2 *uvr*A では代謝活性化系の存在下および非存在下で，TA1537 では代謝活性化系の存在下で，変異原性陽性反応（溶媒対照と比較して最大で 3.5～36.9 倍）が認められた。

TA100 では代謝活性化系の存在下で，また，TA1537 では代謝活性化系の非存在下で，擬陽性反応（溶媒対照と比較してそれぞれ最大 1.5 倍および 2.3 倍）が認められた。この増加は，それぞれの溶媒対照の背景データの範囲外であったが，試験計画書で規定した陽性判定基準を満たしていなかった。

以上の結果から， *不純物Cは評価したヒスチジン要求性の *S. typhimurium* 試験菌株およびトリプトファン要求性の *E. coli* 試験菌株 WP2 uvrA において復帰突然変異を誘発することが示された。

8.2. 光毒性試験

8.2.1. BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたニュートラルレッド取り込み試験

報告書番号 TX[redacted]001，概要表 2.6.7.16 Table 31

紫外線の照射下および非照射下において BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞をエトラシモド L-アルギニンで処理したときの相対細胞生存率に基づき，エトラシモドの光毒性を評価した。陽性対照としてプロメタジンを用いた。用量設定試験では，0.03，0.10，0.316，1.0，3.16，10.0，31.6 および 100 µg/mL で評価した。本試験では，0.316，0.562，1.00，1.78，3.16，5.62，10.0 および 17.8 µg/mL で評価した。本試験は，OECD ガイドライン 432[2]および ICH S10 ガイドラインに従って実施した。

陽性対照であるプロメタジンにより細胞毒性が認められ，本試験の成立に必要なすべての標準的な評価基準を満たしていた。本試験において，エトラシモドは光毒性を示さなかった。

9. 考察及び結論

エトラシモドの臨床開発および承認申請のため，一連の非臨床毒性試験を実施した。探索的な用量設定試験ならびに CD-1 マウス，Sprague Dawley ラットおよびビーグル犬を用いて，それぞれ最長 13，26 および 39 週間反復経口投与した重要な毒性試験および TK 試験を実施した。その他，標準的な一連の in vitro および in vivo 遺伝毒性試験，CD-1 マウスおよび Sprague Dawley ラットを用いた長期がん原性試験，Sprague Dawley ラットおよび NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験，Sprague Dawley ラットを用いた幼若動物毒性試験ならびに in vitro 光毒性試験を実施した。また，エトラシモドに関連する不純物およびその代謝物について安全性の評価を行った。これらの一連の毒性試験は，ICH M3(R2)ガイドラインに準拠しており，ヒトにおけるエトラシモドの長期経口投与を支持することを目的としている。

In vivo 試験は，臨床で用いられる 1 日 1 回経口投与で実施した。すべての毒性試験は米国で実施し，重要な毒性試験は 21 CFR Part 58 に記載された FDA の GLP 原則および欧州連合の規制当局（OECD GLP 原則），日本（厚生労働省），ならびにその他の OECD データ相互受入れ制度の署名国の原則に準拠して実施した。

UC 治療のための予定臨床用量は，エトラシモド 2 mg である。以下の非臨床安全性およびリスク評価の考察では，予定臨床用量における曝露量（AUC_{24}）である 2.163 μg·h/mL と比較した（APD334-002 試験）。

9.1. 一般毒性

一連の毒性試験で，マウス，ラットおよびイヌにそれぞれ 60，150 および 15 mg/kg/日を反復投与したとき，エトラシモドに関連した死亡・瀕死は認められず，用量制限毒性も認められなかった。各動物種における重要な毒性試験の用量は，より短期間の探索的な用量設定試験に基づき決定した。重要な試験の最高用量はそれぞれの探索的な用量設定試験における MTD または NOAEL に相当する。エトラシモドに関連した所見の多くは毒性学的意義の乏しいものと判断され，臨床でモニタリング可能であり，また投与中止により回復性を示した。動物種間を通して最も多く認められた毒性所見として，摂餌量の減少を伴う体重の低値または体重増加抑制が認められた。すべての動物種で認められた主要な標的臓器は，リンパ組織，肺および肝臓であった。さらに，イヌでは心臓が標的臓器として同定された。

すべての動物種で摂餌量減少に関連する体重の低値および体重増加抑制が認められた。マウス，ラットおよびイヌの LOEL（それぞれ 200，25 および 2 mg/kg/日）は，臨床推奨用量である 2 mg/日でのヒト曝露量のそれぞれ 865/532 倍（雄/雌），76/125 倍（雄/雌）および 56 倍（雌雄合算値）であった。これらの体重パラメータの変化は概して用量依存的であり，主に投与初期に発現し，一過性であり，投与中止後に回復性を示した。体重および摂餌量への影響はエトラシモドの作用機序に起因すると考えられるが，中枢神経系における作用を介するものではないと考えられている。ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィーでは脳内にエトラシモド関連放射能が検出されたにもかかわらず，体重および摂餌量の変化が認められた用量において，安全性薬理試験および一般毒性試験ではエトラシモドに起因する中枢神経系の所見（活動性低下，振戦，痙攣など）は認められなかった。さらに，エトラシモドを投与した動物で認められた体重および摂餌量への影響は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[3]，シポニモド[4]，ozanimod[5]，ponesimod[6]）の評価に用いられた非臨床動物種（マウス，Wistar ラット，ビーグル犬，カニクイザル）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられる。

すべての動物種で，エトラシモドに関連した末梢，一次および二次リンパ組織のリンパ球減少が認められた。マウス，ラットおよびイヌ（それぞれ 20 mg/kg/日以上，25 mg/kg/日以上および 0.02 mg/kg/日以上）において，臨床推奨用量である 2 mg/日投与時のヒト曝露量と比較してそれぞれ約 102 倍以上，約 76 倍以上および約 0.58 倍以上の曝露量でリンパ球数の減少が認められた。エトラシモドは $S1P_1$ を標的とし，リンパ節からのリンパ球移出の制限が主な薬力学的作用であることから，この作用は薬理作用に起因するものである可能性が高く毒性ではないと判断した。リンパ球数の減少が認められたものの，一般毒性試験では日和見感染を示唆する所見は認められなかったことから，エトラシモドを投与した動物においても免疫系が機能していることが示された。ラットを用いた毒性試験では，リンパ球への影響に明らかな用量依存性がみられなかったことから，薬理作用を示す用量を超える場合（実験的大腸炎のモデルマウスにおける有効用量の約 10 倍～約 330 倍，M2.6.2.2.2.2）には $S1P_1$ への作用が飽和する可能性が示唆された。

ラットおよびイヌにおいて，腸間膜リンパ節および気管/気管支リンパ節に洞赤血球増加/赤血球貪食細胞が認められた。これらの所見は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[7]，シポニモド[8]）の評価に用いられたマウスで認められており，S1P 受容体調節薬の薬理作用に起因するクラスエフェクトと考えられる。

マウス，ラットおよびイヌに，臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量のそれぞれ約 102 倍以上，約 76 倍以上および約 5.9 倍以上の曝露量となるエトラシモドを投与したときに肺重量の増加が認められた。マウスおよびイヌでは，肺重量の増加は肺胞組織球症を伴っており，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日のヒト曝露量のそれぞれ約 211 倍以上および約 5.9 倍以上であった。イヌでは，エトラシモドに関連するものの毒性学的意義の乏しい肺胸膜の線維化が 2 mg/kg/日以上（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 50 倍以上）で認められ，これは投与中止により回復した。マウスでも，肺のフィブリン沈着が 20 mg/kg/日以上（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 102 倍以上）で認められた。肺重量および肺の変化は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[3]，シポニモド[4]，ozanimod[5]，ponesimod[6]）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられ，これらの所見は肺における血管透過性の亢進に起因すると考えられる[9]。エトラシモドに関連した肺への影響が認められたものの，低酸素状態に感受性の高い組織（脳など）に機能的な影響または形態学的変化は認められなかった。

肝臓の所見として，エトラシモドを投与したマウス，ラットおよびイヌで，肝重量の増加，小葉中心性/汎小葉性肝細胞肥大，肝細胞壊死，胆管過形成または総ビリルビン上昇が認められた。マウス，ラットおよびイヌで認められたこれらの所見は，臨床推奨用量である 2 mg/日を投与した時のヒト曝露量のそれぞれ約 102 倍，約 76 倍および約 402 倍の曝露量から認められた。ラットおよびイヌでは，血清中の肝酵素，コレステロール，総蛋白，グロブリンおよびアルブミンの値に変化が認められた。ラットおよびイヌのいずれにおいても，投与に関連した血液凝固パラメータ（APTT，PT）の延長が認められたが，止血に対する影響を示唆する所見は認められなかった。肝機能パラメータおよび凝固パラメータに対するエトラシモドの影響は，投与中止により概して回復性を示した。

イヌの心臓にエトラシモドに関連した毒性学的意義の乏しい血管壁肥厚および中膜過形成が認められたが（臨床推奨用量である 2 mg/日を投与したときのヒト曝露量の約 24 倍），テレメトリー装着イヌを用いた心血管系に関する評価（M2.6.2.4.1.2）ならびにイヌの 3 ヵ月間および 9 ヵ月間投与毒性試験ではこれに関連した心筋の変性または壊死，うっ血性心不全，心電図パラメータの定性的または定量的な変化は認められなかった。テレメトリー装着イヌにおけるエトラシモドに関連する変化として，40 mg/kg（最高用量）でのみ投与後 2～4 時間に収縮期血圧（11.7%），拡張期血圧（14.2%）および平均動脈圧（12.4%）の一過性かつ軽度の上昇（対照群との比較）が認められたが，脈圧への影響はみられなかった。いずれの用量においても，心拍数，体温または心電図パラメータ（定性または定量的）にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。イヌに 40 mg/kg を投与したときの C_{max} は，臨床推奨用量における総 C_{max}（0.113 µg/mL）の約 376 倍であった。

一般毒性試験の NOAEL および臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量に対する曝露量比を Table 3 に示す。いずれの動物種においても，長期間の反復投与による NOAEL の低下，あるいは所見の発現頻度または重症度の上昇は認められなかった。

Table 3.　重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比

毒性試験	NOAEL (mg/kg/日)	AUC (μg·h/mL)[a]		曝露量比[b]	
		M	F	M	F
マウス					
91 日間	20	331	220	153	102
ラット					
4 週間	150	700	1290	324	596
3 ヵ月間	200	1010	1730	467	800
6 ヵ月間	150	1440	3180	666	1470
イヌ					
4 週間	< 20	925	910	428	421
3 ヵ月間	15	1030	1000	476	462
9 ヵ月間	15	879	861	406	398

[a] AUC は反復投与毒性試験の平均血漿中濃度から算出した。試験終了時または試験終了時付近の値を示す。

[b] 曝露量比は，毒性試験における AUC_{24} または AUC_{last}（M2.6.7.3 Table 3）および健康被験者にエトラシモド 2 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における AUC_{24}（2.163 μg·h/mL，APD334-002 試験）から算出した。

9.2. 遺伝毒性

細菌を用いる in vitro 復帰突然変異試験，HPBL を用いた in vitro 染色体異常試験および雌雄ラットを用いた in vivo 小核試験において，エトラシモドの遺伝毒性を評価した。ICH S2(R1)ガイドラインに準拠し，各試験の最高用量を決定し評価した。エトラシモドは，復帰突然変異試験ではすべての試験菌株において代謝活性化系の存在下および非存在下のいずれにおいても変異原性陰性であり，in vitro 染色体異常試験では評価したすべての条件下において染色体の構造異常誘発性/異数性誘発性陰性と考えられた。In vivo 小核試験では，MTD である最高用量（300 mg/kg/日）の雌ラットにおける骨髄小核誘発性は弱陽性と判断された。

骨髄細胞を用いた in vivo 小核試験においてエトラシモド 300 mg/kg/日を雌ラットに投与したとき，陽性基準を満たす統計学的に有意な反応が認められたが，OECD ガイドライン 474[1]「哺乳類赤血球小核試験」に記載される明らかな小核誘発性と判定する 3 つの基準すべてを満たしていなかった。OECD ガイドライン 474 に基づくと，以下 a~c の全てに該当する場合に，被験物質は明らかに陽性と判定される。a) 少なくとも 1 つの投与群で，小核含有幼若赤血球の出現頻度が同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており，b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合に，少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性が見られ，c) 当該結果は陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。当該試験において傾向検定は実施しなかったが，300 mg/kg/日群の雌で認められた小核細胞の発現頻度は陰性対照の 95%管理限界の範囲内であり，試験施設の過去の背景データの範囲内であった。

エトラシモドは in vitro 遺伝毒性試験で遺伝毒性陰性であること，および in vivo 小核試験の高用量（300 mg/kg/日）における骨髄毒性が認められたことに基づく科学的根拠の重要度（weight of evidence）評価から，エトラシモドはラットに遺伝毒性を示さず，ヒトに遺伝毒性リスクを示す可能性も低いと考えられた。

9.3. がん原性

マウスおよびラットを用いた 2 つの長期（104 週間）がん原性試験を実施し，エトラシモドのがん原性を評価した。これらの試験では，ICH S1C(R2)ガイドラインに従い，マウスを用いた 13 週間毒性試験およびラットを用いた 26 週間毒性試験の所見および MTD に基づき用量を設定した。

マウスを用いた 104 週間経口投与がん原性試験（報告書番号 APD334.TOX.003）では，6 mg/kg/日以上の雌雄で血管腫および血管肉腫の発現頻度の上昇が認められた。本試験における血管肉腫および血管腫に対する NOEL は 2 mg/kg/日（臨床曝露量の 19 倍）であり，LOEL は 6 mg/kg/日（臨床曝露量の 42 倍）であった。血管腫および血管肉腫は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[3]，シポニモド[4]，ozanimod[5]，ponesimod[6]）のクラスエフェクトと一致しており，マウスのみで認められた。

2 年間のマウスがん原性試験で認められた同様の所見の LOEL に基づく安全域の比較を Table 4 に示す。フィンゴリモドと ozanimod については，それぞれ腫瘍の所見（悪性リンパ腫も認められる）が異なること，および動物モデル（Tg.rasH2 マウス，26 週間）が異なることから除外した。なおフィンゴリモドの米国添付文書に基づき，LOEL である 0.025 mg/kg/日における曝露量は，ヒト推奨用量（0.5 mg/kg）を投与したときの曝露量よりも低い（体表面積換算，mg/m^2）ことが示されている。

血管肉腫および血管腫に対するエトラシモドの安全域（15 倍）は，シポニモド（5 倍）または ponesmod（12 倍）よりも広いことが示された（Table 4）。さらに，エトラシモドとは異なり，シポニモドおよび ponesmod を用いた 2 年間マウスがん原性試験では，血管肉腫および血管腫に対する NOEL は得られなかった。

Table 4. S1P 受容体調節薬による血管肉腫および血管腫に対する安全域

S1P 受容体調節薬	LOEL (mg/kg/日)	HED (mg/m^2)	RHD (mg/日)	RHD (mg/m^2)	安全域 [a]	曝露量比
シポニモド[4]	2	6	2	1.23	5	NA[b]
ponesmod[6]	50	150	20	12.33	12	5
エトラシモド	6	18	2	1.23	15	42
エトラシモド	2[c] (NOEL)	6	2	1.23	5	19

HED：ヒト等価用量，RHD：臨床推奨用量
[a] 安全域の算出: HED (mg/m^2) ÷ RHD (mg/m^2).
[b] シポニモドを用いた 104 週間マウスがん原性試験では AUC を算出していない（シポニモド M2.6.7.2）。
[c] マウス 104 週間がん原性試験における血管肉腫および血管腫に対する無作用量（報告書番号 APD334.TOX.003）

マウスにおける血管肉腫および血管腫のクラスエフェクトは，ヒトに外挿されない種特異的な分子メカニズムを介したものであることが示唆されている[10]。シポニモドを用いたラット 3 ヵ月間およびマウス 9 ヵ月間の in vivo メカニズム検討試験では，経口投与後に血管内皮細胞の活性化が認められた。しかし，マウスでのみ血管内皮細胞の増殖および血中 PLGF2 の持続的な増加が認められた。このことから，血管内皮細胞の持続的活性化，有糸分裂誘発，および PLGF2 刺激により，血管新生が持続し，血管肉腫または血管腫形成に至る可能性が高いとの仮説が提唱

されている。そこで，マウス，ラットおよびヒトの初代内皮細胞を用いて，この仮説を検証する in vitro 試験が実施され，シポニモドによりマウス血管内皮細胞では増殖および PLGF2 の放出が認められたが，ラットおよびヒトの血管内皮細胞では認められなかった[10]。これらの結果から，ヒト血管内皮細胞では in vivo において S1P 受容体調節薬に対する増殖反応は起きないこと，マウスで認められた血管腫または血管肉腫は臨床に外挿されないことが示唆された。

この考察を裏付ける結果として，エトラシモド（0，2，6 または 20 mg/kg/日）をラットに最長 91 週間経口投与したとき，評価したいずれの用量においても発がん性は認められなかった。非腫瘍性病変として局所性の視床の鉱質沈着が全用量の雌雄に認められた。この所見は関連する壊死またはその他の組織損傷は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。エトラシモドを用いた 104 週間マウスがん原性試験および既承認の S1P 受容体調節薬を用いたラットがん原性試験では，同様の所見は認められなかった。ラットでは，検討した最高用量である 20 mg/kg/日における曝露量は，臨床推奨用量である 2 mg/日をヒトに投与した時の曝露量の約 80 倍（雄）～179 倍（雌）高かった。

以上のように，マウスで認められた血管腫または血管肉腫はヒトへ外挿されないと考えられるが，当該事象については添付文書案（1.8.1）にて注意喚起を行っている。

臨床試験および市販後における血管腫／血管肉腫の発現状況については，M2.7.4 を参照のこと。

9.4. 生殖発生毒性

ラットおよびウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施し，ICH S5(R3)ガイドラインで規定される生殖発生のすべてのステージを評価した。すなわち，雌雄ラットを用いた受胎能および着床までの初期胚発生試験，雄ラットの精子形成に対する影響を評価する試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験および重要な試験，ラットを用いた出生前および出生後の発生に関する試験を実施した。これらの試験では，ICH S5(R3)ガイドラインに基づき用量を設定した。

評価したいずれの用量においても，雄の精子形成または受胎能ならびに雌の初期胚発生に対するエトラシモドの影響は認められなかった。受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は雄で 200 mg/kg/日，雌で 4 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量のそれぞれ約 467 倍および約 21 倍であった（Table 5）。

ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で器官形成期にエトラシモドを投与したところ，いずれの動物種においても着床後胚損失率の上昇および生存胎児数の低下が認められた。ラットでは，4 mg/kg/日以上で胎児の全身性浮腫，胎児の局所性浮腫，髄膜ヘルニア，短尾および二分脊椎の外表奇形が認められたが，2 mg/kg/日で胎児の外表奇形はみられなかった。内臓検査では，1 mg/kg/日以上でエトラシモドに関連する大動脈弓，大動脈肺動脈中隔欠損，および心室中隔欠損症の内臓奇形，ならびに内臓変異として腕頭動脈短小が認められた。ウサギでは，10 mg/kg/日以上でエトラシモドに関連する胎児の大動脈弓の内臓奇形および骨格変異が認められ，20 mg/kg/日および 25 mg/kg/日ではそれぞれ胸骨分節癒合および屈曲手の骨格奇形も認められた。しかしながら，2 mg/kg/日ではエトラシモドに関連する奇形または発生変異は認められなかった。これらの結果に基づき，ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する NOAEL

は，それぞれ 1 mg/kg/日未満および 2 mg/kg/日と考えられた。ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する NOAEL における母動物の AUC は，臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の 5 倍未満および 0.8 倍であった。ラットおよびウサギの母動物に関する NOAEL はそれぞれ 4 mg/kg/日および 20 mg/kg/日であり，そのときの母動物の曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 21 倍および約 11 倍に相当する（Table 5）。ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において低曝露量域で認められた胎児の死亡および催奇形性は既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[3]，シポニモド[4]，ozanimod[5]，ponesimod[6]）でも認められており，S1P 受容体調節薬のクラスエフェクトと考えられる。なお，$S1P_1$ 受容体が血管発達および神経発達を含む胚形成に重要な役割を果たすことが報告されている[11]。このことから，妊婦または妊娠している可能性のある女性は投与禁忌とし，ラットおよびウサギで胚・胎児発生への影響が認められたことについて，添付文書案（1.8.1）にて注意喚起を行っている。

ラットを用いた重要な出生前および出生後の発生に関する試験では，4 mg/kg/日で分娩への影響が認められ，分娩中の重度の状態悪化により妊娠 22 日に F0 雌 1 例を安楽殺した。2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日では授乳期間中の母動物の摂餌量が減少し，離乳前の出生児の体重の低値と関連していた。生後 0 日と 4 日の間に，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日のそれぞれ 8 例および 4 例が死産となり，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日のそれぞれ 12 例および 50 例の出生児が死亡発見された。これに伴い，2 mg/kg/日および 4 mg/kg/日で生存率が，4 mg/kg/日以上で哺育率が低下した。生後 7 日から 21 日では，エトラシモドを投与したすべての群で出生児の体重の低値が認められた。4 mg/kg/日の雄の出生児においては，離乳前に認められたエトラシモドの体重への影響が離乳後も持続した。4 mg/kg/日の雌の出生児では着床数が対照群と比較して減少し，着床前胚損失率が上昇した。母体毒性に関する NOAEL は 4 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 24 倍であった。分娩に関する NOAEL は 2 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 10 倍であった。すべての用量で出生児の体重への影響（毒性学的意義のある変化）が認められたため，離乳前の F1 動物に関する NOAEL は得られなかった。さらに，離乳後の F1 動物に関する無毒性量は 2 mg/kg/日であり，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 5 倍であった。F0 動物および F1 動物で認められた所見は，既承認の S1P 受容体調節薬（フィンゴリモド[3]，シポニモド[4]，ozanimod[5]，ponesimod[6]）で認められた所見およびそのときの曝露量比と類似していたが，エトラシモドでは F1 動物における神経行動学的な影響は認められなかった。

生後 21 日の幼若ラットに最高 100 mg/kg/日のエトラシモドを 1 日 1 回 7 週間投与したとき，認められたエトラシモドに関連する所見は薬理作用に起因するものであり，成熟ラットを用いた反復投与毒性試験で認められた所見と一致していた。幼若ラットで認められた所見は，体重抑制および摂餌量減少，リンパ球数の減少およびそれに関連する血液学的所見ならびに脾臓重量の減少であった。幼若ラットにおけるエトラシモドの NOAEL は 100 mg/kg/日と考えられ，そのときの曝露量は臨床推奨用量である 2 mg/日におけるヒト曝露量の約 442 倍であった。

重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比を Table 5 に示す。

Table 5.　重要な生殖発生毒性試験におけるエトラシモドの NOAEL および曝露量比

毒性試験	NOAEL (mg/kg/日)	AUC (μg·h/mL)[a]		曝露量比[b]	
		M	F	M	F
受胎能および初期胚発生					
ラットの精子形成	200	1010[c]	NA	467	NA
胚・胎児発生					
ラットの母動物毒性	4	NA	45[d]	NA	21
ラットの胚・胎児発生	< 1	NA	< 11[d]	NA	< 5
ウサギの母動物毒性	20	NA	24[e]	NA	11
ウサギの胚・胎児発生	2	NA	1.70[e]	NA	0.8
出生前および出生後の発生					
ラット母動物毒性	4	NA	51[f]	NA	24
ラット母動物の分娩	2	NA	22[f]	NA	10
ラット離乳前の発生	< 0.4	NA	< 2.4[g]	NA	< 1.1
ラット離乳後の発生	2	NA	11[g]	NA	5
幼若動物					
幼若ラットの毒性	100	631[h]	957[h]	292	442

[a] AUC は試験終了時または試験終了時付近の値を示す。
[b] 曝露量比は，毒性試験における AUC_{24} または AUC_{last} および健康被験者にエトラシモド 2 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態における AUC_{24}（2.163 μg·h/mL，APD334-002 試験）から算出した。
[c] ラット 3 ヵ月間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]004）における試験 90 日の曝露量
[d] 妊娠 17 日の母動物の曝露量（報告書番号 TX[redacted]017）
[e] 妊娠 20 日の母動物の曝露量（報告書番号 TX[redacted]019）
[f] 妊娠 17 日の母動物の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.011）
[g] 授乳 20 日の母動物の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.011）
[h] 試験 49 日の曝露量（報告書番号 APD334.TOX.009）

9.5. 光毒性

エトラシモドの紫外可視吸収スペクトル（M3.2.S.3.1.6.3）に基づき，紫外線の照射下および非照射下において BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞をエトラシモドで処理したときの相対細胞生存率によりエトラシモド L-アルギニンの光毒性を評価したところ，エトラシモドは光毒性を示さなかった。したがって，エトラシモドはヒトに対して光毒性を示す懸念はないと考えられる。

9.6. 代謝物の安全性

エトラシモドは，酸化および脱水素反応，ならびに硫酸抱合およびグルクロン酸抱合により広範に代謝される（M2.6.4.5.3）。マウスに 20 または 200 mg/kg/日を反復投与したとき，合計 31 種の代謝物が雌雄で認められ，代謝物プロファイルに性差は認められなかった。ラットに 10 mg/kg/日を単回および反復投与したマスバランス試験において，[^{14}C]エトラシモドは広範に代謝され，29 種の代謝物が生成された。イヌに 2 mg/kg の[^{14}C]エトラシモドを単回経口投与したとき，合計 18 種の代謝物が同定された。動物種間をとおして，肝細胞および肝ミクロソームにおける in vitro 代謝物プロファイルと，[^{14}C]エトラシモドを投与した時の in vivo 代謝物プロファイルの間に高い相関が認められた（M2.6.4.5）。

ヒトのマスバランス試験（APD334-107 試験）では，代謝物の非臨床安全性評価を必要とするヒトに特異的または明らかに高い曝露量のエトラシモドの代謝物は認められていない。ヒトにおいて最も多く認められた代謝物である M3 および M6 は，いずれも総放射能の 10%未満であった。

9.7. 不純物の安全性

ICH M7(R1)ガイドラインに従い，エトラシモド L-アルギニンおよびその類縁物質について in silico で DNA 反応性を評価した。エトラシモド原薬中に確認されたまたは生じる可能性がある不純物を，DEREK Nexus®および SARAH Nexus®システムを用いた（Q）SAR 分析，または既存の文献のレビューあるいは他の関連情報により評価した。M7 に基づく分類の結果を M3.2.S.3.2.2.2 に要約した。検討した原薬中に確認されたまたは生じる可能性がある不純物のうち，8 種（ *不純物A ，*不純物B，*不純物C， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F， *不純物G および *不純物H）が潜在的変異原性不純物であると同定された。これらの潜在的変異原性不純物のうち 7 種（ *不純物A ，*不純物C， *不純物D ， *不純物E ， *不純物F， *不純物G および *不純物H）は，ICH M7(R1)ガイドラインに従い TTC 以下で管理されている。 *不純物B は，ICH Q3A(R2)ガイドラインに基づき，細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性を示さなかったため，非変異原性不純物として管理されている。

エトラシモドの臨床推奨用量は 2 mg/日のため，ICH Q3A ガイドラインより安全性確認の必要な閾値は 0.15%（0.003 mg）または 1 日摂取量 1.0 mg のうち低い方と規定される。したがって，安全性確認の必要な閾値は 0.15%とした。市販用原薬ロットで検出可能な 2 つの不純物である *不純物I および *不純物J は，エトラシモド原薬において安全性確認の必要な閾値 0.15%を超え 0.5%以下で存在すると考えられる。また，エトラシモドの光学異性体不純物（*不純物K）は原薬中に 0.7%以下で認められ，安全性確認の必要な閾値である 0.15%を超えていた。 *不純物K は製剤中でも 0.7%以下で認められた。

*不純物I については，ラットおよびイヌを用いた 13 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]004，TX[redacted]005），ラットを用いた 26 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]009）およびイヌを用いた 39 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]008）において，in vivo での安全性が確認され，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物I が最大 97.8%含まれる場合の安全性を支持している（Table 6）。ICH M7(R1)ガイドラインに従い実施した in silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物I はクラス 5 の不純物に分類されている。そのため， *不純物I は非変異原性不純物として，ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い管理されている。

*不純物J および *不純物K については，ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]010，TX[redacted]007）において，安全性が確認されている。いずれの動物種においても，3 ヵ月間以上の毒性試験に用いられたロットでは，この類縁物質は認められなかった。ラットおよびイヌを用いた 4 週間投与毒性試験は，エトラシモドを臨床推奨用量である 2 mg/日でヒトに投与したときのエトラシモド原薬中に *不純物J および *不純物K がそれぞれ最大 102.6%および 512.1%含まれる場合の安全性を支持している（Table 6）。ICH M7(R1)ガイドラインに従い実施した in silico 評価に基づき，DNA 反応性に関して *不純物J および *不純物K はクラス 5 の不純物に分類されている。そのため， *不純物J および *不純物K は非変異原性不純物として，ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い管理されている。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Table 6. ラットおよびイヌを用いた重要な反復投与毒性試験におけるエトラシモド原薬の不純物（*不純物I，*不純物J および *不純物K）

不純物	毒性試験	原薬ロット	不純物（%）	エトラシモド NOAEL (mg/kg/日)	不純物 NOAEL (mg/kg/日)[a]	不純物 NOAEL HED (mg/kg/日)[b]	許容される最大不純物含有量（%）[c]
*不純物I	TX[redacted]004（ラット 3 ヵ月）	[redacted]	0.1	200	0.200	0.0323	97.8
	TX[redacted]009（ラット 6 ヵ月）	[redacted]	0.1	150	0.150	0.0242	73.3
	TX[redacted]005（イヌ 3 ヵ月）	[redacted]	0.1	15	0.015	0.0083	25.3
	TX[redacted]008（イヌ 9 ヵ月）	[redacted]	0.1	15	0.015	0.0083	25.3
*不純物J	TX[redacted]010（ラット 4 週間）	[redacted]	0.14	150	0.210	0.0339	102.6
	TX[redacted]008（イヌ 4 週間）	[redacted]	NA	NC	NA	NA	NA
	TX[redacted]007（イヌ 4 週間）	[redacted]	0.38	2.0	0.008	0.0042	12.8
*不純物K	TX[redacted]010（ラット 4 週間）	[redacted]	0.7	150	1.05	0.169	512.1
	TX[redacted]008（イヌ 4 週間）	[redacted]	NA	NC	NA	NA	NA
	TX[redacted]007（イヌ 4 週間）	[redacted]	0.7	2.0	0.014	0.0078	23.6

HED：ヒト等価用量

[a] （被験物質の NOAEL）×（%不純物÷100）

[b] （不純物の NOAEL）÷［体表面積に基づく HED への変換係数 6.2（ラット）または 1.8（イヌ）］

[c] （不純物の NOAEL HED）÷［最大臨床推奨用量 2.0 mg ÷ 60 kg（ヒト）= 0.033 mg/kg］×100

＊新薬承認情報提供時に置き換え

10. 図表

図表は，本文中の該当箇所または毒性概要表（M2.6.7）に記載し，概要表を参照する場合は，参照箇所を本文中に示した。

11. 参考文献

1 OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Publishing. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

2 OECD. Test No. 432: In vitro 3T3 NRU photoxicity test. OECD guideline for testing of chemicals

3 フィンゴリモド 塩酸塩 審査結果報告書，2011 年 8 月 30 日

4 シポニモド フマル酸 審査結果報告書，2020 年 6 月 29 日

5 CDER. Non-clinical review(s): Application number: 209899Orig1s000 (Zeposia, ozanimod). U.S. Food and Drug Administration.

6 CDER. Non-clinical review(s): Application number: 213498Orig1s000 (Ponvory, ponesimod). U.S. Food and Drug Administration.

7 CDER. Pharmacology review(s): Application number: 22-527 (Gilenya, fingolimod). U.S. Food and Drug Administration.

8 CDER. Non-clinical review(s): Application number: 209884Orig1s000 (Mayzent, siponimod). U.S. Food and Drug Administration.

9 Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral $S1P_1$ antagonist in vivo. Nat Chem Biol. 2006;2(8):434-41.

10 Pognan F, Mahl JA, Papoutsi M, et al. Induction of hemangiosarcoma in mice after chronic treatment with S1P-modulator siponimod and its lack of relevance to rat and human. Arch Toxicol. 2018;92(5):1877-91.

11 Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. Science. 2019;366(6463):eaar5551.

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1. TOXICOLOGY: OVERVIEW 3
2.6.7.2. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES 8
2.6.7.3. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA 9
2.6.7.4. TOXICOLOGY: DRUG SUBSTANCE 11
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: PIVOTAL STUDIES 15
2.6.7.8. GENOTOXICITY: IN VITRO 78
2.6.7.9. GENOTOXICITY: IN VIVO 83
2.6.7.10. CARCINOGENICITY 84
2.6.7.11. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY 106
2.6.7.12. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION 111
2.6.7.13. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT 115
2.6.7.14. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON PRE- AND POSTNATAL DEVELOPMENT, INCLUDING MATERNAL FUNCTION 124
2.6.7.15. STUDIES IN JUVENILE ANIMALS 131
2.6.7.16. OTHER TOXICITY STUDIES 139

LIST OF TABLES

Table 1: Overview of Toxicology Studies with Etrasimod 3
Table 2: Overview of Toxicokinetics Studies 8
Table 3: Overview of Toxicokinetics Data: Steady-State AUC_{last} 9
Table 4: Overview of Drug Substance Batches Used in Repeat-Dose Toxicity Studies 11
Table 5: Single-Dose Toxicity Studies 12
Table 6: Etrasimod Repeat-Dose Nonpivotal Studies 13
Table 7: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 4-Week Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 15
Table 8: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 3-Month Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 25
Table 9: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 6-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 33
Table 10: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 4-Week Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 46

Table 11: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 4-Week Oral Toxicity Study 58
Table 12: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 3-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 62
Table 13: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 9-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period 69
Table 14: Genotoxicity In Vitro: Bacterial Mutagenicity Assay 78
Table 15: Genotoxicity In Vitro: Chromosomal Aberration Assay 81
Table 16: Genotoxicity In Vivo: Oral Bone Marrow Micronucleus Test in Rats 83
Table 17: Carcinogenicity: 28-Day Dose Range-Finding Study to Support 104-Week Mouse Oncogenicity Study 84
Table 18: Carcinogenicity: 91-Day Dose Range-Finding Study to Support 104-Week Mouse Oncogenicity Study 85
Table 19: Carcinogenicity: Pivotal 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice 92
Table 20: Carcinogenicity: Pivotal 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats 99
Table 21: Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies in Rats and Rabbits 106
Table 22: Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Study in Rats with Toxicokinetics 109
Table 23: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Fertility and Early Embryonic Development 111
Table 24: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Embryo-Fetal Development 115
Table 25: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Embryo-Fetal Development 120
Table 26: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function 124
Table 27: Study in Juvenile Animals: 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Rats with 4-Week Recovery Period 131
Table 28: Other Toxicity Studies: Micro-Ames Reverse Mutation Screen for *不純物B 139
Table 29: Other Toxicity Studies: Bacterial Reverse Mutation Screen for *不純物B 141
Table 30: Other Toxicity Studies: Bacterial Reverse Mutation Screen for *不純物C 143
Table 31: Other Toxicity Studies: Phototoxicity 145

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.1. TOXICOLOGY: OVERVIEW

Table 1: Overview of Toxicology Studies with Etrasimod

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Sponsor Reference Number
Single-Dose Toxicity							
Dose Escalation Oral Toxicity Study	Dog/Beagle	Oral gavage	1 day	100, 300, 1000	No	[redacted], USA	TX[redacted]007
Repeat-Dose Toxicity[b]							
14-Day Oral Toxicity Study	Rat/ Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral gavage	14 days	30, 100, 300, 1000	No	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA	TX[redacted]036
4-Week Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	28 days	25, 150, 350/250, 500	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]010
3-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	3 months	25, 100, 200	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]004
6-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	6 months	25, 75, 150, 250	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]009
3-Day Oral Toxicity Study	Dog/Beagle	Oral gavage	3 days	300	No	[redacted], USA	TX[redacted]007
7-Day Oral Toxicity Study	Dog/Beagle	Oral gavage	7 days	30, 300	No	[redacted]	TX[redacted]008

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Sponsor Reference Number
						[redacted] USA	
4-Week Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	28 days	20, 100, 500, 1000 (initial doses) 20, 40, 80 (final, lowered doses)	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]008
4-Week Oral Toxicity Study (Repeat)	Dog/Beagle	Oral gavage	28 days	0.02, 0.2, 2.0	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]007
3-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	3 months	1, 5, 15	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]005
9-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	9 months	2, 5, 10, 15	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]008
Genotoxicity							
Bacterial Reverse Mutation Assay	Salmonella typhimurium tester strains (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli tester strain (WP2uvrA)	Cell culture; ± S9 metabolic activation	2 days	2.5-5000 µg/plate of APD334 L-arginine	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]011
Chromosome Aberration Assay	Human Peripheral Blood Lymphocytes	Cell culture; ± S9 metabolic activation	3 and 22 hours	1-350 µg/mL of APD334 L-arginine	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]012
Micronucleus Assay of Rat Polychromatic Erythrocytes	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral gavage	3 days	25-300 mg/kg/day	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]013

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Sponsor Reference Number
Carcinogenicity							
28-Day Oral Toxicity Study	Mouse/ Crl:CD1® (ICR)	Oral gavage	28 days	30, 100, 300/200	No	[redacted], USA	TX[redacted]003
91-Day Oral Toxicity Study	Mouse/ Crl:CD1 (ICR)	Oral gavage	91 days	20, 60, 200	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.001
104-Week Oral Oncogenicity Study	Mouse/ Crl:CD1 (ICR)	Oral gavage	104 weeks	2, 6, 20	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.003
104-Week Oral Oncogenicity Study	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	91 weeks	2, 6, 20	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.002
Reproductive and Developmental Toxicity							
Effects on Spermatogenesis	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	28 days	25, 100, 250/200	No	[redacted], USA	TX[redacted]008
Oral Fertility and Early Embryonic Development Study	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Males: 28 days Females: 14 days and 7 days through gestation	Males: 25[c], 100, 200[d] Females: 1, 2, 4[c,d]	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]007
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Gestation Day 6 to 17	25, 75, 150, 250	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]016

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Sponsor Reference Number
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals (Repeat)	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral gavage	Gestation Day 6 to 17	2, 5, 10, 20	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]025
Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Gestation Day 6 to 17	1[e], 2, 4[f]	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]017
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals	Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW) SPF]	Oral gavage	Gestation Day 7 to 20	2, 25, 75, 150	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]018
Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study	Rabbit/New Zealand White [Hra:(NZW) SPF]	Oral gavage	Gestation Day 7 to 20	2[g], 10, 20[f]	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]019
Oral Dose Range-Finding Prenatal/ Postnatal Development Study	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Gestation Day 6 to Lactation Day 20	0.05, 0.20, 1.0, 2.0	No	[redacted], USA	APD334.TOX.012
Oral Prenatal/Postnatal Development Study	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Gestation Day 6 to Lactation Day 20	0.4, 2.0, 4.0[f]	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.011
Oral Dose Range-Finding Toxicity Study in Juvenile Animals	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	Postnatal Day 21 to 34	25, 100, 200	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.008
7-Week Oral Toxicity Study in Juvenile Animals With a 4-Week Recovery Period	Rat/Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	7 weeks beginning on Postnatal Day 21	10, 30, 100	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.009

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Sponsor Reference Number
Other Toxicity Studies –Genotoxicity of Impurities and Phototoxicity of Etrasimod							
MicroAmes Screen	Salmonella typhimurium tester strains (TA97a, TA98, and TA100)	Cell culture; ± S9 metabolic activation	2 days	0.25-250 µg/well of *不純物B (etrasimod starting material)	No	[redacted], USA	TX[redacted]015
Bacterial Reverse Mutation Assay	Salmonella typhimurium tester strains (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli tester strain (WP2 uvrA)	Cell culture; ± S9 metabolic activation	48-72 hours	50-5000 µg/plate of *不純物B (etrasimod starting material)	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.010
Bacterial Reverse Mutation Assay	Salmonella typhimurium tester strains (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli tester strain (WP2 uvrA)	Cell culture; ± S9 metabolic activation	48-72 hours	0.333-5000 µg/plate of *不純物C (etrasimod starting material)	Yes	[redacted], USA	APD334.TOX.006
Neutral Red Uptake Phototoxicity Assay	Mouse/ BALB/c 3T3 fibroblasts	Cell culture; ±UVR exposure assay	90 minutes	0.316-17.8 µg/mL	Yes	[redacted], USA	TX[redacted]001

[a] Unless specified otherwise, all doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Unless specified otherwise, for repeat-dose toxicity studies, the NOAEL is underlined.
[c] NOAEL for systemic and/or early embryonic toxicity.
[d] NOAEL for reproductive toxicity.
[e] NOAEL for embryo-fetal development was <1 mg/kg/day in study TX[redacted]017.
[f] NOAEL for maternal toxicity.
[g] NOAEL for embryo-fetal development.
CRL or Crl, [redacted]; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; S9, metabolic activation mixture; UVR, ultraviolet radiation

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.2. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES

Table 2: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Dose[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Sponsor Reference Number
14-Day Oral Toxicity Study	Rat/ Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral gavage	30, 100, 300, 1000	No	TX[redacted]036
4-Week Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	25, 150, 350/250, 500	Yes	TX[redacted]010
3-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	25, 100, 200	Yes	TX[redacted]004
6-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Rat/ Sprague Dawley (CD[Crl:CD (SD)])	Oral gavage	25, 75, 150, 250	Yes	TX[redacted]009
3-Day Oral Toxicity Study	Dog/Beagle	Oral gavage	300	No	TX[redacted]007
7-Day Oral Toxicity Study	Dog/Beagle	Oral gavage	30, 300	No	TX[redacted]008
4-Week Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	20, 100, 500, 1000 (initial doses) 20, 40, 80 (final, lowered doses)	Yes	TX[redacted]008
4-Week Oral Toxicity Study (Repeat)	Dog/Beagle	Oral gavage	0.02, 0.2, 2.0	Yes	TX[redacted]007
3-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	1, 5, 15	Yes	TX[redacted]005
9-Month Oral Toxicity Study With a 4-Week Recovery Period	Dog/Beagle	Oral gavage	2, 5, 10, 15	Yes	TX[redacted]008

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

2.6.7.3. TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA

Table 3: Overview of Toxicokinetics Data: Steady-State AUC_{last}

Dose[a] (mg/kg/day)	Steady-State AUC_{last} (µg·h/mL)								
	Mouse		Rat		Rabbit (Pregnant)		Dog		Human
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male & Female
MRHD (2 mg/day)	–	–	–	–	–	–	–	–	2.162
0.02	–	–	–	–	–	–	1.27[b]	1.22[b]	–
0.2	–	–	–	–	–	–	14.3[b]	11.2[b]	–
1	–	–	–	11[c]	–	–	52.6[d]	50.1[d]	–
2	–	–	–	22.8[c]	–	1.70[e]	114[f]	128[f]	–
							112[b]	104[b]	
4	–	–	–	44.5[c]	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	259[d]	265[d]	–
							269[f]	335[f]	
10	–	–	–	–	–	12.6[e]	542[f]	586[f]	–
15	–	–	–	–	–	–	1030[d]	1000[d]	–
							879[f]	861[f]	
20	331[g]	220[g]	–	–	–	24.2[e]	925[h]	910[h]	–
25	–	–	165[i]	271[i]	–	–	–	–	–
			218[j]	314[j]					
			210[k]	442[k]					
30	577[l]	456[l]	–	–	–	–	–	–	–
40	–	–	–	–	–	–	1940[h]	1860[h]	–

Dose[a] (mg/kg/day)	Steady-State AUC_{last} (µg·h/mL)								
	Mouse		Rat		Rabbit (Pregnant)		Dog		Human
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male & Female
60	894[g]	569[g]	–	–	–	–	–	–	–
75	–	–	554[k]	1650[k]	–	–	–	–	–
80	–	–	–	–	–	–	2590[h]	2750[h]	–
100	1780[l]	1030[l]	586[j]	670[j]	–	–	–	–	–
150	–	–	700[i]	1290[i]	–	–	–	–	–
			1440[k]	3180[k]					
200	1870[g]	1150[g]	1010[j]	1730[j]	–	–	–	–	–
250	–	–	1300[i]	2370[i]	–	–	–	–	–
			2060[k]	4470[k]					
300	2180[l]	1400[l]	–	–	–	–	–	–	–

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] TX[redacted]007; Day 28 AUC_{last}
[c] TX[redacted]017; Dosing Day 12, GD17 $AUC_{last, 24h}$
[d] TX[redacted]005; Day 90 AUC_{last}
[e] TX[redacted]019; Dosing Day 13, GD20 $AUC_{last, 24h}$
[f] TX[redacted]008; Day 273 $AUC_{last, 24h}$
[g] APD334.TOX.001, Day 90 AUC_{last}
[h] TX[redacted]008; Day 28 AUC_{last}
[i] TX[redacted]010; Day 28 AUC_{last}; The initial high dose level was 500 mg/kg/day. Due to considerable etrasimod-related mortality, the remaining survivors in the group were terminated on Day 6 and a new high dose group at a lower dose level (350 mg/kg/day) was established with a new set of animals. The new high dose group exhibited etrasimod-related mortality, leading to a 3-day drug holiday (Days 5, 6, and 7) and a reduction in the dose level to 250 mg/kg/day effective on Day 8 when dosing resumed.
[j] TX[redacted]004; Day 90 AUC_{last}
[k] TX[redacted]009; Day 182 $AUC_{last, 24h}$
[l] TX[redacted]003; Day 28 AUC_{last}
–, no data; AUC_{last}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose;GD, Gestation Day; MRHD, maximum recommended human dose

2.6.7.4. TOXICOLOGY: DRUG SUBSTANCE

Table 4: Overview of Drug Substance Batches Used in Repeat-Dose Toxicity Studies

Batch Number	**Purity (%)**	**Impurities (% Area)**		**Sponsor Reference Number**	**Type of Study**
		*不純物I **(RRT 0.63)**	*不純物J **(RRT 1.15)**		
Proposed specification:	≥ 90.0	≤ 0.5	≤ 0.5	NA	NA
[redacted]	102.6	0.17	0.14	TX[redacted]008	28-day dog
	102.6	0.17	0.14	TX[redacted]010	28-day rat
[redacted]	101.5	ND	0.85	TX[redacted]008	28-day dog
[redacted]	103.0	ND	0.38	TX[redacted]007	28-day dog
	103.0	ND	0.38	TX[redacted]008	28-day dog
[redacted]	100.0	ND	0.29	TX[redacted]008	28-day dog
[redacted]	100.4	0.1	ND	TX[redacted]004	3-month rat
	100.4	0.1	ND	TX[redacted]009	6-month rat
	100.4	0.1	ND	TX[redacted]005	3-month dog
	100.4	0.1	ND	TX[redacted]008	9-month dog

NA, not applicable; ND, not detected; RRT, relative retention time

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5. SINGLE-DOSE TOXICITY

Table 5: Single-Dose Toxicity Studies

Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Dose[a] (mg/kg)	Number/ Sex/ Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Dog/Beagle	Oral (0.5% w/v methylcellulose in deionized water) [redacted]	100, 300, 1000	1 Male/ 1 Female	1000	>1000	None	TX[redacted]007/ No

Toxicokinetic Parameters						
Dose (mg/kg)	100		300		1000	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (µg/mL)	29.5	50.5	48.5	50.8	77.8	123
AUC_{last} (µg·h/mL)	973	1750	1500	1540	2790	4160

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight.
AUC_{last}, area under concentration-time curve from time 0 to last measurable postdose concentration; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration

2.6.7.6. REPEAT-DOSE TOXICITY: NONPIVOTAL STUDIES

Table 6: Etrasimod Repeat-Dose Nonpivotal Studies

Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (0.5% w/v methylcellulose in deionized water) [redacted]	14 days	30, 100, 300, 1000	3 Males/ 3 Females	300	Mortality and CNS clinical signs observed at 1000 mg/kg	TX[redacted]036/ No
Toxicokinetic Parameters (Combined Sexes): No TK data collected							
Dog/Beagle	Oral (0.5% w/v methylcellulose in deionized water) [redacted]	1 dose every 6th day, 3 doses, then once daily for 3 days	100, 300, 1000, then 300 qd for 3 days	1 Male/ 1 Female	1000	None	TX[redacted]007/ No

Toxicokinetic Parameters:		
Dose[a] (mg/kg/day)	300	
Sex	Male	Female
Day 22		
C_{max} (µg/mL)	73.6	141
AUC_{last} (µg·h/mL)	1530	2840
Day 23		
C_{max} (µg/mL)	94.7	126
AUC_{last} (µg·h/mL)	3280	4350

Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Dog/Beagle	Oral (0.5%w/v methylcellulose in deionized water) [redacted]	7 days	30, 300	2 Males/ 2 Females	300	None	TX[redacted]008/ No

Toxicokinetic Parameters:				
Dose[a] (mg/kg/day)	30		300	
Sex	Male	Female	Male	Female
Day 1				
C_{max} (µg/mL)	19.2	25.7	73.4	86.0
AUC_{last} (µg·h/mL)	372	514	1341	1489
Day 7				
C_{max} (µg/mL)	29.9	57.5	229	181
AUC_{last} (µg·h/mL)	542	1130	4405	3770

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
Note: Results from additional repeat-dose studies in mice, Study TX[redacted]003 and Study APD334.TOX.001, are provided in the carcinogenicity section in Table 17 and Table 18, respectively.
AUC_{last}, area under concentration-time curve from time 0 to the last quantifiable postdose concentration; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; CNS, central nervous system; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; qd, once daily

2.6.7.7. REPEAT-DOSE TOXICITY: PIVOTAL STUDIES

Table 7: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 4-Week Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley CD®[Crl:CD®(SD)]	**Duration of Dosing:** Up to 28 days	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010
Initial Age: Approximately 6 weeks of age at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: (+)-L-Arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 150 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals										
Toxicity	15	15	10	10	10	10	15	15	15	15
Toxicokinetics	3	3	9	9	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics[c]										
C_{max} (µg/mL)										
Day 1	NA	NA	12.6	18.8	65.8	70.4	112	101	97.0	129
Day 28	NA	NA	15.6	28.6	56.2	83.4	NS[d]	NS[d]	88.6	152
AUC_{0-24} (µg·h/mL)										
Day 1	NA	NA	147	198	908	1130	2210	1860	1870	2290
Day 28	NA	NA	165	271	700	1290	NS[d]	NS[d]	1300	2370

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Noteworthy findings										
Died or euthanized										
Toxicity	0	0	0	0	0	0	9	12	3	5
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	7	4	1	4
Body weight (g) (% difference from controls) – Treatment period[e]										
Week 1	302.0	213.9	–3	–3	–6∗	–2	NA	NA	–14†	–18†
Week 2	354.9	233.5	–6∗	–4	–10†	–5	NA	NA	–12†	–14†
Week 3	392.3	245.7	–6	–5	–9†	–4	NA	NA	–11†	–13†
Week 4	416.9	252.4	–5	–5	–8∗	–4	NA	NA	–9†	–10†
Body weight (g) (% difference from controls) – Recovery period										
Week 5	450.0	259.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–10	–8
Week 6	468.2	269.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–9∗	–7
Week 7	486.6	274.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–9∗	–7
Week 8	511.8	280.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–12∗	–9
Food consumption (g/animal/day) (% difference from controls) – Treatment period[e]										
Week 1	28.02	19.88	–14†	–14†	–24†	–20†	–63†	–67†	–49†	–57†
Week 2	28.22	19.84	–12†	–10	–13†	–11∗	NA	NA	–3	–3
Week 3	29.48	20.41	–9	–10∗	–11∗	–9∗	NA	NA	–7	–11∗
Week 4	29.39	20.48	–9∗	–9	–7	–13∗	NA	NA	–3	–5
Food consumption (g/animal/day) (% difference from controls) – Recovery period										
Week 5	31.17	19.60	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–8	–1

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Week 6	31.17	20.51	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–11	+2
Week 7	29.66	19.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–2	–0.3
Week 8	30.53	19.57	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–5	–4
Clinical observations – Treatment period[f]										
Activity decreased	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	18/13	10/9	13/11	14/12
Lateral recumbency	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Prostration	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	6/6	6/6	1/1	0/0
Righting reflex impaired	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	2/2	2/2	0/0
Righting reflex lost	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	1/1
Salivation	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0
Tremors	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0	0/0
Feces few/absent	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	14/10	24/15
Feces soft	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2
Carriage high	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	4/2
Carriage low	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	2/1
Lacrimation	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	4/2	0/0	0/0
Limb function impaired	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	12/2	0/0	0/0	0/0
Limbs splayed	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	3/3	0/0	4/1
Material around eyes, black	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	1/1
Material around eyes, red	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Material around mouth, brown	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	1/1	1/1

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Material around mouth, red	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3	1/1	0/0
Material around nose, black	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/2
Material around nose, brown	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	4/3
Material around nose, red	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	6/4	4/4	1/1	4/3
Posture hunched	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	9/4
Thin	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	7/6
Moribund	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	6/6	7/7	0/0	0/0
Hair discolored, brown	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	2/2
Hair discolored, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	3/3	2/2
Piloerection	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	7/7	5/5	18/15	9/8
Skin cold to touch	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/3	0/0	0/0
Breathing difficult	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Breathing rapid	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
Breathing shallow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	1/1	0/0	0/0
Clinical observations – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period[g]										
Erythrocytes (10^6/µL)	8.337	8.177	8.073	7.720	7.723†	7.465†	NA	NA	7.930*	7.543*
Hemoglobin (g/dL)	16.10	15.73	15.68	14.92	14.74†	14.01†	NA	NA	14.43†	13.54†
Hematocrit (%)	51.68	48.80	50.15	46.50	47.03†	43.88†	NA	NA	46.69†	43.79†
Lymphocytes (10^3/µL)	10.380	8.540	2.660†	2.280†	2.390†	2.110†	NA	NA	2.544†	2.343†

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
APTT (s)	19.11	19.06	21.72	20.03	22.82†	21.48	NA	NA	25.97†	19.91
Prothrombin time (s)	16.11	15.80	16.99*	16.15	18.64*	15.22	NA	NA	17.09	15.44
Hematology/coagulation – Recovery period										
Erythrocytes (10^6/µL)	9.10	8.35	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.15	8.79
Hemoglobin (g/dL)	15.80	15.52	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16.37	15.77
Hematocrit (%)	53.14	50.28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	52.17	49.93
Lymphocytes (10^3/µL)	9.92	8.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.93	5.73*
APTT (s)	19.58	19.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19.67	16.87
Prothrombin time (s)	16.42	16.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16.73	16.40
Clinical chemistry – Treatment period[g]										
Total bilirubin (mg/dL)	0.10	0.10	0.16*	0.21†	0.28†	0.30†	NA	NA	0.23†	0.29†
Cholesterol (mg/dL)	47.0	59.4	59.3†	89.7†	105.7†	120.5†	NA	NA	135.9†	143.1†
Clinical chemistry – Recovery period										
Total bilirubin (mg/dL)[h]	0.10	0.10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.10	0.10
Cholesterol (mg/dL)	54.2	72.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	69.3	82.3
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	NA	NA	–	–
Organ weights (% difference from controls)[e]										
Adrenal gland										
Absolute (g)	0.071	0.072	–3	+11	–8	+14	NA	NA	0	+24*
Relative (g/100 g body weight)	0.0189	0.0324	+1	+15	–2	+17	NA	NA	+6	+33†
Relative (g/g brain weight)	0.0363	0.0402	–4	+6	–10	+8	NA	NA	+2	+22*

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Liver										
Absolute (g)	12.375	7.567	+4	–1	+32†	+20†	NA	NA	+49†	+33†
Relative (g/100 g body weight)	3.2729	3.3437	+9	+4	+43†	+26†	NA	NA	+58†	+46†
Relative (g/g brain weight)	6.2974	4.2061	+3	–4	+31†	+15*	NA	NA	+52†	+32†
Lung with bronchi										
Absolute (g)	1.623	1.224	+10	+16*	+14	+19†	NA	NA	+25†	+27†
Relative (g/100 g body weight)	0.4310	0.5437	+15	+21†	+23†	+24†	NA	NA	+32†	+38†
Relative (g/g brain weight)	0.8248	0.6812	+10	+12	+13	+13	NA	NA	+28†	+26†
Prostate gland										
Absolute (g)	0.563	NA	–21†	NA	–21†	NA	NA	NA	–39†	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.1511	NA	–19*	NA	–15	NA	NA	NA	–35†	NA
Relative (g/g brain weight)	0.2869	NA	–22†	NA	–22†	NA	NA	NA	–38†	NA
Spleen										
Absolute (g)	0.716	0.465	–19†	–12	–30†	–12	NA	NA	–37†	–11
Relative (g/100 g body weight)	0.1891	0.2047	–16†	–7	–24†	–7	NA	NA	–33†	–2
Relative (g/g brain weight)	0.3646	0.2582	–20†	–15	–31†	–15	NA	NA	–35†	–11
Gross pathology – Treatment period[i]										
Number examined	10	10	10	10	10	10	9	12	12	12
Spleen										
Small										
mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Gross pathology – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–	–
Histopathology – Treatment period[i]										
Number examined	10	10	10	10	10	10	NA	NA	12	12
Adrenal glands										
hypertrophy, diffuse, cortical; bilateral										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	5
Bone marrow, femur										
depletion, mixed										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	3
Bone marrow, sternum										
depletion, mixed	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	3
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	2
mild	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	1
Liver										
hypertrophy, hepatocyte, panlobular										
minimal	0	0	10	0	2	9	NA	NA	2	4
mild	0	0	0	0	8	0	NA	NA	10	7
necrosis, individual hepatocyte										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	5	1
Lymph node, mandibular										
histiocytosis, sinus										

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
minimal	0	0	6	7	7	7	NA	NA	5	9
Lymph node, mesenteric										
depletion, lymphoid, generalized										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	2
histiocytosis, sinus										
minimal	0	0	10	9	10	9	NA	NA	11	10
hyperplasia, lymphoid, paracortex										
minimal	0	0	8	8	9	9	NA	NA	9	6
mild	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	1
necrosis, lymphoid, generalized										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	1
Small intestine, ileum										
macrophages, foamy										
minimal	0	0	7	3	8	5	NA	NA	6	4
Small intestine, jejunum										
macrophages, foamy										
minimal	0	0	8	4	8	7	NA	NA	8	6

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Spleen										
depletion, lymphoid, generalized	0	0	0	0	1	2	NA	NA	8	9
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	0
mild	0	0	0	0	1	2	NA	NA	5	5
moderate	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	4
depletion, lymphoid, marginal zone	0	0	9	9	9	10	NA	NA	2	3
minimal	0	0	1	5	0	5	NA	NA	1	2
mild	0	0	8	4	9	5	NA	NA	1	1
hyperplasia, lymphoid, germinal center	0	0	10	9	8	7	NA	NA	11	12
minimal	0	0	9	9	5	5	NA	NA	7	11
mild	0	0	1	0	3	2	NA	NA	4	1
necrosis, lymphoid, generalized										
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	5
Thymus										
depletion, lymphoid, cortex	0	0	5	10	10	9	NA	NA	9	10
minimal	0	0	4	10	9	9	NA	NA	8	7
mild	0	0	1	0	1	0	NA	NA	1	3
hyperplasia, lymphoid, medulla										
minimal	0	0	9	9	8	9	NA	NA	6	5
necrosis, lymphoid, generalized	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	5
minimal	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	0

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]010			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**150**		**500[b]**		**350/250[b]**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
mild	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	2
moderate	0	0	0	0	0	0	NA	NA	1	3
Thyroid gland										
Hypertrophy										
minimal	0	0	2	0	7	2	NA	NA	10	7
Histopathology – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	NA	NA	–	–

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] At the initial high dose level of 500 mg/kg/day, considerable etrasimod-related mortality was noted, leading to the decision to terminate the remaining survivors in this group on Day 6 and restart a new high dose group at a lower dose level using a new set of animals. The new high dose group (initial dose level of 350 mg/kg/day) initially exhibited etrasimod-related mortality, leading to a 3-day drug holiday (Days 5, 6, and 7) and a reduction in the dose level to 250 mg/kg/day effective on Day 8 when dosing resumed.
[c] Group means are shown for treated groups; the control group was only analyzed for plasma concentration. LLOQ = 0.100 µg/mL.
[d] NS; no sample collected due to animal mortality/death prior to Day 28.
[e] 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.
[f] Weeks 1 to 4. Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected. Reversibility was evident prior to the Day 8 resumption of dosing. No etrasimod-related clinical signs were noted for the remainder of the dosing period at 250 mg/kg/day or during the recovery period.
[g] Group means are shown.
[h] No statistics performed due to lack of variability or sample size
[i] Reported as Number Observed.

Notes: *p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01; ‡p ≤ 0.005, §p ≤ 0.001 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
–, no noteworthy findings; +, positive; APTT, activated partial thromboplastin time; AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; LLOQ, lower limit of quantification; NA, not applicable

Table 8: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 3-Month Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley CD®[Crl:CD®(SD)]	**Duration of Dosing:** 3 months	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004
Initial Age: Approximately 6 weeks of age at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride USP in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 200 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity	15	15	15	15	15	15	15	15
Toxicokinetics	3	3	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics[b]								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	11.0	13.6	35.7	37.6	71.2	95.3
Day 90	NA	NA	19.3	29.6	53.1	76.8	79.7	150
AUC_{0-24} (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	131	157	428	490	1470	1970
Day 90	NA	NA	218	314	586	670	1010	1730
Noteworthy findings								
Died or euthanized								
Toxicity	0	0	0	0	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight (g) – Treatment period[b]								
Week 1	287.4	217.8	286.0	212.3	277.7	206.7	252.9†	198.1†
Week 13	575.4	356.9	565.5	320.3†	571.8	324.4†	527.7†	312.9†
Body weight (g) – Recovery period								
Week 17	592.2	358.2	596.4	340.6	601.0	343.0	582.0	338.4
Food consumption (g/animal/day) – Treatment period[b]								
Week 1	24.26	17.90	22.97	16.45*	21.17†	15.55†	14.77†	11.39†
Week 13	25.83	17.91	24.82	16.61*	26.32	17.19	25.48	16.17†
Food consumption (g/animal/day) – Recovery period								
Week 17	25.76	17.98	27.17	16.90	28.45	17.86	28.24	19.07
Clinical observations – Treatment period	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical observation – Recovery period								
Swelling	–	0/0	–	1/1	–	4/1	–	0/0
Pelage/skin, hair discolored, brown	0/0	–	0/0	–	2/1	–	0/0	–
Pelage/skin, hair sparse	4/1	16/1	2/1	4/1	0/0	0/0	0/0	8/2
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period[b]								
Leukocytes (10^3/µL)	12.24	10.34	6.12†	3.78†	5.41†	3.22†	5.68†	2.73†
Erythrocytes (10^6/µL)	9.262	8.276	8.733	8.200	8.785	7.698*	9.082	7.704*
Hemoglobin (g/dL)	16.19	15.61	15.91	15.49	15.57	13.96†	15.82	13.67†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Hematocrit (%)	53.16	49.28	51.68	49.86	50.75	45.36†	52.19	44.42†
MCV (fL)	57.43	59.55	59.27	60.81	57.83	58.94	57.46	57.67∗
MCH (pg)	17.49	18.87	18.23∗	18.90	17.75	18.14†	17.41	17.73†
MCHC (g/dL)	30.47	31.67	30.79	31.09∗	30.70	30.78†	30.29	30.79†
Platelets (10^3/µL)	974.6	923.5	1099.0	1107.3†	1210.8†	1158.1†	1400.0†	1216.9†
Neutrophils (10^3/µL)	1.336	0.763	1.730	0.800	1.750	0.823	1.900∗	0.696
Eosinophils (10^3/µL)	0.126	0.076	0.090	0.073	0.077∗	0.044∗	0.060†	0.059
Basophils (10^3/µL)	0.065	0.059	0.040∗	0.033†	0.045	0.028†	0.035†	0.027†
Lymphocytes (10^3/µL)	10.171	9.084	3.806†	2.587†	3.119†	2.036†	3.224†	1.663†
Other cells (10^3/µL)	0.183	0.150	0.102†	0.081†	0.105†	0.076†	0.111∗	0.077†
APTT (s)	19.04	15.48	18.52	16.68	22.47∗	15.02	28.20†	16.53
Prothrombin time (s)	15.65	15.20	15.39	15.13	17.19	14.26†	20.69†	13.79†
Hematology – Recovery period								
Leukocytes (10^3/µL)	14.38	9.14	8.22†	5.62†	7.90†	4.46†	8.42†	4.00†
Lymphocytes (10^3/µL)	11.368	7.694	5.846†	4.174†	5.876†	3.368†	6.482†	2.854†
Other cells (10^3/µL)	0.098	0.098	0.080	0.060∗	0.090	0.048†	0.074	0.066
Clinical chemistry – Treatment period								
Chloride (mEq/L)	99.8	99.4	101.2∗	100.3	100.9	100.5	101.3∗	101.2∗
Calcium (mg/dL)	11.94	12.60	11.74	12.35	11.92	12.69	12.48∗	12.89
Alkaline phosphatase (U/L)	76.1	51.4	101.8∗	46.8	101.1∗	46.4	100.1∗	41.7
Total bilirubin (mg/dL)	0.13	0.14	0.19∗	0.17	0.23†	0.28†	0.30†	0.36†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Urea nitrogen (md/dL)	13.9	14.2	14.2	15.9	15.5	15.2	16.5∗	15.9
Creatinine (mg/dL)	0.42	0.49	0.43	0.55	0.53†	0.59†	0.60†	0.67†
Total protein (g/dL)	6.69	7.54	6.30∗	7.17	6.40	7.27	6.36	7.49
Globulin (g/dL)	3.24	3.48	2.99∗	3.27	3.03	3.37	2.96∗	3.45
Albumin/Globulin ratio	1.08	1.16	1.10	1.19	1.12	1.17	1.15∗	1.18
Triglyceride (mg/dL)	99.3	76.2	47.9†	60.1	36.9†	58.1	33.2†	53.7
Glucose (mg/dL)	264.8	288.7	210.6∗	256.8	198.0†	221.7†	225.2	220.6†
Cholesterol (mg/dL)	62.8	82.1	91.0∗	101.4	113.6†	150.3†	160.6†	188.3†
Clinical chemistry – Recovery period								
Chloride (mEq/L)	99.8	99.8	100.2	101.2	100.8	100.0	101.4∗	99.8
Globulin (g/dL)	3.48	3.90	3.12†	3.70	3.24	3.74	3.38	3.68
Albumin/Globulin ratio	0.94	1.08	1.02∗	1.04	1.02∗	1.08	1.02∗	1.06
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights (% change) – Treatment period								
Liver								
Absolute (g)	17.846	10.052	–1.23	–2.22	+19.12∗	+21.64†	+17.95∗	+29.58†
Relative (g/100 g body weight)	3.2396	2.9932	+2.33	+11.67∗	+22.76†	+37.87†	+35.29†	+53.10†
Relative (g/g brain weight)	8.2035	5.0458	–3.53	–1.00	+17.49∗	+18.90∗	+17.95∗	+25.96†
Prostate gland								
Absolute (g)	1.602	NA	–4.37	NA	–9.99	NA	–31.40†	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.2951	NA	–1.36	NA	–8.40	NA	–22.47∗	NA

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/g brain weight)	0.7360	NA	–6.18	NA	–11.36	NA	–31.48†	NA
Spleen								
Absolute (g)	0.836	0.620	–16.51∗	–27.90†	–23.33†	–20.81†	–35.77†	–26.29†
Relative (g/100 g body weight)	0.1514	0.1856	–13.01	–17.89*	–20.67†	–9.64	–25.76†	–13.04
Relative (g/g brain weight)	0.3835	0.3116	–17.73∗	–27.31†	–24.15†	–22.59†	–35.65†	–28.63†
Organ weights (g) – Recovery period								
Thyroid/parathyroid gland								
Absolute (g)	0.028	0.023	0.031	0.022	0.030	0.022	0.035∗	0.028
Relative (g/100 g body weight)	0.049	0.0068	0.0055	0.0068	0.0052	0.0068	0.0064†	0.0090∗
Relative (g/g brain weight)	0.0124	0.0112	0.0143	0.0105	0.0136	0.0108	0.0156	0.0141
Gross pathology – Treatment period	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross pathology – Recovery period	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology – Treatment period								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Lymph node, mandibular								
histiocytosis, sinus	4	3	8	10	8	7	8	6
minimal	4	3	8	10	7	7	8	5
mild	0	0	0	0	1	0	0	1
Lymph node, mesenteric								
depletion, lymphoid, generalized	0	0	10	8	9	10	9	10
minimal	0	0	2	1	3	4	1	3

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
mild	0	0	8	7	6	5	7	7
moderate	0	0	0	0	0	1	1	0
histiocytosis, sinus	0	2	10	10	10	10	10	10
minimal	0	2	0	2	3	0	2	0
mild	0	0	10	8	7	10	8	10
Spleen								
depletion, lymphoid, marginal zone	0	0	10	9	10	10	10	10
minimal	0	0	3	0	3	0	0	0
mild	0	0	7	9	7	10	10	10
Thymus								
Hyperplasia, lymphoid, medulla	0	0	10	10	10	10	9	10
minimal	0	0	3	1	3	7	2	1
mild	0	0	7	9	7	3	7	9
Liver								
Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular	0	0	6	1	10	5	10	9
minimal	0	0	6	1	5	5	7	7
mild	0	0	0	0	5	0	3	2
Thyroid gland								
Hypertrophy, follicular cell								
minimal	0	0	0	5	10	7	10	10
Histopathology – Recovery period								

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Lymph node, mandibular								
histiocytosis, sinus								
minimal	1	1	1	2	2	3	2	2
Lymph node, mesenteric								
depletion, lymphoid, generalized	0	0	0	1	0	1	0	2
minimal	0	0	0	1	0	1	0	1
mild	0	0	0	0	0	0	0	1
histiocytosis, sinus	0	1	4	5	5	5	4	5
minimal	0	1	3	3	5	5	4	5
mild	0	0	1	2	0	0	0	0
Spleen								
depletion, lymphoid, marginal zone	0	0	1	2	3	5	1	3
minimal	0	0	1	2	3	5	0	2
mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Thymus								
Hyperplasia, lymphoid, medulla	0	0	0	0	0	2	0	3
minimal	0	0	0	0	0	1	0	2
mild	0	0	0	0	0	1	0	1
Thyroid gland								
Hypertrophy, follicular cell								

Report Title: APD334 L-Arginine: A 3-Month Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]004			
Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
minimal	0	0	0	0	0	0	3	0

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

[b] Group means shown.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

–, no noteworthy findings; +, positive; APTT, activated partial thromboplastin time; $AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; NA, not applicable

Table 9: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Rat 6-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley CD®[Crl:CD®(SD)]	**Duration of Dosing:** 6 months	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009
Initial Age: Approximately 6 weeks of age at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride USP in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 150 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals										
Toxicity	20	20	15	15	15	15	20	20	20	20
Toxicokinetics	3	3	9	9	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics										
C_{max} (µg/mL)										
Day 1	NA	NA	10.6	13.1	32.4	50.1	54.8	78.0	81.2	91.1
Day 182	NA	NA	21.5	45.7	45.4	106	113	201	159	275
AUC_{0-24} (µg·h/mL)										
Day 1	NA	NA	114	155	385	556	803	1150	1310	1850
Day 182	NA	NA	210	442	554	1650	1440	3180	2060	4470
Noteworthy findings										
Died or euthanized										
Toxicity	0	0	0	0	0	1	1	2	7	5

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
Body weight (g) – Treatment period										
Day 7	276.3	204.6	269.0	201.5	267.7	198.3	255.8†	193.8†	235.8†	179.2†
Day 182	743.4	364.2	719.0	349.3	682.2	333.2*	642.2†	333.7*	594.2†	326.7*
Body weight (g) – Recovery period										
Day 210	759.8	362.4	NA	NA	NA	NA	688.2	342.0	638.7	343.3
Food consumption (g/animal/day) – Treatment period										
Week 1	25.11	19.00	22.68†	16.72	22.32†	15.83†	18.93†	13.40†	14.88†	10.85†
Week 26	29.48	18.13	28.79	16.65	29.04	17.34	25.65*	17.07	24.36†	12.25†
Food consumption (g/animal/day) – Recovery period										
Week 30	31.11	17.30	NA	NA	NA	NA	30.52	19.67	24.04	18.96
Clinical observations – Treatment period										
Scheduled Clinical Observations										
Number of Animals Observed	20	20	15	15	15	15	20	20	20	19
Number with No Abnormalities Observed	12	13	9	6	7	8	14	9	10	14
Activity decreased	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Circling counter-clockwise	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Head tilt	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Hypersensitive to touch	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	6/1
Salivation	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	12/5	1/1	17/2	9/1
Vocalization	1/1	1/1	0/0	1/1	0/0	1/1	0/0	3/1	4/2	11/1

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Struggled during dosing	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	3/1	–	0/0
Discharge, brown	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Lacrimation	–	0/0	–	0/0	–	5/1	–	0/0	–	0/0
Material around eyes, black	0/0	0/0	0/0	0/0	3/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Material around eyes, red	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0	–	2/1	–
Material around mouth, black	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Material around nose, black	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Material around nose, brown	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	2/1	–
Material around nose, red	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3	2/2	2/2
Posture hunched	0/0	–	0/0	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–
Eyelid partially/completely closed	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Hair discolored, yellow	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Skin cold to touch	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Skin discolored, pale	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Breathing difficult	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	0/0	–	0/0
Unscheduled Clinical Observations										
Number of Animals Observed	1	1	–	–	1	1	–	2	7	10
Number with No Abnormalities Detected	0	0	–	–	0	0	–	0	0	0
Activity decreased	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	4/3	4/3
Ataxia	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	1/1
Leaning	0/0	–	–	–	–	0/0	–	0/0	–	1/1

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Circling clockwise	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/1	–
Head tilt	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/1	–
Righting reflex lost	–	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	–	1/1
Righting reflex impaired	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/2	–
Stereotypy	–	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	–	2/1
Salivation	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/1	–
Feces discolored, tan	–	0/0	–	–	–	0/0	–	0/0	–	1/1
Feces, few/absent	–	0/0	–	–	–	0/0	–	0/0	–	4/2
Tremors	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/1	–
Lacrimation	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	2/1	2/1
Material around eyes, red	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	2/1	9/4
Material around eyes, black	0/0	0/0	–	–	1/1	0/0	–	0/0	0/0	1/1
Material around nose, red	0/0	0/0	–	–	1/1	0/0	–	0/0	3/2	4/3
Posture hunched	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	4/3	12/9
Thin	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	2/2	8/5
Eye protruding	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	4/1	–
Eyelid partially/completely closed	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	4/2	–
Moribund	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	2/2
Hair discolored, yellow	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	2/1
Hair wet	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	1/1	1/1	0/0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Piloerection	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	1/1
Scabbed area	0/0	0/0	–	–	0/0	1/1	–	0/0	1/1	0/0
Skin cold to touch	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	3/3
Skin discolored, pale	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	1/1	–
Breathing difficult	–	0/0	–	–	–	0/0	–	1/1	–	1/1
Breathing rapid	–	0/0	–	–	–	0/0	–	0/0	–	1/1
Breathing shallow	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	1/1	–
Breathing slow	0/0	0/0	–	–	0/0	0/0	–	0/0	1/1	1/1
Red discharge	0/0	–	–	–	0/0	–	–	–	2/1	–
Unkempt appearance	–	0/0	–	–	–	0/0	–	0/0	–	2/1
Clinical observations – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period										
Leukocytes (10^3/µL)	12.79	8.78	7.03†	3.05†	5.47†	3.09†	4.78†	2.62†	4.87†	2.85†
Erythrocytes (10^6/µL)	8.965	8.163	8.802	8.051	8.567	7.764*	8.741	7.479†	9.020	7.756*
Hemoglobin (g/dL)	15.67	15.29	15.51	15.19	15.21	14.31†	15.02	13.40†	15.00	13.42†
Hematocrit (%)	51.19	48.78	50.90	48.94	49.69	46.44*	49.16	44.06†	49.88	44.31†
MCV (fL)	57.15	59.75	57.85	60.87	58.08	59.81	56.25	58.91	55.31	57.09†
MCH (pg)	17.53	18.73	17.66	18.91	17.79	18.47	17.18	17.94†	16.65*	17.31†
MCHC (g/dL)	30.65	31.35	30.52	31.05	30.62	30.84	30.56	30.44†	30.11	30.29†
Platelets (10^3/µL)	1096.3	904.7	1134.5	963.2	1170.5	1012.0	1322.0†	1067.9†	1497.1†	1226.3†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lymphocytes (10^3/μL)	10.309	7.362	4.062†	1.915†	2.801†	1.818†	2.761†	1.639†	2.752†	1.726†
Monocytes (10^3/μL)	0.300	0.246	0.257	0.157†	0.243	0.163†	0.275	0.146†	0.223	0.174*
Eosinophils (10^3/μL)	0.128	0.089	0.107	0.053†	0.073	0.046†	0.056†	0.038†	0.057†	0.039†
Basophils (10^3/μL)	0.075	0.056	0.047	0.032†	0.043	0.036†	0.043*	0.033†	0.035†	0.035†
Other cells (10^3/μL)	0.125	0.103	0.081	0.050†	0.071	0.048†	0.066†	0.046†	0.066†	0.052†
APTT (s)	18.53	16.33	18.35	16.49	20.17	17.46	26.39†	16.52	42.77†	18.07
Prothrombin time (s)	15.31	14.93	15.77	14.81	17.04†	14.51	20.93†	14.04*	32.90†	13.59†
Hematology/coagulation – Recovery period										
Leukocytes (10^3/μL)	9.92	5.90	NA	NA	NA	NA	7.02	4.18*	5.00†	4.43
MCV (fL)	55.34	59.24	NA	NA	NA	NA	56.42	58.98	58.43†	60.13
Platelets (10^3/μL)	1023.0	918.0	NA	NA	NA	NA	1055.0	1061.3	847.7*	975.0
Lymphocytes (10^3/μL)	7.950	4.794	NA	NA	NA	NA	4.920*	2.553†	3.110†	3.007†
Basophils (10^3/μL)	0.066	0.046	NA	NA	NA	NA	0.034*	0.033	0.023†	0.023
Prothrombin time (s)	15.46	14.72	NA	NA	NA	NA	15.62	15.20*	15.53	15.27*
Clinical chemistry – Treatment period										
Chloride (mEq/L)	99.1	98.7	100.3	99.6	100.5*	100.2*	100.9†	100.7†	101.5†	100.8†
Phosphorus (mg/dL)	9.43	9.08	9.77	8.87	9.73	9.19	9.44	9.14	10.69*	8.83
Alkaline phosphatase (U/L)	82.4	38.3	75.0	38.5	97.9	41.2	124.9*	50.8	118.9	51.0
Total bilirubin (mg/dL)	0.11	0.15	0.17†	0.21†	0.21†	0.27†	0.29†	0.40†	0.52†	0.55†
ALT (U/L)	29.4	39.9	27.3	32.1	31.1	34.9	37.9	34.6	62.7†	34.1
Urea nitrogen (mg/dL)	14.5	13.7	16.3	16.1	16.7*	16.9*	16.5	16.1	18.4†	18.3†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Creatinine (mg/dL)	0.42	0.45	0.51†	0.51†	0.57†	0.57†	0.64†	0.64†	0.81†	0.81†
Total protein (g/dL)	6.99	8.09	6.79	7.83	6.75	7.81	6.82	8.01	6.58*	7.70
Albumin (g/dL)	3.24	4.17	3.18	4.10	3.15	3.92	3.24	4.01	3.10	3.88
Globulin (g/dL)	3.75	3.92	3.61	3.73	3.60	3.89	3.59	4.00	3.48*	3.83
Triglyceride (mg/dL)	91.2	89.3	57.5†	73.3	42.5†	59.0	45.4†	70.9	60.0*	77.2
Cholesterol (mg/dL)	78.9	98.1	92.1	115.7	127.7†	144.0†	154.5†	200.9†	186.7†	231.2†
Glucose (mg/dL)	312.1	274.0	266.9	245.5	296.7	233.6*	255.2	227.3*	194.0†	223.8†
Clinical chemistry – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights (% change) – Treatment period										
Liver										
Absolute (g)	19.162	10.304	+11.29	–3.80	+22.18†	+7.38	+22.52†	+18.64†	+31.85†	+20.95†
Relative (g/100 g body weight)	2.7405	3.0829	+15.36†	+0.10	+32.69†	+19.53†	+44.98†	+31.87†	+70.39†	+39.77†
Relative (g/g brain weight)	8.6519	5.2977	+7.38	–9.30	+18.41†	+0.95	+20.39†	+12.54*	+28.31†	+12.13
Lung										
Absolute (g)	2.257	1.499	+15.68	+18.35†	+9.53	+15.88*	+10.46	+17.21*	+12.76	+18.75†
Relative (g/100 g body weight)	0.3259	0.4462	+18.87*	+24.07†	+17.43	+29.74†	+29.64†	+33.48†	+45.38†	+37.67†
Relative (g/g brain weight)	1.0188	0.7675	+11.72	+12.10	+6.26	+9.20	+8.42	+12.35	+9.91	+10.67
Prostate gland										
Absolute (g)	1.777	NA	–2.19	NA	–4.90	NA	–26.06*	NA	–24.20	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.2601	NA	–1.65	NA	+1.27	NA	–14.38	NA	–4.15	NA

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/g brain weight)	0.7972	NA	–4.88	NA	–7.14	NA	–27.13∗	NA	–25.82∗	NA
Spleen										
Absolute (g)	1.006	0.599	–21.97†	–26.88†	–30.12†	–27.55†	–30.72†	–24.04†	–42.25†	–36.23†
Relative (g/100 g body weight)	0.1442	0.1788	–18.93†	–23.32†	–23.86†	–18.57∗	–17.75†	–15.04	–25.45†	–26.29†
Relative (g/g brain weight)	0.4558	0.3078	–24.99†	–30.99†	–32.60†	–31.77†	–32.32†	–27.97†	–43.99†	–41.00†
Thyroid/parathyroid gland										
Absolute (g)	0.042	0.030	+11.90	0.00	+9.52[b]	+13.33	+33.33†	+23.33†	+33.33†	+33.33†
Relative (g/100 g body weight)	0.0060	0.0089	+18.33	+6.74	+18.33[b]	+29.21†	+56.67†	+40.45†	+75.00†	+53.93†
Relative (g/g brain weight)	0.0190	0.0152	+8.42	–3.29	+5.26[b]	+9.21	+30.53†	+19.74∗	+30.53†	+25.00†
Organ weights (% change) – Recovery period										
Lung										
Absolute (g)	2.255	1.486	NA	NA	NA	NA	+1.46	+4.31	+5.59	+44.89∗
Relative (g/100 g body weight)	0.3059	0.4362	NA	NA	NA	NA	+12.81	+9.77	+22.26	+54.26
Relative (g/g brain weight)	1.0045	0.7322	NA	NA	NA	NA	+3.14	+2.57	–1.76	+46.23
Prostate gland										
Absolute (g)	1.881	NA	NA	NA	NA	NA	–15.31	NA	–32.16∗	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.2567	NA	NA	NA	NA	NA	–6.16	NA	–22.20	NA
Relative (g/g brain weight)	0.8416	NA	NA	NA	NA	NA	–14.27	NA	–37.24∗	NA
Spleen										
Absolute (g)	1.086	0.568	NA	NA	NA	NA	–32.50∗	–12.32	–39.23∗	–31.87†
Relative (g/100 g body weight)	0.1469	0.1658	NA	NA	NA	NA	–25.26∗	–7.12	–29.41∗	–27.86†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/g brain weight)	0.4833	0.2796	NA	NA	NA	NA	–31.51∗	–13.63∗	–43.43†	–31.62†
Thyroid/parathyroid gland										
Absolute (g)	0.030	0.025	NA	NA	NA	NA	+20.00	+16.00	+23.33	+24.00
Relative (g/100 g body weight)	0.0040	0.0074	NA	NA	NA	NA	+35.00∗	+18.92	+50.00∗	+28.38
Relative (g/g brain weight)	0.0132	0.0124	NA	NA	NA	NA	+22.73	+12.10	+17.42	+22.58
Gross pathology – Treatment period	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross pathology – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	–	–	–	–
Histopathology – Treatment period										
Adrenal glands										
hypertrophy, diffuse, cortical bilateral										
minimal	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3
hypertrophy, focal cortical bilateral										
minimal	0	0	0	0	0	2	0	4	0	1
hypertrophy, focal cortical unilateral	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0
minimal	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0
mild	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver										
Focus of cellular alteration (mixed)										
minimal	0	0	0	1	1	0	1	2	2	1
Hyperplasia, bile duct	1	0	4	3	6	5	3	6	4	8
minimal	1	0	3	3	6	4	3	5	2	7

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
mild	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular	0	0	7	3	14	10	14	10	10	12
minimal	0	0	7	3	9	10	0	6	3	6
mild	0	0	0	0	5	0	12	4	5	6
moderate	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
Multinucleated hepatocytes	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Necrosis, individual hepatocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Hypertrophy/hyperplasia, Kupffer cells										
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Pigment increased, Kupffer cells										
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Thyroid										
Hypertrophy, follicular cell, bilateral	0	1	1	0	14	5	13	12	10	12
minimal	0	1	0	0	12[c]	5	1	5	3	3
mild	0	0	1	0	2	0	12	7	7	9
Lymph node, mesenteric										

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Depletion, lymphoid, paracortex	0	1	14	12	15	12	13	11	10	10
minimal	0	1	9	9	6	8	8	8	1	6
mild	0	0	5	3	9	4	5	3	9	4
Erythrocytosis/erythrophagocytosis sinus	0	0	2	0	1	1	1	4	6	3
minimal	0	0	1	0	1	1	1	3	3	2
mild	0	0	1	0	0	0	0	1	3	1
Histiocytosis, sinus	2	2	14	14	15	12	14	14	8	12
minimal	2	2	4	13	9	11	4	10	3	12
mild	0	0	10	1	6	1	10	4	5	0
Hyperplasia, lymphocyte/plasmacyte, medulla	1	0	8	9	11	8	6	9	6	11
minimal	1	0	7	9	9	7	6	9	4	11
mild	0	0	1	0	2	1	0	0	2	0
Spleen										
Depletion, lymphoid, marginal zone	0	0	12	15	15	14	14	14	10	12
minimal	0	0	10	13	8	7	6	8	0	3
mild	0	0	2	2	7	7	8	6	10	9
Thymus										
Hyperplasia, atypical										
mild	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hyperplasia, epithelial cell	0	3	0	6	0	6	0	9	0	7
minimal	0	2	0	6	0	3	0	7	0	6

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
mild	0	1	0	0	0	3	0	2	0	1
Hyperplasia, lymphoid, medulla	0	0	15	15	10	13	12	13	9	12
minimal	0	0	3	5	8	5	1	6	5	4
mild	0	0	12	10	2	8	7	7	4	8
moderate	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
Histopathology – Recovery period										
Liver										
Hyperplasia, bile duct										
minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	0	2	3	1
Multinucleated, hepatocytes										
mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1
Pigment increased, Kupffer cells										
minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	2	1
Thyroid										
Adenoma, follicular cell, benign										
present	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0	0	0
Hypertrophy, follicular cell, bilateral	0	0	NA	NA	NA	NA	5	3	2	3
minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	1	2	0	0
mild	0	0	NA	NA	NA	NA	4	1	2	3
Thymus										
Hyperplasia, lymphoid, medulla	0	0	NA	NA	NA	NA	0	3	3	3

Report Title: APD334 L-Arginine: A 6-Month Oral Toxicity Study in Rats with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]009			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150**		**250**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	0	3	3	1
mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	0	2

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] The thyroid/parathyroid gland weight for one animal at 75 mg/kg/day was excluded from the mean.
[c] Includes animal number 3012 which only had one thyroid examined.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01; ‡p ≤ 0.005, §p ≤ 0.001 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
−, no noteworthy findings; +, positive; ALT, alanine aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; NA, not applicable

Table 10: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 4-Week Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 4 weeks	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008
Initial Age: Approximately 5.5 to 6.5 months at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose[a]: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride, USP in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: Not Calculated		

Note: The surviving animals from the original dose groups of 100, 500/200, and 1000/300 mg/kg/day were terminated early. Dosing for these animals ceased after Day 14 due to their deteriorating physical condition (and lack of appetite), and the groups were then terminated on Day 22 (to allow for a brief 1-week assessment of in-life recovery), though a single dog from the 500/200 mg/kg dose group was terminated on Day 14 (rather than Day 22) due to its more deteriorated condition as compared to the others. In the 500/200 and 1000/300 mg/kg/day groups, neither a drug holiday for both groups (Days 7 and 8 for both groups; Day 6 also for one animal from each group), nor the subsequent lowering of the dose level on Day 9 had an impact. These surviving animals were sacrificed and discarded without necropsy on Day 22, and no tissues were saved based on the fact that a new set of animals was ordered to restart two new study groups at respective dose levels of 40 and 80 mg/kg/day.

[a] High dose group was restarted on [redacted] 20[redacted].

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**100**		**500/200**		**1000/300**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity/Toxicokinetics	5	5	4	4	6	6	6	6
Toxicokinetics[b]								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	94.6	51.6	57.8	100	80.1	75.5
AUC_{last} (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	1560	862	1070	1480	1520	1160
Noteworthy findings								
Died or euthanized								

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**100**		**500/200**		**1000/300**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicity/Toxicokinetics	0	0	4	4	6	6	6	6
Body weight (kg) (% difference) – Treatment period[c]								
Day 14	9.200	8.540	–17	–11	–18	–13	–18	–19
Day 21	9.240	8.620	–5	–5	–6	–6	–7	–10
Body weight (kg) – Recovery period	–	–	–	–	–	–	–	–
Food consumption (g/day) (% difference) – Treatment period[c]								
Week 2	234.91	245.84	–93	–84	–91	–90	–82	–95
Week 3	249.29	251.51	–29	–27	–39	–67	–20	–83
Food consumption (g/day) – Recovery period	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical observations – Treatment period[d]								
Activity decreased	0/0	0/0	0/0	2/1	14/5	15/4	17/6	18/5
Ataxia	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0	0/0
Inappetence	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1
Salivation	0/0	0/0	1/1	6/1	7/4	2/1	12/4	8/5
Tremors	0/0	0/0	2/1	4/1	3/2	6/4	4/3	4/3
Emesis	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Emesis, clear	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Emesis, tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	3/2
Emesis, white	0/0	0/0	1/1	0/0	2/2	1/1	1/1	0/0
Emesis, yellow	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Feces discolored, black	1/1	0/0	1/1	1/1	9/3	4/3	3/3	7/3

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**100**		**500/200**		**1000/300**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Feces discolored, red	0/0	0/0	1/1	0/0	3/1	2/1	0/0	3/2
Feces discolored, yellow	0/0	0/0	3/3	2/2	8/3	6/3	3/2	11/6
Feces hard	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/2	2/2
Feces mucoid	1/1	2/2	9/3	2/1	16/5	17/4	15/5	26/6
Feces soft	6/4	8/4	5/2	5/3	15/5	9/5	6/3	10/6
Feces watery	0/0	0/0	12/4	2/2	19/6	20/5	23/6	28/6
Material in pan/bedding, red	0/0	0/0	2/1	0/0	5/3	5/2	3/1	17/6
Vomitus, clear	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Vomitus, tan	0/0	1/1	4/3	6/3	7/4	19/5	10/5	6/3
Vomitus, white	0/0	0/0	1/1	2/2	15/6	10/6	21/6	17/6
Vomitus, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Emaciated	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/1	2/1	6/2
Gums discolored, pale	0/0	0/0	0/0	0/0	3/1	0/0	0/0	0/0
Lacrimation	1/1	4/1	14/4	27/4	6/1	39/6	9/2	18/4
Posture hunched	0/0	0/0	0/0	3/2	0/0	0/0	2/1	0/0
Thin	0/0	0/0	2/1	4/1	1/1	0/0	0/0	3/1
Loss of skin elasticity	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	2/2	0/0	1/1
Skin cold to touch	0/0	0/0	0/0	4/2	14/3	12/3	6/3	10/3
Skin discolored, pale	0/0	0/0	0/0	0/0	4/1	0/0	0/0	0/0
Unkempt appearance	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0	0/0
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**100**		**500/200**		**1000/300**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Electrocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period (Day 22)[e,f]								
Leukocytes (10^3/µL)	10.84	8.68	11.93	7.20	10.32	6.03	8.72	11.05
Erythrocytes (10^6/µL)	7.216	7.122	6.963	7.730	6.522	7.242	6.573	7.113
Hemoglobin (g/dL)	15.58	15.06	14.73	16.23	13.96	15.55	13.97	14.73
Hematocrit (%)	46.42	44.88	41.23	46.30	40.34	44.20	40.17	42.22
Absolute reticulocytes (10^3/µL)	62.70	32.56	31.83	18.38	31.82	26.28	27.60	20.52
Lymphocytes (10^3/µL)	2.620	3.500	0.740	0.940	0.772	0.618	0.748	0.928
APTT (s)	11.64	11.70	12.18	11.73	11.54	11.47	11.47	11.97
Clinical chemistry – Treatment period[e,f]								
Chloride (mEq/L)	109.2	110.0	111.5	112.3	112.6	112.2	111.0	114.2
Calcium (mg/dL)	10.24	10.32	9.90	9.98	9.78	9.98	9.90	9.72
Total bilirubin (mg/dL)	0.12	0.14	0.28	0.13	0.10	0.13	0.17	0.10
Urea nitrogen (mg/dL)	13.8	15.4	17.0	16.0	14.6	15.7	14.7	11.7
Creatinine (mg/dL)	0.58	0.56	0.48	0.58	0.52	0.55	0.50	0.43
Total protein (g/dL)	5.20	5.24	4.43	4.50	4.52	4.52	4.47	4.43
Albumin (g/dL)	2.90	3.04	2.40	2.63	2.40	2.63	2.42	2.42
Globulin (g/dL)	2.30	2.20	2.03	1.88	2.12	1.88	2.05	2.02
Triglyceride (mg/dL)	51.0	48.0	71.0	64.3	47.4	51.5	58.5	55.0
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**100**		**500/200**		**1000/300**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Group means are shown for treated groups; the control group was only analyzed for plasma concentration. Lower limit of quantitation (LLOQ) = 1.00 (µg/mL).
[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.
[d] Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected.
[e] Group means are shown.
[f] Terminal time point used for vehicle control group.

Notes: ∗$p \leq 0.05$, †$p \leq 0.01$ significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

–, no noteworthy findings; +, positive; APTT, activated partial thromboplastin time; $AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; NA, not applicable

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity/ Toxicokinetics	5	5	4	4	6	6	6	6
Toxicokinetics								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	21.3	20.2	43.1	41.8	49.0	34.8
Day 28	NA	NA	48.8	47.1	100	90.8	139	150
AUC_{0-24} (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	344	355	740	748	875	630
Day 28	NA	NA	925	910	1940	1860	2590	2750
Noteworthy findings								
Died or euthanized[b]								
Toxicity/Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	1	0
Body weight (kg) (% difference from controls) – Treatment period[c]								
Day 14	9.200	8.540	–5	+2	–4	–11	–15†	–21†
Day 21	9.240	8.620	–2	+2	–2	–11	–15†	–19†
Day 28	9.610	8.840	–6	–1	–6	–12∗	–14†	–19†
Body weight (kg) (% difference from controls) – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Food consumption (g/animal/day) (% difference from controls) – Treatment period[c]								
Week 2	234.91	245.84	–9	–21	–31	–41∗	–82†	–67†
Week 4	318.74	297.71	–20	–18	–48∗	–40†	–86	–68†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Food consumption (g/animal/day) (% difference from controls) – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Clinical observations – Treatment period[d]								
Activity decreased	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	7/4	0/0
Salivation	0/0	0/0	0/0	1/1	2/2	0/0	9/4	30/6
Tremors	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Emesis after dosing	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	0/0
Emesis	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0
Emesis, clear	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Emesis, tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2	6/3
Emesis, white	0/0	0/0	0/0	0/0	8/4	3/3	4/3	7/4
Emesis, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	2/2	1/1
Feces discolored, black	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0	1/1
Feces discolored, green	0/0	0/0	0/0	2/1	1/1	0/0	0/0	0/0
Feces discolored, red	0/0	0/0	0/0	0/0	23/2	30/4	11/2	16/4
Feces discolored, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	6/4	5/3	12/3	8/4
Feces mucoid	1/1	2/2	1/1	4/2	27/6	30/4	31/5	31/6
Feces soft	6/4	8/4	3/2	4/3	45/6	68/6	25/6	44/6
Feces watery	0/0	0/0	1/1	2/1	28/4	22/4	45/4	41/6
Material in pan/bedding, red	0/0	0/0	0/0	3/2	1/1	2/1	9/1	0/0
Vomitus, clear	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Vomitus, tan	0/0	1/1	0/0	1/1	14/6	6/4	17/6	15/5

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Vomitus, white	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	2/2	6/5
Vomitus, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/1	5/3
Lacrimation	1/1	4/1	7/1	11/2	22/4	33/6	30/4	49/6
Thin	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	12/3	4/2
Loss of skin elasticity	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	8/2	8/3
Clinical observations – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period[e]								
Leukocytes (10^3/µL)	10.84	8.68	5.33∗	7.40	7.33	9.50	7.06	7.72
Erythrocytes (10^6/µL)	7.216	7.122	6.818	7.038	6.235†	6.517	6.148†	6.323∗
Hemoglobin (g/dL)	15.58	15.06	14.93	15.00	13.32†	13.97	13.06†	13.85
Hematocrit (%)	46.42	44.88	44.45	44.95	38.72†	40.37∗	37.50†	39.67†
Absolute reticulocytes (10^3/µL)	62.70	32.56	61.03	48.40	27.67	41.28	17.44∗	26.03
Lymphocytes (10^3/µL)	2.620	3.500	0.525†	0.700†	0.567†	0.733†	0.474†	0.598†
APTT (s)	11.64	11.70	12.48	13.28∗	12.50	12.92	13.10	13.18∗
Hematology/coagulation – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Clinical chemistry – Treatment period[e]								
Chloride (mEq/L)	109.2	110.0	112.3∗	112.5∗	114.5†	113.7†	114.0†	116.0†
Calcium (mg/dL)	10.24	10.32	9.63†	9.40†	9.55†	9.33†	9.30†	9.13†
Total bilirubin (mg/dL)	0.12	0.14	0.23∗	0.20	0.35†	0.30	0.50†	0.48†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Urea nitrogen (mg/dL)	13.8	15.4	14.5	15.3	15.7	17.0	16.0	17.5
Creatinine (mg/dL)	0.58	0.56	0.58	0.58	0.60	0.60	0.56	0.60
Total protein (g/dL)	5.20	5.24	4.05†	4.15†	4.15†	4.08†	4.10†	4.18†
Albumin (g/dL)	2.90	3.04	2.38†	2.40†	2.35†	2.23†	2.18†	2.22†
Globulin (g/dL)	2.30	2.20	1.68†	1.75†	1.80†	1.85*	1.92†	1.97*
Triglyceride (mg/dL)	51.0	48.0	38.3*	53.8	39.3*	45.7	35.8†	42.7
Clinical chemistry – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights (% difference) – Treatment period[f]								
Lung with bronchi								
Absolute (g)	87.639	80.595	+56*	+82†	+50*	+67†	–3	+17
Relative (g/100 g body weight)	0.9526	0.9456	+60†	+80†	+54†	+90†	+11	+43*
Relative (g/g brain weight)	1.1095	1.1361	+56*	+78†	+56*	+54†	+8	+17
Thymus								
Absolute (g)	7.502	8.505	+54	+27	+96	+22	–11	–19
Relative (g/100 g body weight)	0.0798	0.1001	+58	+25	+104	+34	+4	–3
Relative (g/g brain weight)	0.0948	0.1206	+54	+25	+105	+8	–1	–20
Organ weights (g) – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Gross pathology – Treatment period[g]								
Number examined	3	3	4	4	4	4	4	4
Lymph node, tracheobronchial								

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
discoloration, red								
mild	0	0	0	0	0	0	1	0
enlarged								
mild	0	0	2	3	1	1	0	0
Thymus								
edema								
mild	0	0	1	2	2	0	0	0
moderate	0	0	0	0	0	1	0	0
Gross pathology – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–
Histopathology – Treatment period[g]								
Number examined	3	3	4	4	4	4	4	4
Lung								
edema								
minimal	0	0	2	0	0	0	0	0
mild	0	0	0	0	0	1	0	0
moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
histiocytosis, alveolar								
minimal	0	0	0	3	3	1	2	1
mild	0	0	4	1	1	2	1	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Thymus								
edema								
minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
mild	0	0	1	2	4	1	0	2
Lymph node, mesenteric								
erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
minimal	1	1	1	2	1	3	3	4
mild	0	0	0	0	0	1	0	0
Lymph node, tracheobronchial								
erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
minimal	NE	NE	0	0	2	1	3	3
mild	NE	NE	1	0	1	2	0	1
moderate	NE	NE	2	3	1	0	0	0
severe	NE	NE	0	0	0	1	0	0
Histopathology – Recovery period	–	–	NA	NA	–	–	–	–

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] One male dog from the 80 mg/kg/day group was euthanized in extremis on Day 10. The cause of moribundity was determined to be an accidental dosing injury based on the gross finding of red foci and firmness of lung lobes and microscopic findings of pulmonary edema and hemorrhage.
[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.
[d] Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected.
[e] Group means are shown.
[f] 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.
[g] Reported as number observed.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
–, no noteworthy findings; +, positive; APTT, activated partial thromboplastin time; AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; NA, not applicable; NE, not examined

Table 11: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 4-Week Oral Toxicity Study

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 4 weeks	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007
Initial Age: Approximately 5 to 5.5 months at receipt	**Duration of Postdose:** None	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: 20% v/v ethanol (ethanol 200 proof, USP) in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 2.0 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity/Toxicokinetics	3	3	3	3	3	3	3	3
Toxicokinetics[b]								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	0.0288	0.0216	0.216	0.334	3.04	2.80
Day 28	NA	NA	0.0620	0.0640	0.726	0.574	5.84	5.31
AUC_{last} (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	0.531	0.410	4.05	5.79	56.3	46.8
Day 28	NA	NA	1.27	1.22	14.3	11.2	112	104
Noteworthy findings								
Died or euthanized								
Toxicity	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Body weight (kg)	–	–	–	–	–	–	–	–
Mean body weight change (kg)	–	–	–	–	–	–	–	–
Food consumption (g/day)	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical observations[c]								
Activity decreased	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0
Salivation	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Emesis, clear	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	1/1
Emesis, tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Emesis, yellow	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Vomitus, clear	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Vomitus, tan	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1
Gums discolored, pale	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
Skin cold to touch	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	0/0
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation (terminal)[d]								
Lymphocytes ($10^3/\mu L$)	3.643	3.540	2.330*	2.087	1.090†	0.973*	0.587†	1.267*
Basophils ($10^3/\mu L$)	0.063	0.060	0.047*	0.070	0.003†	0.007*	0.003†	0.027
Clinical chemistry – Treatment period	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights (% difference from controls)[e]								

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lung with bronchi								
Absolute (g)	83.010	60.340	–3	+6	+22	+41	+37	+63*
Relative (g/100 g body weight)	0.9256	0.9092	+0	+2	+38	+44*	+48	+68†
Relative (g/g brain weight)	1.1090	0.8974	+1	+5	+25	+36	+41	+59*
Gross pathology[f]								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Lung with bronchi								
discoloration, tan								
moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node, tracheobronchial								
discoloration, red								
mild	0	0	0	0	1	0	0	1
Histopathology – Treatment period[f]								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Lung								
fibrosis								
minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
mild	0	0	0	0	0	0	1	0
histiocytosis, alveolar								
minimal	3	3	3	3	1	0	1	0
mild	0	0	0	0	2	3	2	3

Report Title: APD334 L-Arginine: 4-Week Oral Toxicity Study in Dogs							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2.0**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lymph node, tracheobronchial								
erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus								
minimal	3	3	3	1	2	1	0	0
mild	0	0	0	1	1	2	3	3

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Group means are shown. Below limit of quantification (BLQ) = 1.00 (ng/mL).
[c] Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected.
[d] Group means are shown.
[e] 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.
[f] Reported as number observed.

Notes: ∗$p \leq 0.05$, †$p \leq 0.01$ significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
−, no noteworthy findings; +, positive; AUC_{last}, area under concentration-time curve from time 0 to the last quantifiable postdose concentration; BLQ, below the limit of quantification; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; NA, not applicable

Table 12: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 3-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 3 months	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005
Initial Age: 6 to 6.5 months of age at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride USP in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 15 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity								
Toxicokinetics	6	6	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics[b]								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	NA	NA	0.982	0.957	5.50	5.55	17.3	13.2
Day 90	NA	NA	2.81	2.62	13.4	14.0	52.3	49.6
AUC_{last} (µg·h/mL)								
Day 1	NA	NA	18.3	17.4	101	96.4	313	253
Day 90	NA	NA	52.6	50.1	259	265	1030	1000
Noteworthy findings								
Died or euthanized								
Toxicity	0	0	0	0	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight (kg) – Treatment period								
Week 13	10.217	8.267	10.558	8.358	10.125	7.800	9.350	7.917
Body weight (kg) – Recovery period								
Week 17	10.550	9.300	11.275	8.925	10.750	7.550	10.200	9.00
Food consumption (g/animal/day) – Treatment period								
Week 13	315.80	283.05	291.37	238.60	323.33	238.48	261.81	221.67∗
Food consumption (g/animal/day) – Recovery period								
Week 17	153.59	325.79	260.43	296.86	346.67	278.86	322.43	275.66
Clinical observations – Treatment period[c]								
Salivation	0/0	–	3/1	–	0/0	–	6/2	–
Thin	–	0/0	–	0/0	–	1/1	–	2/1
Feces mucoid	0/0	1/1	1/1	4/2	2/2	2/2	0/0	2/1
Feces soft	5/1	2/2	18/6	3/2	14/5	7/3	9/5	9/5
Clinical observations – Recovery period	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period								
Leukocytes (10^3/µL)	8.75	10.42	5.13†	6.70†	5.20†	5.12†	6.58∗	6.08†
Eosinophils (10^3/µL)	0.307	0.277	0.163∗	0.222	0.080†	0.052†	0.092†	0.110∗
Basophils (10^3/µL)	0.043	0.097	0.005†	0.007†	0.010†	0.008†	0.008†	0.003†

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lymphocytes (10^3/µL)	3.048	3.615	0.660†	0.613†	0.748†	0.505†	0.677†	0.565†
Other Cells (10^3/µL)	0.062	0.118	0.015†	0.015†	0.025†	0.010†	0.027†	0.028†
APTT (s)	10.60	10.73	11.25*	11.35	11.87†	12.07†	11.48†	12.13†
Hematology/coagulation – Recovery period								
Lymphocytes (10^3/µL)	2.690	4.035	2.990	2.465	1.860	1.530	0.880	0.805
Clinical chemistry – Treatment period								
Chloride (mEq/L)	112.0	111.8	113.7	113.7*	114.0*	114.3†	114.2*	113.3*
Calcium (mg/dL)	10.37	10.42	10.20	10.17	9.88†	10.07	9.72†	9.83†
Total bilirubin (mg/dL)	0.18	0.20	0.15	0.18	0.20	0.20	0.25	0.27†
GGT (U/L)	2.7	2.5	2.2	2.0	1.8*	1.5*	1.8*	1.6*
AST (U/L)	30.5	28.5	22.8†	23.8	23.0†	24.5	22.3†	20.3†
ALT (U/L)	30.5	28.2	28.7	21.3*	20.3†	22.0*	20.8*	17.8†
Total protein (g/dL)	5.63	5.87	5.13†	5.10†	4.87†	5.07†	4.78†	4.63†
Albumin (g/dL)	3.13	3.28	2.93	2.95*	2.77†	3.12	2.65†	2.72†
Globulin (g/dL)	2.50	2.58	2.20*	2.15*	2.10†	1.95†	2.13†	1.92†
Cholesterol (mg/dL)	140.7	182.0	123.2	108.3†	115.0†	112.8†	124.8	124.7†
Clinical chemistry – Recovery period								
Total protein (g/dL)	5.40	5.80	5.55	5.50	5.20	5.50	5.30	5.25
Albumin (g/dL)	2.95	3.05	2.80	2.80	2.80	3.05	2.80	3.00
Globulin (g/dL)	2.45	2.75	2.75	2.70	2.40	2.45	2.50	2.25
Cholesterol (mg/dL)	159.0	206.5	142.5	134.0	152.5	152.0	147.0	157.5

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Calcium (mg/dL)	10.05	10.45	10.30	10.55	10.10	10.35	9.90	10.40
Chloride (mEq/L)	111.5	110.5	111.5	111.5	113.5	112.5	113.0	113.0
Alkaline phosphatase (U/L)	60.5	91.5	57.0	41.5	72.5	53.5	62.0	47.0
GGT (U/L)	3.0	5.5	2.0	2.0	3.5	2.5	2.5	2.0
AST (U/L)	27.5	25.0	22.5	25.5	22.5	27.0	22.5	17.0
ALT (U/L)	27.0	27.5	31.0	21.5	24.5	28.0	27.5	22.5
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights – Treatment period								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Lung with bronchi								
Absolute (g)	80.587	70.734	103.754	83.408*	111.206	83.751*	119.145*	95.120†
Relative (g/100 g body weight)	0.7964	0.9180	1.0154	1.0461	1.1526*	1.0699	1.3162†	1.2281†
Relative (g/g brain weight)	1.0489	0.9921	1.3972	1.1951	1.4255	1.2272	1.5415*	1.3338*
Thymus								
Absolute (g)	14.462	7.996	11.075	12.848	16.413	11.321	21.275	17.006†
Relative (g/100 g body weight)	0.1430	0.1022	0.1075	0.1624	0.1658	0.1446	0.2321	0.2188†
Relative (g/g brain weight)	0.1893	0.1096	0.1497	0.1847	0.2043	0.1658	0.2709	0.2385†
Organ weights – Recovery period								
Lung with bronchi								
Absolute (g)	82.561	73.543	89.415	81.636	108.396	81.832	102.238	83.855
Relative (g/100 g body weight)	0.8033	0.8227	0.8259	0.9603	1.0550	1.1194	1.0555	0.9791

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/g brain weight)	0.9331	1.0134	1.1812	1.0786	1.3223	1.1611	1.2772	1.1939
Thymus								
Absolute (g)	13.030	13.806	14.970	8.236	21.281	6.664	16.412	18.634
Relative (g/100 g body weight)	0.1268	0.1523	0.1352	0.0968	0.2063	0.0902	0.1678	0.2186
Relative (g/g brain weight)	0.1477	0.1927	0.1976	0.1091	0.2603	0.0944	0.2068	0.2649
Gross pathology – Treatment period								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Thymus								
edema								
mild	0	–	0	–	1	–	0	–
enlarged								
mild	0	–	0	–	0	–	2	–
Gross pathology – Recovery period								
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2
All tissues								
within normal limits	2	2	2	1	1	2	1	2
Pituitary gland								
cyst								
mild	0	0	0	1	1	0	1	0
Histopathology – Treatment period								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Heart								
Hypertrophy/hyperplasia, tunica media	0	0	2	1	2	3	2	4
minimal	0	0	1	1	0	3	1	4
mild	0	0	1	0	2	0	1	0
Lung								
fibrosis								
minimal	0	0	0	0	1	1	4	1
histiocytosis, alveolar	0	0	2	1	1	1	4	2
minimal	0	0	1	1	0	1	2	1
mild	0	0	1	0	1	0	2	1
Lymph node, mandibular								
Depletion, lymphoid, generalized	0	0	4	2	3	3	4	2
minimal	0	0	3	2	3	3	4	2
mild	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric								
Depletion, lymphoid, generalized	0	0	3	4	3	4	4	4
minimal	0	0	3	4	1	4	3	2
mild	0	0	0	0	2	0	1	2
Thymus								
Edema								
minimal	0	0	0	0	1	2	3	4

Report Title: APD334 L-Arginine: 3-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]005			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**1**		**5**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Histopathology – Recovery period								
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2
Heart								
hypertrophy/hyperplasia, tunica media	0	0	1	1	2	1	2	1
minimal	0	0	1	1	1	1	1	1
mild	0	0	0	0	1	0	1	0
Lung								
fibrosis								
minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node, mandibular								
depletion, lymphoid, generalized								
minimal	0	0	1	1	1	0	2	1
Lymph node, mesenteric								
depletion, lymphoid, generalized								
minimal	0	0	0	0	2	2	2	2

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

[b] Group means are shown for treated groups.

[c] Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

–, no noteworthy findings; +, positive; ALT, alanine aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; AUC_{last}, area under concentration-time curve from time 0 to last quantifiable postdose concentration; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; GGT, gamma-glutamyl transferase; NA, not applicable

Table 13: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Dog 9-Month Oral Toxicity Study with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 9 months	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008
Initial Age: ~5 to 6 months of age at receipt	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride, USP in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 15 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals										
Toxicity/Toxicokinetics	6	6	4	4	4	4	6	6	6	6
Toxicokinetics[b]										
C_{max} (µg/mL)										
Day 1	NA	NA	2.03	1.88	12.2	5.23	11.5	10.2	22.5	19.8
Day 273	NA	NA	6.24	6.80	14.4	17.9	27.3	28.7	46.9	45.7
AUC_{0-24} (µg·h/mL)										
Day 1	NA	NA	38.0	36.9	173	98.8	213	191	418	379
Day 273	NA	NA	114	128	269	335	542	586	879	861
Noteworthy findings										
Died or euthanized	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body weight (kg) – Treatment period										
Week 39	10.833	8.125	10.350	8.025	9.613	7.863	9.575	8.175	8.950*	7.825

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Body weight (kg) – Recovery period										
Week 43	11.350	8.375	NA	NA	NA	NA	9.275	8.575	9.200	8.650
Food consumption (g/animal/day) – Treatment period										
Week 39	275.14	228.48	290.29	187.18	251.46	240.00	231.26	220.76	223.02	201.79
Food consumption (g/animal/day) – Recovery period										
Week 43	331.14	303.14	NA	NA	NA	NA	224.29	277.64	247.43	233.0
Clinical observations – Treatment period[c]										
Feces mucoid	11/4	6/5	19/4	6/4	16/4	20/4	25/6	19/6	18/6	15/4
Feces soft	23/6	8/5	36/4	7/4	48/4	16/4	58/6	34/6	67/6	27/3
Feces watery	2/2	0/0	11/4	0/0	8/3	0/0	12/5	2/2	10/4	2/2
Lacrimation	0/0	1/1	52/3	68/3	99/4	16/2	28/4	87/3	160/5	107/5
Eye/Ocular, sclera injected	0/0	0/0	2/2	0/0	12/2	0/0	41/4	30/4	6/1	13/3
Clinical observations – Recovery period										
Feces mucoid	2/2	–	NA	NA	NA	NA	2/2	–	6/2	–
Feces soft	4/2	–	NA	NA	NA	NA	0/0	–	6/2	–
Feces watery	0/0	–	NA	NA	NA	NA	0/0	–	1/1	–
Lacrimation	–	0/0	NA	NA	NA	NA	–	1/1	–	1/1
Ophthalmology – Treatment period[d]										
Conjunctivitis (red)	0	0	0	0	1	0	3	0	4	1
Keratitis – superficial	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Ocular discharge – purulent	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Ocular discharge – clear	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0
Ophthalmology – Recovery period	–	–	NA	NA	NA	NA	–	–	–	–
Electrocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Treatment period										
Leukocytes (10^3/µL)										
6 months	10.02	10.52	5.38†	6.50	5.58†	6.08	4.87†	4.73†	5.60†	6.88*
9 months	8.75	9.23	5.50*	5.28†	5.80	4.85†	4.68†	4.63†	5.50*	5.27†
Absolute Reticulocytes (10^3/µL)										
6 months	37.03	49.55	49.70	42.90	60.20	35.25	51.88	35.08	43.65	57.87
9 months	28.57	31.65	63.40*	44.65	58.58*	35.08	54.72*	27.02	39.38	43.25
Neutrophils (10^3/µL)										
6 months	5.887	6.502	4.253	5.323	4.608	5.225	4.030	4.017	4.687	6.000
9 months	5.403	5.627	4.368	4.243	4.728	4.035	3.868	3.870*	4.598	4.495
Lymphocytes (10^3/µL)										
6 months	3.225	3.255	0.488†	0.675†	0.565†	0.438†	0.450†	0.420†	0.507†	0.453†
9 months	2.645	2.912	0.500†	0.575†	0.645†	0.453†	0.433†	0.427†	0.497†	0.455†
Monocytes (10^3/µL)										
6 months	0.613	0.462	0.425	0.353	0.323*	0.350	0.282†	0.235†	0.327†	0.287
9 months	0.425	0.368	0.265	0.295	0.290	0.280	0.250	0.200*	0.287	0.173†
Eosinophils (10^3/µL)										
6 months	0.192	0.190	0.190	0.095	0.043†	0.043†	0.088*	0.063†	0.063†	0.100

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
9 months	0.200	0.208	0.353	0.145	0.085	0.053*	0.122	0.112	0.095	0.095
Basophils (10^3/µL)										
6 months	0.057	0.058	0.008	0.020	0.013	0.010	0.007	0.010	0.010	0.010
9 months	0.050	0.075	0.005	0.020	0.013	0.008	0.012	0.008	0.010	0.018
Other cells (10^3/µL)										
6 months	0.038	0.037	0.000†	0.003	0.003†	0.005	0.000†	0.003	0.010	0.003
9 months	0.033	0.037	0.000*	0.010	0.003	0.008	0.002*	0.003	0.007	0.005
APTT (s)										
6 months	10.43	10.87	11.70†	11.80	11.63†	11.45	11.42†	12.08†	11.55†	11.77*
9 months	10.37	10.75	11.60†	11.68*	11.40†	11.60*	11.32†	11.85†	11.62†	11.53*
Hematology/coagulation – Recovery period										
Lymphocytes (10^3/µL)	3.175	3.790	NA	NA	NA	NA	1.210	0.795	0.950	0.720
Leukocytes (10^3/µL)	10.35	12.20	NA	NA	NA	NA	8.10	7.15	7.65	5.35
Monocytes (10^3/µL)	0.610	0.705	NA	NA	NA	NA	0.455	0.525	0.365	0.415
Eosinophils (10^3/µL)	0.250	0.310	NA	NA	NA	NA	0.215	0.180	0.450	0.135
Basophils (10^3/µL)	0.035	0.085	NA	NA	NA	NA	0.050	0.025	0.035	0.015
Other cells (10^3/µL)	0.020	0.045	NA	NA	NA	NA	0.010	0.010	0.010	0.005
APTT (s)	10.95	10.90	NA	NA	NA	NA	11.15	11.80	11.45	11.15
Clinical chemistry – Treatment period										
Calcium (mg/dL)										
6 months	10.42	10.23	9.95†	10.08	9.88†	9.55*	9.73†	9.73*	9.65†	9.92

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
9 months	10.45	10.52	9.93∗	10.13	9.73†	9.53†	9.75†	9.75∗	9.48†	9.72†
Total bilirubin (mg/dL)										
6 months	0.12	0.20	0.18	0.20	0.15	0.20	0.18	0.22	0.22†	0.28†
9 months	0.15	0.20	0.18	0.20	0.20	0.20	0.20	0.22	0.25∗	0.28†
GGT (U/L)										
6 months	2.3	3.0	1.8	2.0	2.3	2.5	1.8	1.7∗	1.7	2.0
9 months	2.8	3.0	1.8∗	2.5	2.3	2.3	2.0	1.8	1.5†	2.3
Total protein (g/dL)										
6 months	5.58	5.57	5.03†	4.73†	5.05†	4.83†	4.70†	4.73†	4.82†	4.90†
9 months	5.70	5.67	5.03†	4.68†	5.05†	4.88†	4.67†	4.82†	4.77†	4.78†
Albumin (g/dL)										
6 months	3.20	3.15	3.00	2.70	2.93	2.80	2.63†	2.83†	2.72†	2.92∗
9 months	3.17	3.25	2.95	2.65†	2.85	2.83∗	2.65†	2.80∗	2.58†	2.83∗
Globulin (g/dL)										
6 months	2.38	2.42	2.03†	2.03∗	2.13∗	2.03∗	2.07†	1.90†	2.10†	1.98†
9 months	2.53	2.42	2.08†	2.03∗	2.20∗	2.05∗	2.02†	2.02∗	2.18†	1.95†
Cholesterol (mg/dL)										
6 months	179.0	208.2	120.0†	142.3	129.5∗	143.5	130.7†	123.5†	144.2	148.7
9 months	165.7	200.7	110.5†	134.3†	114.0∗	130.5†	127.8	126.2†	136.5	144.2†
Clinical chemistry – Recovery period										
Total protein (g/dL)	5.70	6.35	NA	NA	NA	NA	5.35	5.05	5.55	5.15

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Albumin (g/dL)	3.10	3.15	NA	NA	NA	NA	2.85	2.95	2.80	2.95
Globulin (g/dL)	2.60	3.20	NA	NA	NA	NA	2.50	2.10	2.75	2.20
Cholesterol (mg/dL)	170.0	245.5	NA	NA	NA	NA	129.5	138.0	138.5	171.0
Calcium (mg/dL)	10.00	10.60	NA	NA	NA	NA	9.95	9.90	9.70	10.00
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights (% difference relative to control) – Treatment period										
Lung with bronchi										
Absolute (g)	72.061	63.830	+31.72	+22.20	+26.54	+24.14	+27.83	+29.63	+30.71	+17.58
Relative (g/100 g body weight)	0.7014	0.8100	+34.16	+22.93*	+40.60	+27.43*	+39.79	+30.10*	+53.95*	+27.30*
Relative (g/g brain weight)	0.9700	0.8956	+30.45	+27.76	+27.52	+24.00	+19.95	+19.51	+30.02	+12.77
Thymus										
Absolute (g)	8.336	8.425	+52.30	+8.96	+61.60	–3.25	+69.06	+40.01	+44.05	+23.36
Relative (g/100 g body weight)	0.0819	0.1049	+52.50	+12.77	+73.75	+1.91	+83.52	+40.99	+71.06	+35.65
Relative (g/g brain weight)	0.1121	0.1176	+51.56	+13.35	+63.43	–2.81	+60.30	+31.55	+46.57	+18.71
Prostate										
Absolute (g)	10.547	NA	–43.01†	NA	–51.41†	NA	–39.19*	NA	–44.34†	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.1027	NA	–41.97*	NA	–47.42†	NA	–32.23	NA	–34.96	NA
Relative (g/g brain weight)	0.1438	NA	–44.30†	NA	–51.53†	NA	–42.42*	NA	–45.41†	NA
Organ weights (% difference relative to control) – Recovery period										
Lung with bronchi										
Absolute (g)	83.964	65.436	NA	NA	NA	NA	–12.86	+3.84	–2.77	+15.78

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/100 g body weight)	0.7380	0.7973	NA	NA	NA	NA	+17.33	+0.87	+24.19	+11.04
Relative (g/g brain weight)	1.0701	0.9672	NA	NA	NA	NA	–10.97	–10.55	+8.77	–0.05
Thymus										
Absolute (g)	7.942	9.070	NA	NA	NA	NA	+38.79	+37.67	+14.95	+64.01
Relative (g/100 g body weight)	0.0685	0.1104	NA	NA	NA	NA	+75.04	+33.79	+45.69	+57.88
Relative (g/g brain weight)	0.1042	0.1341	NA	NA	NA	NA	+33.11	+18.87	+29.46	+39.97
Prostate										
Absolute (g)	9.937	NA	NA	NA	NA	NA	–24.80	NA	–45.56	NA
Relative (g/100 g body weight)	0.0876	NA	NA	NA	NA	NA	–8.33	NA	–30.71	NA
Relative (g/g brain weight)	0.1260	NA	NA	NA	NA	NA	–25.71	NA	–38.73	NA
Gross pathology – Treatment period										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Lung with bronchi										
discoloration, tan										
mild	0	–	0	–	0	–	0	–	2	–
Gross pathology – Recovery period	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology – Treatment period										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Heart										
Degeneration, myofiber										
minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Hypertrophy/hyperplasia, tunica media	0	0	3	1	4	3	3	4	3	3
minimal	0	0	1	1	3	1	0	2	1	2
mild	0	0	2	0	0	2	2	2	2	1
moderate	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Infiltration/inflammation, mixed cell										
minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell										
minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lung										
Fibrosis, pleural, focal	0	0	3	2	3	1	3	2	4	1
minimal	0	0	3	1	2	1	3	2	3	1
mild	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Lymph node, mesenteric										
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus	0	0	2	3	1	0	3	3	3	3
minimal	0	0	2	2	1	0	3	3	3	2
mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Thymus										
Edema										
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Histopathology – Recovery period										
Number Examined	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2

Report Title: APD334 L-Arginine: 9-Month Oral Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period							**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]008			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**2**		**5**		**10**		**15**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Heart										
Hypertrophy/hyperplasia, tunica media	0	0	NA	NA	NA	NA	2	1	1	2
minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	2	1	0	1
mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0	1	1
Lymph node, mesenteric										
Erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus										
minimal	1	2	NA	NA	NA	NA	0	2	1	1

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Group means are shown for treated groups.
[c] Reported as Number of Times Observed/Total Number of Animals Affected.
[d] Results are from slit-lamp microscopy examinations.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

–, no noteworthy findings; +, positive; APTT, activated partial thromboplastin time; AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; GGT, gamma-glutamyl transferase; NA, not applicable

2.6.7.8. GENOTOXICITY: IN VITRO

Table 14: Genotoxicity In Vitro: Bacterial Mutagenicity Assay

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:** 3	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]011
Species/Strains: S. typhimurium, E. coli	**Number of Replicate Cultures:** 3	**Lot Article:** [redacted]
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 (7.5% v/v)	**S9 Batch Number:** [redacted]	**GLP Compliance:** Yes
Test Article Vehicle: DMSO	**Positive Control Vehicle(s):** DMSO	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted], and [redacted] 20[redacted]
Treatment: Plate incorporation for 2 days		
Cytotoxic Effects: ≥ 100 µg/plate in TA100 –S9; ≥ 250 µg/plate in TA1537 –S9; ≥ 500 µg/plate in TA1535 –S9; ≥ 1000 µg/plate in TA98 –S9; ≥ 2500 µg/plate in TA1537, TA100, and TA1535 +S9		
Genotoxic Effects: None		

Report Title: APD334 L-Arginine: Bacterial Reverse Mutation Test						**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]011
Test Article	**Dose (µg/plate)**	**Salmonella typhimurium**				**Escherichia coli**
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Preliminary Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3 Plates ± Standard Deviation)						
Without metabolic activation						
DMSO	50 µL	14 ± 6	94 ± 11	5 ± 6	4 ± 1	46 ± 9
APD334 L-arginine	25	13 ± 4	93 ± 3	7 ± 3	3 ± 1	43 ± 11
	50	13 ± 5	76 ± 14	7 ± 5	3 ± 2	35 ± 6
	100	13 ± 6	NC[a]	4[b] ± 1	3[b] ± 0	36 ± 6
	250	14 ± 3	NC[a]	7[b] ± 0	NC[a]	27 ± 7
	500	11 ± 3	NC[a]	NC[a]	NC[a]	27 ± 5
	1000	6[c] ± 3	NC[a]	NC[a]	NC[a]	23 ± 5
	2500	5[c] ± 2	NC[a]	NC[a]	NC[a]	31 ± 10
	5000	4[c] ± 1	NC[a]	NC[a]	NC[a]	25 ± 4

Report Title: APD334 L-Arginine: Bacterial Reverse Mutation Test					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]011	
Test Article	**Dose (µg/plate)**	**Salmonella typhimurium**				**Escherichia coli**
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
PC[d]	NA	583 ± 51	562 ± 183	397 ± 42	213 ± 2	1046 ± 8
With metabolic activation						
DMSO	50 µL	13 ± 3	98 ± 1	7 ± 2	4 ± 1	41 ± 18
APD334 L-arginine	25	16 ± 5	106 ± 15	6 ± 3	4 ± 4	37 ± 5
	50	13 ± 3	116 ± 14	8 ± 4	5 ± 4	44 ± 2
	100	14 ± 1	96 ± 5	8 ± 5	6 ± 3	38 ± 5
	250	17 ± 2	83 ± 2	9 ± 5	3 ± 2	43 ± 5
	500	14 ± 3	86 ± 10	6 ± 1	2 ± 2	39 ± 6
	1000	19 ± 2	92 ± 12	7 ± 4	1 ± 1	37 ± 7
	2500	14 ± 7	NC[a]	NC[a]	NC[a]	42 ± 6
	5000[e]	9 ± 2	NC[a]	NC[a]	NC[a]	29 ± 6
PC[f]	NA	1265 ± 146	877 ± 47	132 ± 38	114 ± 11	363 ± 41

Assays 2 and 3
Revertant Colony Counts (Mean of 3 Plates ± Standard Deviation)

Test Article	**Dose (µg/plate)**	**Salmonella typhimurium**				**Escherichia coli**
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without metabolic activation						
DMSO	50 µL	11 ± 2[g]	117 ± 21[g]	8 ± 2[h]	4 ± 4[g]	22 ± 8[g]
APD334 L-arginine	2.5	NT	126 ± 14	NT	NT	NT
	5.0	NT	118 ± 16	NT	5 ± 2	NT
	10	NT	105 ± 15	7 ± 5	4 ± 3	NT
	25	NT	109 ± 30	9 ± 3	2 ± 1	NT
	50	11 ± 2	88 ± 28	5 ± 1	3 ± 2	32 ± 8
	100	12 ± 1	91 ± 24	6 ± 3	2 ± 1	27 ± 5
	250	9 ± 6	NT	4 ± 2	NC[a]	27 ± 6

Report Title: APD334 L-Arginine: Bacterial Reverse Mutation Test					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]011	
Test Article	**Dose (µg/plate)**	**Salmonella typhimurium**				**Escherichia coli**
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
	500	8 ± 5	NT	1[b,c] ± 0	NT	20 ± 2
	1000	8 ± 1	NT	NT	NT	27 ± 4
	2500	4[c] ± 1	NT	NT	NT	22 ± 8
	5000	3[c] ± 2	NT	NT	NT	17 ± 2
PC[d]	NA	503 ± 28	457 ± 82	280 ± 27	195 ± 16	1219 ± 16
With metabolic activation						
DMSO	50 µL	14 ± 5	114 ± 13	7 ± 2	3 ± 2	26 ± 3
APD334 L-arginine	50	15 ± 4	119 ± 13	4 ± 2	4 ± 3	31 ± 10
	100	23 ± 6	109 ± 7	11 ± 6	2 ± 1	39 ± 3
	250	16 ± 6	102 ± 27	4 ± 2	4 ± 3	34 ± 9
	500	21 ± 8	109 ± 21	7 ± 2	2 ± 2	30 ± 10
	1000	13 ± 5	100 ± 12	5 ± 1	3 ± 2	29 ± 9
	2500	11[b] ± 2	39[b,c] ± 3	1[b,c] ± 2	NC[a]	31 ± 9
	5000[e]	11[b] ± 3	NT	NT	NT	28 ± 5
PC[f]	NA	2040 ± 142	1633 ± 490	188 ± 22	194 ± 19	406 ± 28

[a] Cytotoxicity: reduced background lawn, plates not counted.
[b] Slightly reduced background lawn.
[c] Cytotoxicity: > 50% reduction in mean number of revertant colonies.
[d] Positive controls are 2-nitrofluorene at 2.5 µg/plate (TA98); sodium azide at 1.0 µg/plate (TA100 and TA1535); ICR-191 acridine at 0.5 µg/plate (TA1537); and 4-nitroquinoline-N-oxide at 2.0 µg/plate (WP2uvrA).
[e] Precipitates present.
[f] Positive controls are 2-aminoanthracene at 2.5 µg/plate (TA98, TA100, TA1535, and TA1537); and at 10.0 µg/plate (WP2uvrA).
[g] Assay date: [redacted] 20[redacted].
[h] Assay date: [redacted] 20[redacted].
DMSO, dimethyl sulfoxide; NA, not applicable; NC, data not collected; NT, not tested; PC, positive control; S9, metabolic activation mixture

Table 15: Genotoxicity In Vitro: Chromosomal Aberration Assay

Test for Induction of: Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:** 3	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]012
Strains: Human peripheral blood lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:** 2	**Lot Article:** [redacted]
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 (1.5%)	**Number of Cells Analyzed/Culture:** 100	**GLP Compliance:** Yes
S9 Batch Number: [redacted]	**Positive Control Vehicle(s):** DMSO	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Test Article Vehicle: DMSO		
Treatment: Continuous treatment for 22 hours without S9; pulse treatment for 3 hours with and without S9. All cultures harvested at 22 hours.		
Cytotoxic Effects[a]**:** 51% and 37% at 150 and 125 µg/mL in 3 hours with and without S9, respectively, and 54% at 40 µg/mL at 22 hours without S9.		
Genotoxic Effects: None		

[a] Based on mitotic index (% of control MI).

Report Title: APD334 L-Arginine: In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes				**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]012	
Test Article	**Dose (µg/mL)**	**Total Metaphase Cells Analyzed**	**Mitotic Reduction (%)**	**Cells with Aberrations (%)**	**Polyploid Cells (%)**
3-hour treatment without metabolic activation					
DMSO	1%	200	0	0.0	0.3
APD334 L-arginine	50	200	−2	0.0	0.8
	100	200	18	1.5	2.8*
	125	200	63	2.0	0.8
MMC	0.8	200	48	83.3*	0.0
22-hour treatment without metabolic activation					
DMSO	1%	200	0	0.5	0.3
APD334 L-arginine	10	200	3	1.0	0.8
	30	200	21	0.0	0.8

Report Title: APD334 L-Arginine: In Vitro Chromosome Aberration Test in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes				**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]012	
Test Article	**Dose (µg/mL)**	**Total Metaphase Cells Analyzed**	**Mitotic Reduction (%)**	**Cells with Aberrations (%)**	**Polyploid Cells (%)**
	40	200	46	0.0	0.5
MMC	0.4	200	43	90.9*	0.3
3-hour treatment with metabolic activation					
DMSO	1%	200	0	2.5	0.0
APD334 L-arginine	10	200	4	1.0	0.5
	50	200	23	1.0	0.5
	150	200	49	2.5	0.3
CP	10	200	50	53.6*	0.0

Notes: *$p \leq 0.01$, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
CP, Cyclophosphamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; MI, Mitotic Index; MMC, mitomycin C; S9, metabolic activation mixture

2.6.7.9. GENOTOXICITY: IN VIVO

Table 16: Genotoxicity In Vivo: Oral Bone Marrow Micronucleus Test in Rats

Report Title: APD334 L-Arginine: Oral Bone Marrow Micronucleus Test in Rats		
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	**Treatment Schedule:** Three daily doses	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]013
Age: 8 weeks	**Sample Time:** 24 hours after last dose	**GLP Compliance:** Yes
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes	**Method of Administration:** Oral gavage	**Date of Treatment:** [redacted]-[redacted] [redacted] 20[redacted][a]
Number of Cells Analyzed/Animal: 2000	**Control Article/Formulation:** L-Arginine hydrochloride in deionized water	
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: Body weight loss at 150 and 300 mg/kg/day; clinical findings at 300 mg/kg/day; decreased PCE:TE ratio at ≥ 25 mg/kg/day in females		
Genotoxic Effects: Increase in % MN-PCEs at 300 mg/kg/day in females; weakly positive response for induction of bone marrow micronuclei		
Evidence of Exposure: Overt toxicity at ≥ 150 mg/kg/day		

[a] Positive control cyclophosphamide animals dosed 24 hours prior to study termination.

Report Title: APD334 L-Arginine: Oral Bone Marrow Micronucleus Test in Rats					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]013	
Test Article	**Dose[a] (mg/kg/day)**	**Number/Sex/ Group**	**PCE:TE Ratio Mean ± Standard Deviation**		**%MN-PCE Mean ± Standard Deviation**	
			Male	**Female**	**Male**	**Female**
Vehicle	0	5M/5F	0.51 ± 0.10	0.56 ± 0.07	0.09 ± 0.05	0.06 ± 0.07
APD334 L-arginine	25	5M/5F	0.41 ± 0.06	0.40 ± 0.06*	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.08
	150	5M/5F	0.33 ± 0.17	0.41 ± 0.07*	0.08 ± 0.08	0.10 ± 0.05
	300	5M/5F	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.13*	0.07 ± 0.06	0.19 ± 0.07*
Cyclophosphamide	60	5M/5F	0.40 ± 0.09	0.32 ± 0.12*	1.33 ± 0.44*	0.91 ± 0.11*

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

Notes: *p ≤ 0.05, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

F, female; M, Male; %MN-PCE, percentage of micronucleated polychromatic erythrocytes; PCE, polychromatic erythrocytes; TE, total erythrocytes

2.6.7.10. CARCINOGENICITY

Table 17: Carcinogenicity: 28-Day Dose Range-Finding Study to Support 104-Week Mouse Oncogenicity Study

Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Mouse/Crl:CD1® (ICR)	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted],	28 days	30, 100, 300/200	10M/10F (Toxicity Study) 39 + 2M/ 39 + 2F (TK Study)	200	Mortality noted at 300 mg/kg/day through Day 6; dose was reduced to 200 mg/kg/day with no further mortality.	TX[redacted]003/ No

Toxicokinetic Parameters:

Dose[a] (mg/kg/day)	30		100		300/200[b]	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Day 1						
C_{max} (µg/mL)	30.2	27.4	91.8	67.7	222.0	181.0
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	439.0	409.0	1720.0	1200.0	4530.0	3360.0
Day 28						
C_{max} (µg/mL)	34.0	31.8	109.0	95.0	168.0	96.7
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	577.0	456.0	1780.0	1030.0	2180.0	1400.0

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Beginning on Day 7, the dose level was lowered to 200 mg/kg. To initially achieve this, the 30 mg/mL concentration was administered at a dose volume of 6.67 mL/kg. However, beginning Week 3, the dose concentration was prepared at 20 mg/mL and was administered at a dose volume of 10 mL/kg.
AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F, female; M, male; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; TK, toxicokinetic

Table 18: Carcinogenicity: 91-Day Dose Range-Finding Study to Support 104-Week Mouse Oncogenicity Study

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice		
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1® (ICR)	**Duration of Dosing:** 91 days	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001
Initial Age: 6 weeks	**Duration of Postdose:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 20 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity	25	25	25	25	25	25	25	25
Toxicokinetics[b]	6 + 2	6 + 2	39 + 2	39 + 2	39 + 2	39 + 2	39 + 2	39 + 2
Toxicokinetics								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	ND	ND	16.5	10.6	56.0	40.4	152.0	127.0
Day 90	ND	ND	22.4	14.9	51.4	37.0	106.0	90.7
AUC_{0-24} (µg·h/mL)								
Day 1	ND	ND	237.0	167.0	778.0	669.0	2800.0	ND[c]
Day 90	ND	ND	331.0	220.0	894.0	569.0	1870.0	1150.0
Noteworthy findings								
Died or euthanized								

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Toxicity	0	1	1	0	0	0	2	0
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	2	0
Body weight (g) – Main Study Animals								
Day -1	31.40	25.14	31.44	25.14	31.23	25.15	31.32	25.07
Day 91[d]	41.36	33.49	40.70	34.44	39.45	34.32	40.96	34.56
Body weight gain (g) – Days -1-91								
Food consumption (g/animal/day) – Main Study Animals								
Week 1	5.5	5.1	5.2	4.8	5.1	4.7	4.3†	3.9†
Week 12 to 13	5.2	5.2	5.4	5.1	5.1	5.4	5.5	5.1
Clinical observations – Main Study Animals[e]								
Green discharge	0	0	1/1	0	3/1	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0	0	1/1	0
Swelling	0	0	3/1	1/1	3/1	0	0	0
Eyelid part/completely closed	0	0	0	0	0	0	2/1	0
Hair discolored, red	0	0	0	0	0	0	2/1	0
Hair sparse	8/1	0	0	6/1	0	0	2/1	0
Hair wet	0	0	0	4/2	0	0	0	0
Loss of skin elasticity	0	0	0	0	0	0	4/3	0
Scabbed area	4/1	0	0	0	0	0	0	0
Unkempt appearance	0	0	0	0	0	0	1/1	0
Laceration	0	0	1/1	0	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Abrasion	0	2/1	0	0	0	0	0	0
Skin cold to touch	0	0	0	0	0	0	1/1	0
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology/coagulation – Main Study Animals (Day 92)								
Leukocytes (10^3 cells/µL)	5.87	8.11	2.82†	2.89†	2.85†	2.52†	2.22†	2.70†
Hematocrit (%)	–	59.48	–	64.33	–	66.83*	–	64.54
Lymphocytes (10^3 cells/µL)	4.542	6.430	1.554†	1.676†	1.617†	1.419†	1.171†	1.474†
Other cells (10^3 cells/µL)	0.062	0.138	0.014†	0.027†	0.022*	0.039*	0.038	0.030†
Clinical chemistry – Main Study Animals (Day 92)								
Total bilirubin (mg/dL)	0.19	0.13	0.21	0.19*	0.25†	0.20†	0.32†	0.26†
Creatinine (mg/dL)	0.21	0.21	0.22	0.22	0.21	0.25	0.27†	0.28†
Total protein (g/dL)	5.99	5.75	5.74	5.60	5.60†	5.61	5.64†	5.40†
Globulin (g/dL)	2.75	2.44	2.48†	2.29*	2.45†	2.26*	2.46†	2.20†
Albumin/Globulin	1.19	–	1.32†	–	1.29†	–	1.29†	–
Cholesterol (mg/dL)	191.8	110.2	145.4†	99.7	157.1*	109.6	164.1	136.5*
Urinalysis – Main Study Animals (Day 92)								
pH	6.46	–	6.23†	–	6.28*	–	6.14†	–
Organ weights (% change relative to control)								
Lung								
Absolute (g)	0.42	0.36	+25.2†	+36.8†	+30.6†	+43.5†	+38.6†	+49.3†
Relative (g/100 g body weight)	1.12	1.16	+26.3†	+33.9†	+35.5†	+40.8†	+38.7†	+45.6†

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Relative (g/g brain weight)	0.86	0.72	+19.7†	+33.3†	+24.0†	+42.0†	+32.8†	+44.3†
Thyroid/parathyroid gland								
Absolute (g)	0.01	0.01	+0.3	+2.4	+7.2	+14.0	+51.0†	+27.3†
Relative (g/100 g body weight)	0.01	0.02	+1.4	+1.3	+11.8	+13.1	+51.5†	+24.9†
Relative (g/g brain weight)	0.01	0.01	-4.3	+0.2	+1.4	+13.5	+45.4†	+23.3*
Liver								
Absolute (g)	1.86	1.56	+14.3†	+14.6†	+18.6†	+23.2†	+53.4†	+55.4†
Relative (g/100 g body weight)	4.98	4.99	+14.7†	+13.0†	+23.0†	+21.5†	+53.4†	+52.3†
Relative (g/g brain weight)	3.85	3.09	+8.9*	+11.8†	+12.6†	+21.8†	+47.0†	+50.4†
Spleen								
Absolute (g)	0.09	0.13	-19.8†	-30.6†	-20.7†	-36.5†	-23.8†	-14.9*
Relative (g/100 g body weight)	0.25	0.42	-19.7†	-31.9†	-17.9†	-37.6†	-23.5†	-16.9†
Relative (g/g brain weight)	0.19	0.26	-23.4†	-32.8†	-24.4†	-37.5†	-26.3†	-20.1*
Gross pathology – Treatment period								
Number examined	25	25	25	25	25	25	25	25
Skin, subcutis								
Edema	0	0	0	0	0	0	1	0
Tail								
Abrasion/scab	1	0	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder								
Calculus/calculi	1	0	0	0	1	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Adipose tissue								
Swollen/thickened	0	1	0	0	0	0	0	0
Lung								
Irregular surface	0	0	0	0	0	0	0	1
Ovaries								
Cyst	0	0	0	3	0	0	0	0
Histopathology – Treatment period								
Number examined	15	15	15	15	15	15	15	15
Lung								
Histiocytosis	0	0	14	14	14	14	15	15
minimal	0	0	10	11	5	2	4	2
mild	0	0	4	3	9	10	8	10
moderate	0	0	0	0	0	2	3	3
Fibrin deposition	0	0	13	10	13	14	14	15
minimal	0	0	8	7	7	4	5	4
mild	0	0	4	3	6	9	9	8
moderate	0	0	1	0	0	1	0	3
Thyroid gland								
Degeneration/inflammation	0	0	0	0	0	0	15	13
minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
mild	0	0	0	0	0	0	4	11

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
moderate	0	0	0	0	0	0	8	0
Degeneration	0	0	0	0	0	0	0	2
minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Decreased/altered colloid	0	0	0	0	1	0	10	10
minimal	0	0	0	0	1	0	3	7
mild	0	0	0	0	0	0	7	3
Liver								
Hypertrophy, hepatocellular, centrilobular	0	0	15	12	14	15	13	14
minimal	0	0	14	12	5	4	1	1
mild	0	0	1	0	8	11	3	13
moderate	0	0	0	0	1	0	9	0
Spleen								
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	11	15	14	14	12	14	15
minimal	10	7	3	6	2	2	2	0
mild	1	3	12	5	12	10	10	14
moderate	0	1	0	3	0	0	2	1
Altered cellularity	0	0	10	11	12	9	13	15
minimal	0	0	7	11	5	6	1	6
mild	0	0	3	0	7	3	11	9
moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 91-Day Oral Toxicity Study in Mice							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.001	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**60**		**200**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Thymus								
Altered cellularity	0	0	15	10	14	14	12	15
minimal	0	0	14	4	7	1	1	3
mild	0	0	1	5	7	7	11	10
moderate	0	0	0	1	0	6	0	1
marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenteric lymph node								
Altered cellularity	0	0	10	9	13	14	12	9
minimal	0	0	10	8	7	5	3	6
mild	0	0	0	1	6	9	9	3

[a] All doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Additional animals/sex/group included as possible replacement animals.
[c] $AUC_{0\text{-}24}$ could not be determined as there were no samples received at 24 hours postdose.
[d] ANOVA & Dunnett(Log).
[e] Number of times observed/Total number of animals affected.
Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01; ‡p ≤ 0.005, §p ≤ 0.001 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
–, no noteworthy findings; +, positive; ANOVA, analysis of variance; $AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; NA, not applicable; ND, not determined

Table 19: Carcinogenicity: Pivotal 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice		
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1® (ICR)	**Duration of Dosing**: 104 weeks	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003
Initial Age: Approximately 10 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Control Groups:** Control article or water	
Control Article/Formulation: L-arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Basis for High Dose Selection: Toxicity-based endpoint from 91-Day Dose Range-Finding Study (APD334.TOX.001) and FDA feedback		
Special Features: None		

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice				**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals										
Main	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Toxicokinetics[b]	3 + 3	3 + 3	3 + 3	3 + 3	24 + 3	24 + 3	24 + 3	24 + 3	24 + 3	24 + 3
Toxicokinetics	Combined sexes		Combined sexes		Combined sexes		Combined sexes		Combined sexes	
C_{max} (µg/mL)										
Day 364	ND		ND		2.31		5.71		16.80	
AUC_{0-24} (µg·h/mL)										
Day 364	ND		ND		42.1		90.6		261	
Died or euthanized moribund[c]										
Carcinogenicity	54	55	48	52	43	45	47	50	50	50
Toxicokinetics	0	0	0	2	3	0	4	2	2	5
Terminal sacrifice	21	20	27	23	22	20	18	15	15‡	15

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Survival (%)	28.00	26.67	36.00	30.67	33.85	30.77	27.69	23.08	23.08	23.08
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight[d] (g) (%)										
Week -1	38.58	30.94	0	0	0	0	0	0	0	0
Week 20	47.85	39.15	+1	-2	-4	-5	-1	-1	-2	-3
Week 40	50.39	41.71	0	+1	-7[§§]	-6	-5	-2	-5[§]	-3
Week 60	51.87	44.82	+2	+1	-7[§§]	-7	-6	-4	-8[§§]	-7[†]
Week 80	52.30	45.11	-1	+3	-9**	-11[††]	-10**	-9[†]	-10**	-12[††]
Week 96	50.25	43.76	+2	0	-9**	-9	-9**	+2	-5	NA
Week 100	49.23	NA	+2	NA	-8*	NA	-7	NA	NA	NA
Week 104	48.68	NA	+1	NA	-5	NA	-4	NA	NA	NA
Body Weight Change[d] (g) (%)										
Week -1→1	0.59	-0.36	-101	-255[††]	-46	-169	+59	+14	-13	+64
Week 18→20	0.61	0.61	+62	+2	-20	+69	-15	+31	+83	-22
Week 36→40	0.63	0.25	-30	+260	-112[††]	-157	-20	+124	+30	+310
Week 56→60	-0.27	0.44	+437[††]	+10	+89	-4	-43	-61	+101	-70
Week 76→80	-0.27	-0.28	-365[††]	-165	-42	-209	-243[†]	-179	0	+252
Week 92→96	-0.79	-0.25	+50	-462	+77	+104	-62	+1004	+16	NA
Week 96→100	-0.73	NA	-37	NA	+34	NA	+199[†]	NA	NA	NA
Week 100→104	-0.28	NA	-187	NA	+88	NA	+11	NA	NA	NA
Food consumption[d] (g) (%)										

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Week 1→2	5.3	5.1	-2	-10††	-2	-8††	0	-16††	0	-10†
Week 19→20	5.0	4.4	-2	+16	-2	+20	0	+16	-4	0
Week 39→40	4.9	4.5	-2	-2	0	-7	-6	-7	-10††	-2
Week 59→60	4.5	4.9	+2	-16††	-4	-16	-4	-16†	-4	-16†
Week 79→80	4.8	4.3	+4	+2	-4	0	-8	-2	-17††	-28††
Week 95→96	4.5	3.4	0	+23	-2	+17	-2	+24	+4	NA
Week 99→100	4.2	3.8	+12	+13	0	+24	0	NA	NA	NA
Week 103→104	4.0	NA	+13	NA	+5	NA	+3	NA	NA	NA
Neoplastic Lesions—Etrasimod Related:										
Multicentric neoplasm	NA									
Hemangioma, benign, multicentric	2	1	2	1	2	0	1	1	4	5
Hemangiosarcoma, malignant, multicentric	8	2	4	4	9	5	17	14	31	18
Neoplastic Lesions—Incidental/spontaneous:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Noteworthy Findings										
Number examined	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Gross Pathology[e]										
Liver										
Cyst	2	0	0	1	0	0	1	1	5	0
Skin (subcutis)										
Edema	1	1	2	0	3	0	2	4	6	4

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Non-neoplastic histopathology										
Number animals examined	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Bone Marrow, Femur										
Angiomatous hyperplasia										
mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bone Marrow, Sternum										
Angiomatous hyperplasia										
minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
mild	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Epididymides										
Angiomatous hyperplasia										
Mild	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
Marked	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Heart										
Angiomatous hyperplasia										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Liver										
Angiomatous hyperplasia										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lung										
Accumulation, eosinophilic, alveolar										
Minimal	0	1	0	0	3	9	16	20	11	17
Mild	0	0	0	0	0	6	3	6	9	4
moderate	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Fibrosis										
Minimal	0	1	0	1	3	11	13	13	11	21
Mild	0	1	1	0	0	5	1	4	1	8
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Metaplasia, osseous										
Minimal	0	0	1	2	7	8	10	12	16	15
Mild	0	0	0	0	1	1	1	0	4	0
Histiocytosis, alveolar										
Minimal	7	6	4	17	6	7	7	20	16	14
Mild	3	8	6	6	8	16	20	20	24	31
Moderate	1	2	5	3	7	9	12	7	10	7
Marked	4	1	1	0	4	4	5	2	3	4
Fibrin deposition										
minimal	0	1	0	2	0	5	0	3	1	6
Ovaries										
Angiomatous hyperplasia										

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Skin (subcutitis)										
Angiomatous hyperplasia										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus										
Increased lymphocytes, medulla										
Minimal	10	10	12	11	14	8	10	2	12	7
Mild	6	19	6	14	6	24	14	30	18	31
Moderate	1	1	1	0	0	2	0	2	0	4
Uterus with Cervix										
Angiomatous hyperplasia										
Minimal	NA	4	NA	2	NA	3	NA	9	NA	6
Mild	NA	0	NA	0	NA	3	NA	3	NA	6
moderate	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	3

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Mice					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.003					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**

[a] Beginning on Day 92, the dose concentrations for the low and mid dose groups were changed to 0.2 mg/mL and 0.6 mg/mL, respectively, using dose volumes of 10 mL/kg for both groups, to allow for equal dose volumes across all groups.

[b] Group means are shown. The control group was analyzed for plasma concentration; however, group means were not calculated.

[c] APD334-related unscheduled euthanasias or deaths occurred for males and females at ≥ 6 mg/kg/day and were related to hemangiomas/hemangiosarcomas. This high mortality resulted in the early dosing cessation/termination of males at 20 mg/kg/day and of the females at all dose levels. High dose females (20 mg/kg/day) reached a survival level of 20 on Day 588 (Week 84); therefore, dosing for those animals ceased effective on Day 589 (Week 84) as per FDA specifications delineated in the protocol. Similarly, high dose males (20 mg/kg/day) reached a survival level of 20 on Day 637 (Week 91) and ceased dosing effective that day. The females and males at 20 mg/kg/day then reached 15 survivors on Days 637 and 689 (Weeks 91and 99), respectively, triggering necropsy of the surviving 15 as per FDA and protocol specifications. The mid dose and low dose (6 and 2 mg/kg/day, respectively) females reached 20 survivors on Days 640 and 685 (Weeks 92 and 98), respectively (cessation of dosing on those same days), with the mid-dose group reaching 15 survivors on Day 672 (Week 96), triggering necropsy of the surviving 15. Then, on Day 699 (Week 100), the female water control animals reached 20, which triggered the necropsy of those 20 animals and all remaining control article survivors and 2 mg/kg/day survivors. The mid dose (6 mg/kg/day) males reached 20 survivors on Day 691 (Week 99) and ceased dosing on that day but did not reach 15 before their scheduled/planned necropsy at the end of the study period.

[d] Group means are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.

[e] Reported as number observed.

Notes: -, no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; (B), benign; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F, female; GLP, Good Laboratory Practice; M, male; ANOVA & Dunnett, significantly different from control: *p<0.05, **p<0.01; ANOVA & Dunnett (Log), significantly different from control: §p<0.05, §§p<0.01; Kruskal-Wallis & Dunn, significantly different from control: †p<0.05, ††p<0.01; Significantly different from both water control and control article: ‡p<0.05.

Table 20: Carcinogenicity: Pivotal 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley CD® [Crl:CD®(SD)]	**Duration of Dosing:** Up to 91 weeks	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002
Initial Age: 8 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		**Lot Number:** [redacted]
Control Article/Formulation: L-arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Basis for High Dose Selection: Toxicity-based endpoint from rat 6-month oral toxicity study in (TX[redacted]009) and FDA feedback		
Special Features: None		

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals										
Main	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Toxicokinetics	3 + 2	3 + 2	3 + 2	3 + 2	6 + 3	6 + 3	6 + 3	6 + 3	6 + 3	6 + 3
Toxicokinetics[b]										
C_{max} (µg/mL)										
Day 364	-	-	-	-	1.99	4.55	5.19	8.44	12.1	24.2
AUC_{0-24} (µg·h/mL)										
Day 364	-	-	-	-	27.6	65.2	68.2	147	172	387
Died or euthanized moribund[c]										
Carcinogenicity	55	55	50	49	37	36	41	38	47	38
Toxicokinetics	1	0	0	0	2	0	3	0	1	1
Terminal sacrifice	20	20	25	26	28	29	24	27	18	27
Survival (%)	26.67	26.67	33.33	33.77	43.08	43.94	36.92	41.54	27.69	41.54

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight[d] (g) (%)										
Day 28	462.1	273.1	-2	0	-5$^{\#\#}$	-5$^{**\#\#}$	-4$^{\#}$	-5$^{**\#\#}$	-6$^{**\#\#}$	-4$^{**\#\#}$
Day 91	636.5	337.9	-2	-1	-8$^{**\#\#}$	-8$^{**\#\#}$	-5$^{\#\#}$	-8$^{**\#\#}$	-6$^{\#\#}$	-6$^{**\#\#}$
Day 182	750.9	381.3	-2	-1	-8$^{\S\S\infty\infty}$	-8$^{\S\S\infty\infty}$	-6$^{\infty\infty}$	-9$^{\S\S\infty\infty}$	-7$^{\S\infty\infty}$	-6$^{\S\S\infty\infty}$
Day 364	872.0	450.2	-1	0	-8$^{\S\S\infty\infty}$	-7$^{\delta\ddagger\ddagger}$	-5	-11$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	-8$^{\S\S\infty\infty}$	-5
Day 448	909.6	485.0	+1	0	-6§	-8$^{\S\infty}$	-6$^{\S\S\infty}$	-9$^{\S\S\infty\infty}$	-8$^{\S\S\infty\infty}$	-5
Day 532	901.5	509.2	+2	+1	-3	-6	-2	-10$^{\S\S\infty\infty}$	-4	-7
Day 616	928.0	543.6	0	-1	-7	-11*	-6	-10	-10	-11
Body Weight Change[d] (g) (%)										
Days 21→28	33.7	13.8	+2	+12	-4$^{\delta\delta}$	-20$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	-10$^{\delta\delta\ddagger}$	-13$^{\delta\delta}$	-32$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	-28$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$
Days 84→91	14.3	3.4	-5	+41	-22	+6	-13	+33	-7	+38
Days 168→182	16.8	9.9	+10	-3	-12	-47$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	-8	-55$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	+8	-5
Days 336→364	13.2	4.7	+55	-31	+35	+53	+8	-40	-6$^{\delta}$	-11
Days 420→448	15.1	17.4	+13	-6	-58$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	-69$^{\delta\ddagger\ddagger}$	-47	-12	-56$^{\delta\ddagger}$	-33‡
Days 504→532	-3.7	10.5	-241	-20	+381$^{\delta\delta\ddagger\ddagger}$	+10	+233$^{\delta\ddagger\ddagger}$	+8	+123	-6
Days 588→616	-13.8	6.5	-12	-87	+59	-123	+53	-13	+117‡	-145

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Food consumption[d] (g) (%)										
Days 21→28	28.8	18.3	0	+10‡	-4‡‡	+5	-3	+4$^{\delta}$	-5‡‡$^{\delta}$	+3$^{\delta\delta}$
Days 84→91	30.7	19.4	-1	+1	-5*	-3	-6*	-3	-4	-4‡
Days 175→182	30.6	19.7	-1	-3	-7*##	-6#	-5*	-9*##	-4	-5
Days 357→364	29.2	17.1	0	+5	-6	0	-8	-3*	-3	+5
Days 441→448	27.9	18.0	-2	0	-2	+2	-4	+2	+2	+4
Days 525→532	27.7	18.8	-2	0	-2	+7	-2	-5	-8	+5
Days 609→616	25.9	18.1	+13	+7	-5	-3	-10	-10	+2	-2
Noteworthy Findings										
Number examined	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Gross Pathology[e]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number animals examined	75	75	75	75	65	65	65	65	65	65
Neoplastic Lesions—Etrasimod Related:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neoplastic Lesions—Incidental/spontaneous:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Non-neoplastic histopathology[e]										
Brain										
mineralization, focal										
minimal	1	0	1	0	28	24	35	42	36	36
mild	0	0	0	0	23	23	22	9	12	11
Liver										

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
focus of cellular alteration, basophilic										
minimal	14	29	9	33	8	23	8	27	8	23
mild	2	4	0	9	0	17	0	11	0	13
moderate	0	2	0	1	0	2	0	1	0	6
marked	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
focus of cellular alteration, eosinophilic										
minimal	6	3	5	5	5	6	8	9	4	18
mild	2	1	3	0	0	0	1	6	0	4
moderate	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
hyperplasia, bile duct										
minimal	30	42	27	28	31	27	31	33	22	26
mild	19	14	24	14	23	29	26	19	28	30
moderate	3	0	0	2	0	0	1	1	3	0
vacuolation, hepatocellular										
minimal	4	1	7	2	5	6	8	0	9	2
mild	1	1	1	2	2	0	2	0	2	2
moderate	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Iliac										
dilation, sinus										
moderate	0	NE	0	NE	0	NE	1	NE	1	NE

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Lymph Node, Mandibular										
dilation, sinus										
minimal	1	1	1	0	2	3	5	3	6	8
mild	2	0	0	0	7	1	7	1	9	5
moderate	0	0	1	0	4	0	3	0	6	0
erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus										
minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
mild	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
marked	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
histiocytosis, sinus										
minimal	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
decreased lymphocytes										
mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph Node, Mesenteric										
dilation, sinus										
minimal	0	2	0	1	0	2	5	0	3	2
mild	0	1	0	1	0	3	0	2	1	3
moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
erythrocytosis/erythrophagocytosis, sinus										

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
minimal	2	4	2	1	1	2	5	3	5	3
mild	0	1	1	1	0	2	3	2	0	3
moderate	0	0	1	1	1	0	0	1	2	1
histiocytosis, sinus										
minimal	3	13	1	16	11	28	16	22	13	22
mild	1	1	1	0	5	8	9	7	4	7
decreased lymphocytes										
minimal	2	1	1	0	1	2	2	0	2	1
mild	0	1	0	0	2	2	4	1	2	0
Lymph Node, Renal										
dilation, sinus										
moderate	0	NE	0	NE	0	NE	1	NE	0	NE
Spleen										
hematopoiesis, extramedullary, increased										
minimal	0	16	1	14	20	28	10	37	12	34
mild	0	7	1	6	1	11	2	5	0	8
moderate	0	0	0	5	1	0	0	3	0	1
marked	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
decreased lymphocytes, marginal zone										
minimal	8	4	5	2	21	17	26	22	22	20

Report Title: APD334 L-Arginine: A 104-Week Oral Oncogenicity Study in Rats					**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.002					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Water Control)**		**0 (Control)**		**2[a]**		**6[a]**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
mild	4	2	1	2	19	8	19	21	20	19
moderate	1	1	2	0	1	1	2	0	1	0
marked	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Thymus										
increased lymphocytes, medulla										
minimal	0	0	0	0	18	31	16	10	4	11
mild	0	0	0	0	25	18	30	36	31	30
moderate	0	0	0	0	3	6	1	15	11	6

[a] On Days 52 and 53, animals at 2 and 6 mg/kg/day were dosed with the current preparations of 0.2 and 0.6 mg/mL, respectively, using dose volume of 15.0 mL/kg for animals at 2 mg/kg/day and a dose volume of 20.6 mL/kg for animals at 6 mg/kg/day. Beginning on Day 54, a dose concentration of 2 mg/mL was used for both groups at 2 and 6 mg/kg/day, with dose volumes of 1 mL/kg and 3 mL/kg, respectively.

[b] Group means are shown. The control group was analyzed for plasma concentration; however, group means were not calculated.

[c] There were no test article-related effects on main study survival/mortality, nor any statistical significance noted. Causes of early euthanasia/death were varied and not test article related based on lack of dose dependency, single or low incidence, and consistency with common spontaneous/incidental causes of death reported for rats in carcinogenicity studies. High dose males (20 mg/kg/day) reached a survival level of 20 on Day 604; therefore, dosing for those animals ceased effective on Day 604 as per FDA specifications delineated in the protocol. In addition, male and female control groups reached 20 survivors on Days 632 and 629, respectively (Week 91/90 timeframe), which triggered scheduling of necropsy of all groups of each sex at that juncture as per FDA specifications delineated in the protocol. Therefore, terminal necropsy for all surviving males occurred on Days 636 and 640 and terminal necropsy for all surviving females occurred on Days 629-633.

[d] Group means are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.

[e] Reported as number observed.

Notes: -, no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; (B), benign; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F, female; GLP, Good Laboratory Practice; M, male; NE, not examined; ANOVA & Dunnett, significantly different from control: *p<0.05, **p<0.01; ANOVA & Dunnett, significantly different from water control: #p<0.05, ##p<0.01; ANOVA & Dunnett (Log), significantly different from control: §p<0.05, §§p<0.01; ANOVA & Dunnett (Log), significantly different from water control: ∞p<0.05, ∞∞p<0.01; ANOVA & Dunnett (Rank), significantly different from control: δp<0.05, δδp<0.01; ANOVA & Dunnett (Rank), significantly different from water control: ‡p<0.05, ‡‡p<0.01; Kruskal-Wallis & Dunn, significantly different from control: †p<0.05, ††p<0.01.

2.6.7.11. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY

Table 21: Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies in Rats and Rabbits

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Effects on Spermatogenesis	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted]	Once daily for 28 days	25, 100, 250/200	12 Males	200 mg/kg/day	TX[redacted]008/ No
Noteworthy Findings: The high dose of 250 mg/kg/day was lowered to 200 mg/kg/day on Day 6 after adverse findings (lower mean body weights and food consumption; hypoactivity, ataxia, hunched posture, and related findings) were seen in almost half of the animals. Mean body weight and food consumption increased upon dose reduction. There were no observable effects on spermatogenesis or any of the parameters measured in this study.							
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted]	Once daily from Gestation Days 6 through 17	25, 75, 150, 250	8 Females	NA	TX[redacted]016/ Yes[b]
Noteworthy Findings: Maternal toxicity was observed at all dosage levels, as evidenced by clinical findings and/or body weight and food consumption decrements. The severity of these effects at 250 mg/kg/day resulted in early group termination between gestation days 7 and 10. The effects at 25, 75, and 150 mg/kg/day were generally limited to the first few days of dosing: body weight losses at these dosage levels at the end of gestation were due to severe effects on intrauterine survival. The females in the 75 and 150 mg/kg/day groups had entirely resorbed litters, and there was only a single viable fetus in the 25 mg/kg/day group. Based on these results, dosage levels of 2, 5, 10, and 20 mg/kg/day were selected for subsequent range-finding study of APD334 L-arginine administered orally by gavage to bred Crl:CD(SD) rats.							
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals (Repeat)	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted]	Once daily from Gestation Days 6 through 17	2, 5, 10, 20	8 Females	NA	TX[redacted]025/ Yes[b]

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Noteworthy Findings: Females in all groups survived to the scheduled necropsy on gestation day 20. There were no notable signs of maternal toxicity. Reduced mean food consumption was seen in all treated groups but there were no corresponding effects on mean body weight and body weight gain. There were effects on body weights later in gestation in doses of 5 mg/kg/day and above considered secondary to developmental effects. Developmental effects were noted in the 5 mg/kg/day and higher doses as evidenced by increased mean litter proportions of post-implantation loss and corresponding lower mean numbers and litter proportions of viable fetuses. Lower mean fetal weights were also noted in these doses. Effects on intrauterine growth and survival corresponded to the lower mean gravid uterine weights. Increased incidences of external fetal malformations, localized fetal edema and fetal anasarca were noted in the doses of 5 mg/kg/day and above in comparison to the control group. None of these effects were seen at the dose of 2 mg/kg/day. Based on the results of this study the doses for the pivotal embryo-fetal toxicity study in rats were set at 1, 2, and 4 mg/kg/day.							
Oral Dose Range-Finding Study in Pregnant Animals	Rabbit/ New Zealand White (HRA:[NZW] SPF)	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted]	Once daily from Gestation Days 7 through 20	2, 25, 75, 150	6 Females	NA	TX[redacted]018/ Yes[b]
Noteworthy Findings: Moribundity or abortion was noted for all pregnant females at the high dose of 150 mg/kg/day and in 5 of the 6 pregnant females at the dose of 75 mg/kg/day. The single surviving female at the dose of 75 mg/kg/day had increased post-implantation loss. Adverse clinical findings (decreased defecation, red material on cage floor, and thin body), body weight deficits, and corresponding reduced food consumption were also noted at the 75 and 150 mg/kg/day doses. Lower body weight gains later in gestation and a single abortion were also noted at 25 mg/kg/day and were considered secondary to the higher mean litter proportion of post-implantation loss and lower mean number of viable fetuses at this dose. There was no evidence of maternal toxicity or effects on intrauterine parameters at the doses of 2 or 25 mg/kg/day. Based on the results of this study, dose levels of 2, 10, and 20 mg/kg/day were recommended for the definitive rabbit embryo-fetal developmental toxicity study of APD334.							
Oral Dose Range-Finding Prenatal/ Postnatal Development Study	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (L-arginine monohydrochloride in 0.5% (v/v) TWEEN®) [redacted]	Once daily from Gestation Day 6 to Lactation Day 20	0.05, 0.20, 1.0, 2.0	8 Females	NA	APD334.TOX.012/ No
Noteworthy Findings: There were no adverse effects on mean maternal body weights, body weight gain, and food consumption in F_0 females and no apparent effects on parturition at any dose. A slight decrease in viability was observed at 1.0 and 2.0 mg/kg/day compared with controls, and non-dose related decreases in pup body weights, which were potentially treatment related. A dose of 2.0 mg/kg/day was associated with mean Lactation Day 20 AUC_{tlast} values for etrasimod of 9.71 µg·h/mL and C_{max} values of 1.43 µg/mL.							

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Study was conducted under GLP conditions according to ICH M3(R2) guidelines, but preliminary dose range-finding studies were considered nonpivotal.
AUC_{tlast}, area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the last observed quantifiable concentration; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; NA, not applicable; NOAEL, no-observed-adverse-effect level

Table 22: Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Study in Rats with Toxicokinetics

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration (Control Article/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Dose[a] (mg/kg/day)	Number/Sex/Group	NOAEL (mg/kg/day)	Sponsor Reference Number/ GLP Compliance
Oral Dose Range-Finding Toxicity Study in Juvenile Animals	Rat/Sprague Dawley (CD®[Crl:CD® (SD)])	Oral (L-arginine hydrochloride, USP in deionized water) [redacted]	Once daily from Postnatal Day 21 through 34	25, 100, 200	Main Study: 6 Males/ 6 Females TK Study: 36 Males/36 Females	Not applicable	APD334.TOX.008/ Yes[b]
Noteworthy Findings: At 200 mg/kg/day, 1 TK animal was euthanized in moribund condition on Day 6; surviving main study and TK animals in the 200 mg/kg/day Main Study and TK groups were euthanized for humane reasons on Day 7. Adverse etrasimod-related findings at 200 mg/kg/day noted prior to early termination consisted of decreased body weight and food consumption and clinical observations of thin body condition, loss of skin elasticity, and piloerection. Etrasimod-related findings in both sexes at 25 and 100 mg/kg/day included: decreased mean body weight and food consumption parameters; increased mean liver weight parameters; and decreased mean spleen weight parameters. Systemic exposure to APD334 was independent of sex. C_{max} and AUC_{0-24hr} values increased with increasing dose in an approximately dose-proportional manner on Days 1 and 14. Systemic exposure to APD334 did not change following repeated administration at 25 mg/kg/day but decreased at 100 mg/kg/day. Based on findings in this dose range-finding study, APD334 doses < 200 mg/kg/day are recommended for future studies in juvenile rats.							

Toxicokinetic Parameters (Group Means for Combined Sexes):								
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200** [c,d]	
Number of TK Animals	**M:6**	**F:6**	**M:36**	**F:36**	**M:36**	**F:36**	**M:36**	**F:36**
Died or Sacrificed Moribund[e]	0	0	0	0	0	0	12	12
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	BLQ		11.7		47.0		NA	
Day 14	BLQ		10.1		30.5		NA	
AUC_{0-24} (µg·h/mL)								
Day 1	NA		131.0		714.0		NA	
Day 14	NA		111.0		370.0		NA	

Toxicokinetic Parameters (Group Means for Combined Sexes):								
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**		**100**		**200** [c,d]	
Number of TK Animals	**M:6**	**F:6**	**M:36**	**F:36**	**M:36**	**F:36**	**M:36**	**F:36**
Died or Sacrificed Moribund[e]	0	0	0	0	0	0	12	12

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

[b] Study was conducted under GLP conditions according to ICH M3(R2) guidelines, but preliminary dose range-finding studies were considered nonpivotal.

[c] Due to excessive toxicity in the 200 mg/kg/day dose group, the remaining animals were euthanized and discarded on Day 7.

[d] One TK female at 200 mg/kg/day (Animal No. 8532) was euthanized in extremis on Day 6 based on clinical observations of decreased activity, hunched posture, thin body condition, cool to touch, and ataxia. Surviving 200 mg/kg/day groups were terminated on Day 7 without further examination based on mortality, clinical observations, and body weights and food consumption.

[e] No plasma analysis was conducted on the samples collected on Day 1, and plasma samples could not be collected on Day 14.

AUC_{0-24}, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; BLQ, below the limit of quantification; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F, female; M, male; NA, not applicable; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; TK, toxicokinetic

2.6.7.12. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION

Table 23: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Fertility and Early Embryonic Development

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Fertility and Early Embryonic Development Toxicity Study in Rats		
Design Similar to ICH S5 (4.1.1): Yes	**Dosing Period Males:** At least 63 days (28 days prior to mating)	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Dosing Period Females:** 22 – 35 days (14 doses prior to cohabitation and through GD 7)	**Lot Number:** [redacted]
Initial Age Males: 8 weeks	**Day of Mating (Females):** GD 0	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age Females: 10 weeks	**Day of Cesarean Section:** GD 15	**Control Article/Formulation:** L-Arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Levels:		
Male Systemic Toxicity: 25 mg/kg/day		
Female Systemic Toxicity: 4 mg/kg/day		
Male Reproductive Toxicity: 200 mg/kg/day		
Female Reproductive Toxicity: 4 mg/kg/day		
Early Embryonic Development Toxicity: 4 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Fertility and Early Embryonic Development Toxicity Study in Rats								**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**25**	**1**	**100**	**2**	**200**	**4**
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of animals								
Toxicity	25	25	25	25	25	25	25	25
Toxicokinetics	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Fertility and Early Embryonic Development Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007	
Treated Males (WIL-670060M)				
Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**25**	**100**	**200**
Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
Clinical observations				
5 hours post-dosing: dried red material around nose	0/0	8/6	8/5	5/3
5 hours post-dosing: dried red material facial area	0/0	0/0	0/0	1/1
5 hours post-dosing: dried red material around mouth	0/0	1/1	2/2	4/4
5 hours post-dosing: wet clear material around mouth	0/0	0/0	0/0	3/2
Body weight gain (g)[b]				
Days 0-4	28	23*	13†	–17†
Days 4-7	19	15*	17	28†
Days 10-14	17	14*	18	18
Days 31-35	17	12†	14	14
Days 0-27 (pre-mating period)	139	122*	122*	108†
Days 0-63 (entire treatment period)	231	204*	218	196†
Food consumption (g/animal/day)[b]				
Days 0-4	22	20	16†	9†
Days 7-10	24	25	23	28*
Days 17-21	24	23	23	22†
Reproductive performance				
Number of males mated (confirmed)	24/25 (96.0%)	25/25 (100.0%)	24/25 (96.0%)	25/25 (100.0%)
Male Fertility Index	22/25 (88.0%)	25/25 (100.0%)	24/25 (96.0%)	25/25 (100.0%)
Sperm motility (% motile cells)	79	78	79	78
Sperm count (million sperm/gram cauda weight)	729.2	727.1	732.4	687.2

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Fertility and Early Embryonic Development Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007	
Treated Females (WIL-670060F)				
Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
Clinical observations	–	–	–	–
Body Weight Gain				
Premating body weight (g)[b]				
Days 17-21 (premating)	6	2†	2†	2†
Premating treatment period (Days 14-27)	15	10*	7†	10†
During Gestation body weight (g) [b]				
Days 3-7 (gestation; dose administration ended on GD 7)	14	14	13	11*
Days 13-15 (gestation)	11	15	15*	15*
Gestation body weight (g) [b]				
Gestation (Days 0-7; treatment period)	34	33	33	32
Gestation (Days 7-15; post-treatment period)	41	43	46*	46*
Food consumption (g/animal/day)				
Premating food consumption[b]				
Days 14-17 (dose administration initiated on Day 14)	15	14	13†	13†
Days 21-24	15	15	14†	14†
Gestation food consumption[b]				
Days 3-7 (dose administration ended on GD 7)	23	22	21*	21*
Gestation food consumption[b]				
Gestation (Days 0-7; treatment period)	22	21	21	21
Gestation (Days 7-15; post-treatment period)	22	23	23	22
Estrous cycle length (days)	4.2	4.0	4.3	4.1
Pre-coital interval (days)	2.4	2.2	2.5	2.3

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Fertility and Early Embryonic Development Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]007	
Number of females mated (confirmed)	25 (100.0%)	25 (100.0%)	25 (100.0%)	25 (100.0%)
Number of pregnant females	23 (92.0%)	25 (100.0%)	24 (96.0%)	25 (100.0%)
% Early Embryo Resorptions	8.4	6.1	4.6	6.3
Cesarean section observations				
Number evaluated	23	25	24	25
Mean number corpora lutea	16.2	15.0	15.7	15.5
Mean number implantations	15.3	13.5	14.3	14.7
Mean % preimplantation loss	5.6	10.0	8.8	4.8
Mean % postimplantation loss	8.4	6.1	4.6	6.3
Mean number viable conceptuses	14.1	12.7	13.6	13.8
Mean number early resorptions	1.2	0.8	0.7	0.9
Mean number late resorptions	0	0	0	0

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Days with values significantly different from control are listed.
Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
–, no noteworthy findings; GD, Gestation Day; NA, not applicable; PMD, Premating Day

2.6.7.13. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT

Table 24: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Embryo-Fetal Development

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats		
Design Similar to ICH S5 (4.1.3): Yes	**Dosing Period:** GD 6 to 17	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of Mating:** GD 0	**Lot Number:** [redacted]
Initial Age: ~14 weeks at initiation of dosing	**Day of Cesarean Section:** GD 20	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Levels:		
F_0 Females: 4 mg/kg/day		
F_1 Litters: < 1 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats				**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
Maternal Females				
Number of animals				
Toxicity	25	25	25	25
Toxicokinetics	4	4	4	4
Toxicokinetics – GD 6				
t_{max} (h)	NA	4.00	4.00	4.00
C_{max} (µg/mL)	NA	0.452	1.17	2.74
$AUC_{last,24h}$ (µg·h/mL)	NA	7.00	14.70	34.20
Toxicokinetics – GD 17				

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
t_{max} (h)	NA	4.00	4.00	4.00
C_{max} (µg/mL)	NA	0.804	2.12	3.62
$AUC_{last,24h}$ (µg·h/mL)	NA	11.00	22.80	44.50
Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
Number pregnant	24	25	24	25
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations	–	–	–	–
Body weight change[b] (g)				
Days 7-8	6	3	1*	2*
Days 18-20	40	37	35	23†
Entire treatment period (days 6-18)	95	94	99	97
Net body weight (g)	355.1	351.9	352.5	349.3
Gravid uterine weight (g)	95.0	92.3	98.5	81.4†
Food consumption[b] (g/animal/day)				
Days 9-10	26	23*	24*	24
Entire treatment period (days 6-18)	27	25†	25	25*
Necropsy observations	–	–	–	–
Cesarean section observations				
Number evaluated	24	25	24	25
Mean number corpora lutea	18.1	18.0	18.9	18.1
Mean number implantations	16.9	16.9	17.3	16.4
Mean % preimplantation loss	6.1	5.3	7.9	9.1
Mean % postimplantation loss	6.5	7.1	7.9	23.8†
Total number of early resorptions	27	29	30	85
Total number of late resorptions	0	1	3	14

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
Fetuses				
Number of litters (total number of fetuses) evaluated	24 (379)	25 (393)	24 (382)	25 (310)
Mean number of live fetuses per litter	15.8	15.7	15.9	12.4†
Total number of dead fetuses	0	0	1	0
Mean fetal body weight (g)	3.9	3.7	3.7	3.7
Sex ratios (% males)	51.4	54.7	54.3	49.0
Fetal Observations				
External malformations				
Localized fetal edema				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.6)
Number of litters affected	0	0	0	4
Fetal anasarca				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.8)
Number of litters affected	0	0	0	2
Genital tubercle cleft				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
Number of litters affected	0	0	0	1
Ectrodactyly				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
Number of litters affected	0	0	1	0
Visceral malformations				
Interrupted aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)
Number of litters affected	0	0	0	4
Aorticopulmonary septal defect				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	1 (0.3)	9 (2.3)	26 (7.9*)

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
Number of litters affected	0	1	6	12
Stenotic aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)	15 (4.6)
Number of litters affected	0	0	5	7
Pulmonary artery malpositioned				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
Number of litters affected	0	0	0	2
Retroesophageal aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
Number of litters affected	0	0	0	1
Interventricular septal defect				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	21 (6.6)
Number of litters affected	0	0	1	6
Vestigial aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)	1 (0.3)
Number of litters affected	0	0	2	1
Situs inversus				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Number of litters affected	0	1	0	0
Coarctation of the aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)
Number of litters affected	0	0	0	1
Visceral variations				
Major blood vessel variation				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.1)	4 (1.6)
Number of litters affected	0	0	1	2

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rats			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]017	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**4**
Brachiocephalic trunk – short				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	3 (0.8)	5 (1.2)	7 (2.4)
Number of litters affected	0	3	4	4
Skeletal variations				
Sternebra(e) #5 and/or #6 unossified				
Incidence (mean % fetuses)	21 (5.1)	68 (17.1)	41 (10.2)	57 (16.6†)
Number of litters affected	10	20	14	20
Cervical centrum #1 ossified				
Incidence (mean % fetuses)	80 (22.0)	48 (13.6)	40 (11.2)	6 (2.1†)
Number of litters affected	22	15	17	6
Reduced ossification of the 13th rib(s)				
Incidence (mean % fetuses)	1 (0.3)	2 (0.5)	10 (2.7)	11 (4.5)
Number of litters affected	1	2	3	6

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Days with values significantly different from controls are reported. Values for the entire treatment period are also reported.

Notes: ∗p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

$AUC_{last,24h}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F_0, maternal/paternal generation; F_1, first generation; GD, Gestation Day; NA, not applicable; t_{max}, time of maximum observed drug concentration

Table 25: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Embryo-Fetal Development

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rabbits		
Design Similar to ICH S5 (4.1.3): Yes	**Dosing Period:** GD 7-GD 20	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]019
Species/Strain: Rabbit/ Hra:(NZW)SPF	**Day of Mating:** GD 0	**Lot Number:** [redacted]
Initial Age: 6.0-6.5 months upon receipt	**Day of Cesarean Section:** GD 29	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	
Control Article/Formulation: L-Arginine hydrochloride in deionized water (vehicle)		
Special Features: None		
No-Observed-Adverse-Effect Levels:		
F_0 Females: 20 mg/kg/day		
F_1 Litters: 2 mg/kg/day		

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rabbits			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]019	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**2**	**10**	**20**
Maternal Females				
Number of animals				
Embryo-fetal development Phase	22	22	22	22
Toxicokinetic Phase	4	4	4	4
Toxicokinetics – GD 7				
t_{max} (h)	NA	6.00	4.00	4.00
C_{max} (µg/mL)	NA	0.258	1.80	4.89
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	NA	2.21	14.4	35.0
Toxicokinetics – GD 20				
t_{max} (h)	NA	4.00	5.00	5.00
C_{max} (µg/mL)	NA	0.234	1.40	2.88

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rabbits			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]019	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**2**	**10**	**20**
AUC_{0-24} (µg·h/mL)	NA	1.70	12.6	24.2
Number died or euthanized moribund	1[b]	0	0	0
Number pregnant	20	21	22	22
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	1
Clinical observations	–	–	–	–
Body weight change (g)				
GD 7-21	289	220	284	263
GD 21-29	45	126*	111	93
Terminal body weight (g)	3727	3745	3769	3745
Gravid uterine weight (g)	494.0	492.3	465.9	357.5†
Food consumption (g/animal/day)				
GD 7-21	160	146	157	152
GD 21-29	93	111	123†	131†
Necropsy observations	–	–	–	–
Cesarean section observations				
Number evaluated	22	22	22	22
Mean number corpora lutea	10.0	10.4	10.1	9.9
Mean number implantations	9.5	9.3	9.2	9.2
Mean % preimplantation loss	4.5	9.8	9.2	6.7
Mean % postimplantation loss	5.5	3.6	10.9	36.8†
Number early resorptions	6	6	19	74
Number late resorptions	5	1	3	4

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rabbits			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]019	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**2**	**10**	**20**
Fetuses				
Number litters (fetuses) evaluated	20 (178)	21 (189)	22 (180)	22 (124)
Mean number live fetuses per litter	8.9	9.0	8.2	5.6†
Total number dead fetuses	0	0	0	0
Mean fetal body weight (g)	40.1	39.4	40.8	42.8
Sex ratios (% males)	53.4	46.6	53.8	50.9
Fetal Observations				
External malformations				
Cleft palate				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
Number of litters affected	0	0	0	1
Carpal and/or tarsal flexure				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
Number of litters affected	0	0	0	1
Visceral malformations				
Retroesophageal aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	5 (6.4)
Number of litters affected	0	1	0	5
Coarctation of the aortic arch				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (0.8)
Number of litters affected	0	0	1	1
Bulbous aortic arch				

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Rabbits			**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]019	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**2**	**10**	**20**
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)
Number of litters affected	0	0	1	0
Skeletal malformation				
Sternebrae fused				
Incidence (mean % fetuses)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.5)
Number of litters affected	0	0	0	3
Total fetal malformations				
External % per litter	0.0	0.0	0.0	1.6
Soft tissue % per litter	2.4	1.1	4.3	7.8
Skeletal % per litter	1.3	1.0	3.8	4.9
Fetal variations				
Skeletal variations				
Extra site of ossification anterior to sternebra #1				
Incidence (mean % fetuses)	5 (2.9)	6 (3.1)	21 (11.5)	22 (17.9)
Number of litters affected	4	5	10	9
Total fetal variations				
External % per litter	0.0	0.0	0.0	0.0
Soft tissue % per litter	27.6	25.7	18.9	23.7
Skeletal % per litter	70.1	61.1	75.6	78.7

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Euthanized in extremis on GD 22 due to possible intubation error or aspiration.
Notes: *p ≤ 0.05, †p ≤ 0.01, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
$AUC_{0\text{-}24}$, area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F_0, maternal/paternal generation; F_1, first generation; GD, Gestation Day; NA, not applicable

2.6.7.14. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: EFFECTS ON PRE- AND POSTNATAL DEVELOPMENT, INCLUDING MATERNAL FUNCTION

Table 26: Reproductive and Developmental Toxicity (Pivotal): Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation		
Design Similar to ICH S5: Yes	**Dosing Period:** GD 6 to LD 20 (rats that delivered a litter) or GD 6 through GD 24 (rats that did not deliver a litter)	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of Mating:** GD 0	**Lot Number:** [redacted]
Initial Age: 11 to 13 weeks (78 to 92 days)	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Control Article/Formulation:** L-arginine monohydrochloride in 0.5% (v/v) TWEEN® 20 in 10 mM Tris, pH 8.5 to 9.0/ solution	
Litters Culled/Not Culled: culled to 4/sex/litter	**Vehicle Article/Formulation:** 0.5% (v/v) TWEEN® 20 in 10 mM Tris, pH 8.5 to 9.0/ suspension	
Special Features: Neurobehavioral and reproductive function		
NOAELs:		
F_0 Maternal Toxicity: 4 mg/kg/day		
Parturition: 2 mg/kg/day		
Preweaning F_1 Generation: Not determined		
Postweaning F_1 Generation: 2 mg/kg/day		

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
F_0 Females				
Number of animals				

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
Toxicity	22	22	22	22
Toxicokinetics	4	8	8	8
Toxicokinetics – Etrasimod				
GD 6				
C_{max} (ng/mL)	NA[b]	271	1400	3080
AUC_{tlast} (ng·h/mL)	NA[b]	3330	16600	38300
GD 17				
AUC_{tlast} (ng·h/mL)	NA[b]	4320	21600	51200
LD 20				
C_{max} (ng/mL)	NA[b]	296	1340	2960
AUC_{tlast} (ng·h/mL)	NA[b]	2390	11400	36700
Mortality				
Toxicity[c]	1	0	0	3
Toxicokinetics	0	0	0	0
Number pregnant	22	21	22	22
Clinical observations	-	-	-	-
Gestation body weight GD 20 (g)[d,e]	368.8	+2.4	+0.8	-1.6
Gestation body weight gain GD 18 to 20 (g)[d,e]	26.7	+12.4	+7.1	-28.8*
Lactation body weight LD 21 (g)[d,e]	327.6	-1.5	-2.7	-0.4
Gestation food consumption GD 6 to 9 (g)[d]	23.3	-7.0	-11.2†	-16.4†
Gestation food consumption GD 12 to 15 (g)[d]	24.9	-1.1	-4.7	-9.1†

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
Gestation food consumption GD 6 to 18 (g)[d,e]	24.8	-3.1	-6.6*	-8.5†
Lactation food consumption LD 1 to 4 (g)[d]	33.59	-4.77	-10.18	-27.81†
Lactation food consumption LD 17 to 21 (g)[d,e]	67.20	+1.65	-9.85	-36.85†
Lactation food consumption LD 1 to 21 (g)[d,e,f]	52.31	+3.55	-1.37	-27.19†
Mean duration of gestation (days)	21.4	21.3	21.9†	21.8*
Abnormal parturition	0	0	0	1[g]
Necropsy observations	-	-	-	-
F_1 Litters (Preweaning)				
Number litters evaluated	22	21	22	21
Mean number of implantations	10.9	13.0*	11.9	11.8
Mean number liveborn pups/litter	9.9	11.7	10.0	8.5
Mean number stillborn pups/litter	0.00	0.53	3.11*	2.24
Live birth index (%)	100.00	99.47	96.89*	97.76
Post-implantation loss/litter (%)	12.29	9.85	15.65	26.15†
Postnatal survival to Day 4 (%)	92.45	97.14	87.36	42.84†
Postnatal survival to weaning (%)	99.40	98.21	97.73	88.95
Mean pup weight/litter PND 4 (g)[d]	11.26	-6.84	-0.01	-0.45
Mean pup weight/litter PND 7 (g)[d,h]	17.85	-8.08*	-6.95	-12.73†
Mean pup weight/litter PND 21 (g)[d,h]	58.85	-10.10†	-11.72†	-20.08†
Sex ratios (% males/litter at birth)	51.30	53.91	51.96	44.71
Clinical observations[i]				
PND 1 to 4				

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
Cold to touch	0	1	0	3
Suspected dehydration (based on skin turgor)	0	0	0	3
No milk band in the stomach	0	0	3	3
Discolored skin	1	1	0	2
Pallor skin	0	1	1	2
Swelling	0	0	0	3
PND 5 to 21 (postcull)				
Suspected dehydration (based on skin turgor)	1	0	0	5
Thin body condition	1	0	0	4
Reflex and Physical Development				
Eye opening	-	-	-	-
Pinna detachment	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
F_1 Males (Postweaning)				
Number evaluated	21	21	22	16
Number died or euthanized moribund[j]	0	0	2	1
Clinical observations	-	-	-	-
Body weight PND 22 (g)[d,l]	64.1	-10.6*	-9.1	-18.6†
Body weight PND 92 (g)[d,k,l]	585.4	+0.3	-3.4	-8.7*
Body weight PND 127 (g)[d,l]	686.8	-0.3	-4.6	-7.6
Body weight gain PND 22 to 29 (g)[d,m]	50.9	-2.0	-6.5	-15.1†
Food Consumption PND 22 to 92 (g)[d,n]	28.2	-3.7	-7.3	-6.5

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
Preputial separation (PND)[o]	44.4	45.3	46.0*	49.2†
Mean body weight at preputial separation (g)	277.6	270.4	277.1	284.5
Behavioral Evaluations				
Acoustic startle response	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Water maze	-	-	-	-
Number of males mated (confirmed)	18	19	21	15
Number of fertile males	16	17	19	13
Necropsy observations	-	-	-	-
F_1 Females (postweaning)				
Number evaluated	21	21	21	17
Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Premating body weight PND 22 (g)[d,l]	64.0	-14.5†	-13.3†	-20.7†
Premating body weight PND 92 (g)[d,k,l]	319.2	-3.5	-2.8	-3.6
Premating body weight gain PND 22 to 29 (g)[d,m]	41.7	+0.96	-0.24	-10.1*
Gestation body weight GD 13 (g)[d]	386.7	+0.8	+1.0	-2.2
Premating food consumption PND 22 to 92 (g)[d,n]	19.3	+1.9	-3.5	-4.3
Gestation food consumption GD 0 to 13 (g)[d]	23.68	+9.82	+5.69	+2.94
Mean age of vaginal patency (days)	30.2	29.3	30.0	31.6
Mean body weight at vaginal patency (g)	114.0	98.6†	103.2*	104.8
Behavioral Evaluations				

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**
Acoustic startle response	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Water maze	-	-	-	-
Mean number of estrous cycle/14 days	2.0	2.0	2.0	1.9
Mean estrous cycle length (days)	4.08	4.21	4.31	4.29
Cohabitation length (days)	1.9	2.6	2.7	2.7
Number of females mated (confirmed)	17	19	21	16
Number pregnant females	16	17	19	14
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Necropsy observations	-	-	-	-
Mean number corpora lutea	15.5	15.5	15.2	14.9
Mean number implantations	14.8	15.1	14.8	11.1
Mean % preimplantation loss	3.56	1.94	2.42	23.76
Mean % postimplantation loss	2.81	3.44	1.85	5.19
Mean number live conceptuses/litter	14.3	14.5	14.5	10.5
Mean number dead conceptuses/litter	0.5	0.6	0.3	0.6

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] All samples below assay limit of quantitation (5.00 ng/mL).
[c] There was no APD334-related mortality in the F0 generation females. One early death at 4 mg/kg/day was considered related to APD334 effects on parturition. In addition, one F0 female in the control group and two F0 females in the 4 mg/kg/day group were euthanized per protocol during the lactation phase due to no surviving pups.
[d] Group means are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.
[e] At end of gestation or lactation.
[f] During the lactation phase, mean maternal food consumption in the F0 generation females was significantly reduced ($p \leq 0.01$) at 4 mg/kg/day at each tabulated interval between LD 1 and LD 21 (-37% to -26%, compared with controls).

Report Title: An Oral Pre- and Postnatal Development Study of APD334 in Rats, Including Toxicokinetics and a Postnatal Neurobehavioral and Reproductive Functional Evaluation			**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.011	
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.4**	**2**	**4**

[g] There was one F0 generation female at 4 mg/kg/day that was euthanized on GD 22 due to severe signs during delivery (dystocia). This effect on parturition was considered related to APD334.

[h] There were no effects on mean pup body weights at birth at any dose level. After PND 7, there were reductions in mean pup body weights (combined, male, and female) in the 0.4, 2, and 4 mg/kg/day dose groups. The reductions in mean pup body weight increased in magnitude and persisted through PND 21 and were occasionally not dose dependent at 0.4 and 2 mg/kg/day.

[i] The number of litters affected are shown.

[j] There were no APD334-related mortalities at any dose level in the postweaning F1 males.

[k] At the end of the premating period.

[l] During the postweaning phase, there were reductions in mean body weights in the F1 males and females at ≥ 0.4 mg/kg/day that reflected lower pup body weights that occurred throughout the preweaning phase. By PND 92 (just prior to the initiation of the mating period) mean body weights of females in all dose groups, and males at 0.4 and 2 mg/kg/day, were comparable to controls. Reductions in mean body weights in the F1 males at 4 mg/kg/day persisted throughout the postweaning period.

[m] During the postweaning phase, there were reductions in mean body weight gains at 4 mg/kg/day in the F1 males at each tabulated interval between PND 22 and PND 57 and in the F1 females for the interval of PND 22 to 29.

[n] From weaning to mating.

[o] There were no APD334-related effects on balano-preputial separation in the F1 males at any dose. The increase in the mean number of days on which balano-preputial separation was observed at 2 and 4 mg/kg/day is likely related to reductions in pup body weight that occurred the F1 generation rats.

Notes: ∗ $p \leq 0.05$, † $p \leq 0.01$, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

–, no noteworthy findings; AUC_{tlast}, area under concentration-time curve from time from the start of dose administration to the last observed quantifiable concentration; C_{max}, maximum (peak) observed drug concentration; F_0, maternal/paternal generation; F_1, first generation; GD, Gestation Day; GLP, Good Laboratory Practice; LD, Lactation Day; NA, not applicable; PND, postnatal Day; qd, once daily

2.6.7.15. STUDIES IN JUVENILE ANIMALS

Table 27: Study in Juvenile Animals: 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Rats with 4-Week Recovery Period

Report Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Dosing Duration:** 49 days beginning on PND 21 (Day 1)	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.009
Initial Age: 21 days at initiation of dosing	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**Lot Number:** [redacted]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] (PND 21)		**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Control Article/Formulation:** L-Arginine hydrochloride, USP in deionized water (vehicle)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 100 mg/kg/day		

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of TK Animals	**8**	**38**	**38**	**38**	**8**	**38**	**38**	**38**
Toxicokinetics[b]:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	–	7.4	22.20	70.70	–	5.71	23.70	71.80
Day 49	–	6.85	16.20	60.20	–	10.50	32.90	72.30
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·h/mL)								
Day 1	–	62.70	236.00	956.00	–	69.60	269.00	1010.00
Day 49	–	74.50	181.00	631.00	–	128.00	363.00	957.00
Number of Main Study Animals	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**
Noteworthy Findings:								

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Died or Sacrificed Moribund[c]	0	0	2	3	0	2	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Functional Observational Battery[d]								
Physiological								
No. Examined	7	7	6	7	7	5	7	7
Body Weight (g)	319.4	306.3	301.7	299.4	216.6	204.4	197.1	201.1
Body Weight[e] (g) (%)								
Day 1	56.10	–1	–1	–7	54.05	0	–2	–1
Day 25	248.83	–7*	–4	–8**	184.17	–3	–5	–5
Day 50	444.67	–8**	–6*	–9**	261.17	–5*	–8**	–8**
Body Weight Change[e] (g) (%)								
Day 1 → 4	17.13	–8	–12**	–28**	14.95	–10	–9	–17**
Day 22 → 25	29.33	–14**	–10**	–15**	13.73	–17††	–23††	–14
Day 46 → 50	24.83	–10	–3	–5	10.00	–11	–29	–31
Day 1 → 50	388.56	–9**	–6*	–9**	207.12	–6*	–9**	–9**
Caged Food Consumption[e] (g/animal/day) (%)								
Day 1 → 4	9.3	+7	–3	–11	8.4	+7	+10	+4
Day 22 → 25	25.0	–7	–6	–5	17.7	–2	–7	–2
Day 46 → 50	32.3	–9	–17	–9	20.2	–5	–9**	–7*
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Sexual Maturation[d]								

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Preputial Separation (Days)	43.7	44.3	45.5	47.0§§	NA	NA	NA	NA
Vaginal Opening (Days)	NA	NA	NA	NA	33.8	33.9	36.0*	35.4
Day of First Estrus[d]	NA	NA	NA	NA	36.1	36.1	37.7	37.3
Motor Activity	–	–	–	–	–	–	–	–
Morris Water Maze	–	–	–	–	–	–	–	–
Startle Response	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology[d]								
Leukocytes (10^3 cells/µL)	12.13	4.95§§	5.11§§	4.98§§	11.00	3.92§§	3.38§§	3.46§§
Erythrocytes (10^6 cells/µL)	8.935	8.811	8.958	8.649	9.253	8.769*	8.637**	8.643**
Hemoglobin (g/dL)	16.92	16.73	16.88	16.52	17.31	16.41**	16.15**	15.93**
Hematocrit (%)	55.91	55.69	56.43	55.34	55.61	53.22*	52.55**	52.10**
Platelets (10^3 cells/µL)	1116.9	1213.1	1289.2	1447.6**	1143.3	1206.1	1325.3*	1385.4**
Lymphocytes (10^3 cells/µL)	10.243	3.623§§	3.780§§	3.353§§	9.663	2.833§§	2.381§§	2.377§§
Monocytes (10^3 cells/µL)	0.369	0.223**	0.239*	0.247*	0.281	0.205	0.167§§	0.199
Eosinophils (10^3 cells/µL)	0.097	0.080	0.079	0.079	0.084	0.067	0.057†	0.055††
Other Cells (10^3 cells/µL)	0.163	0.051††	0.054††	0.055††	0.141	0.043††	0.048††	0.060††
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry[d]								
Total Protein (g/dL)	6.63	6.29**	6.34*	6.34*	6.96	6.56**	6.57**	6.52**
Albumin (g/dL)	3.71	3.56**	3.58*	3.55**	4.02	3.87*	3.87*	3.77**
Globulin (g/dL)	2.93	2.74	2.76	2.79	2.95	2.70**	2.70**	2.75**

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Bone and Body Length	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights[c] (%)								
Number Examined	15	15	14	12	15	15	15	15
Body Weight (g)	399.8	–9*	–5	–9*	232.7	–4	–4	–7
Adrenal glands (g)	0.0775	–8	+3	–12	0.0799	–5	+5	+22**
Adrenal glands/BWt (%)	0.01942	+1	+9	–3	0.03435	–1	+9	+32§§
Adrenal glands/BrWt (ratio)	0.03764	–8	+3	–13	0.04178	–8	+3	+20**
Liver (g)	14.3933	0	+10*	+20**	8.5775	–1	+5	+8
Liver/BWt (%)	3.59727	+10**	+16**	+32**	3.68821	+4	+9**	+17**
Liver/BrWt (ratio)	7.00731	–1	+9	–18**	4.47564	–3	+4	+7
Spleen (g)	0.7330	–24**	–27**	–27**	0.5453	–27**	–25**	–26**
Spleen/BWt (%)	0.18340	–17**	–23**	–20**	0.23417	–24**	–22**	–20**
Spleen/BrWt (ratio)	0.35664	–25**	–28**	–28**	0.28446	–29**	–26**	–27**
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology[f]								
Number Examined	15	15	16	15	15	17	15	15
Kidneys								
nephropathy, chronic progressive								
minimal	6	3	5	11	7	5	5	10
Lymph node, mandibular								

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
decreased lymphocytes								
minimal	0	3	4	3	0	9	10	5
mild	0	0	0	2	0	1	2	5
Lymph node, mesenteric								
decreased lymphocytes								
minimal	0	11	14	12	0	14	15	14
mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Spleen								
decreased lymphocytes								
minimal	0	15	15	14	0	10	12	15
hematopoiesis, extramedullary								
minimal	0	3	3	4	0	2	2	3
mild	0	0	1	0	0	2	1	0
Thymus								
decreased lymphocytes								
minimal	0	15	14	11	0	14	11	10
mild	0	0	0	1	0	0	1	4

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
RECOVERY ANIMALS								
Number of Recovery Animals	**15**	**15**	**14**	**15**	**15**	**13**	**15**	**15**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[c]	1	0	0	1	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Functional Observational Battery[d]								
Physiological								
No. Examined	6	7	6	7	7	5	7	7
Body Weight (g)	549.2	498.3	510.0	490.7	295.7	281.8	260.7*	266.3*
Body Weight[e] (g) (%)								
Day 53	470.2	–7*	–6	–9**	273.0	–4	–10**	–8**
Day 78	522.1	–9**	–7	–11**	276.8	–3	–11**	–9**
Body Weight Change[e] (g) (%)								
Day 50 → 53	19.7	+7	+16	+8	10.5	+28	+16	+26
Day 74 → 78	–24.8	–1	–5	–2	–19	0	–5	+3
Day 50 → 78	70.4	–13	–4	–16	14.3	+41	+3	+2
Caged Food Consumption[e] (g/animal/day) (%)								
Day 50 → 53	32.7	–1	–2	+3	20.5	–3	–4	0
Day 74 → 77	27.0	–11*	–10	–9	17.6	–11	–17	–18†

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Motor Activity	–	–	–	–	–	–	–	–
Morris Water Maze	–	–	–	–	–	–	–	–
Startle Response	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology[d]								
Leukocytes (10^3 cells/µL)	12.48	8.69**	7.66**	7.09**	9.62	6.17§§	4.99§§	4.20§§
Lymphocytes (10^3 cells/µL)	10.159	6.806§§	5.904§§	5.475§§	8.344	5.061**	3.953**	3.271**
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Bone and Body Length	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights[e] (%)								
Number Examined	14	15	14	14	15	13	15	15
Body Weight (g)	510.9	–9**	–7*	–11**	267.5	–3	–11**	–9**
Spleen (g)	0.9141	–19**	–17**	–21**	0.5865	–8	–16**	–18**
Spleen/BWt (%)	0.17936	–11*	–12*	–11*	0.21985	–5	–7	–10
Spleen/BrWt (ratio)	0.42262	–18**	–16**	–20**	0.30158	–9	–17**	–21**
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology[f]								
Number Examined	15	15	14	15	15	13	15	15
Kidneys								

Study Title: APD334 L-Arginine: An Oral (Gavage) GLP 7-Week Toxicity and Toxicokinetic Study in Juvenile Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period					**Sponsor Reference Number**: APD334.TOX.009			
Sex	**Males**				**Females**			
Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
nephropathy, chronic progressive								
minimal	4	6	6	12	2	4	5	11
mild	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric								
decreased lymphocytes								
minimal	0	2	1	3	0	1	2	1
mild	0	1	0	1	0	0	0	0
Spleen								
decreased lymphocytes								
minimal	0	5	4	5	1	2	7	7
mild	0	0	0	1	0	0	0	0

[a] All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
[b] Group means are shown. The control group was analyzed for plasma concentration; however, group means were not calculated.
[c] No etrasimod-related effects were noted on survival in any APD334 dose groups evaluated. Causes of mortality were attributed to aspiration of water (3 males at 100 mg/kg/day; Day 41), or undetermined.
[d] Group means are shown.
[e] 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.
[f] Reported as number observed.
Notes: *, ANOVA & Dunnett - Significantly different from control ($p<0.05$); **, ANOVA & Dunnett - Significantly different from control ($p<0.01$);
§, ANOVA & Dunnett(Log) - Significantly different from control ($p<0.05$); §§, ANOVA & Dunnett(Log) - Significantly different from control ($p<0.01$);
†, Kruskal-Wallis & Dunn - Significantly different from control, ($p<0.05$); ††, Kruskal-Wallis & Dunn - Significantly different from control ($p<0.01$)
ANOVA, analysis of variance; BWt, body weight; BrWt, brain weight; NA, not applicable; No., number; PND, postnatal day; TK, toxicokinetic

2.6.7.16. OTHER TOXICITY STUDIES

Table 28: Other Toxicity Studies: Micro-Ames Reverse Mutation Screen for *不純物B

Report Title: Micro-Ames Reverse Mutation Screen	**Test Article:** *不純物B (starting material for APD334)	**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]015
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:** 1	**GLP Compliance:** No
Strains: S. typhimurium	**Number of Replicate Cultures:** 2	
Metabolizing System: Aroclor-1254 induced rat liver S9 microsomal fraction	**No. of Cells Analyzed/Culture:** Not applicable	
Vehicles: For test article: DMSO; for positive controls: DMSO		
Treatment: Plate incorporation for 2 days		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: 250 µg/well in strains TA97a and TA100 with metabolic activation.		
Genotoxic Effects: None		

Report Title: Micro-Ames Reverse Mutation Screen					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]015
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/well)**	**TA97a[a] (Mean)**	**TA98[a] (Mean)**	**TA100[a] (Mean)**
Without activation	DMSO	3.5 µL	8	1	9
	*不純物B	0.25	8	2	11
		2.5	8	2	9
		12.5	8	2	8
		25	8	2	8
		75	6	2	8
		250	5	2	5
	Positive control[b]	5.0×10^{-4}	9	2	10
		5.0×10^{-3}	31[c]	6	23[c]
		5.0×10^{-2}	> 60[c]	> 60[c]	> 60[c]
		5.0×10^{-1}	> 60[c]	> 60[c]	> 60[c]

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Report Title: Micro-Ames Reverse Mutation Screen					**Sponsor Reference Number:** TX[redacted]015
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/well)**	**TA97a[a] (Mean)**	**TA98[a] (Mean)**	**TA100[a] (Mean)**
With activation	DMSO	3.5 µL	8	1	8
	*不純物B	0.25	7	2	10
		2.5	8	1	11
		12.5	9	2	10
		25	7	2	9
		75	7	2	8
		250	3[d]	1	3[d]
	Positive control (2-aminoanthracene)	1.0×10^{-3}	10	3	11
		1.0×10^{-2}	19[c]	14[c]	29[c]
		1.0×10^{-1}	> 60[c]	> 60[c]	> 60[c]
		1.0	> 60[c]	> 60[c]	> 60[c]

[a] Mean revertant colonies from duplicate wells (for DMSO controls, means are from 12 wells).
[b] Positive control for: TA97a = ICR-191 Acridine; TA98 and TA100 = 4-nitroquinoline-N-oxide.
[c] Indicates > 6 revertant colonies and an increase over vehicle mean by 2-fold for TA97a, and TA100, and 3-fold for TA98.
[d] Cytotoxicity: reduction in mean number of revertant colonies.
DMSO, dimethylsulfoxide; S9, metabolic activation mixture

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Table 29: Other Toxicity Studies: Bacterial Reverse Mutation Screen for *不純物B

Report Title: *不純物B: Bacterial Reverse Mutation Assay	**Test Article:** *不純物B	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.010
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:** 1	**GLP Compliance:** Yes
Strains: S. Typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537; E. Coli WP2uvrA	**Number of Replicate Cultures:** 3	
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** 1.4 to 4.7 x 10^8 cells per plate	
Vehicles: For test article: DMSO; for positive controls: DMSO, except sterile water for sodium azide		
Treatment: Plate incorporation		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		

Report Title: *不純物B: Bacterial Reverse Mutation Assay							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.010
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without activation	DMSO	50.0 µL/plate	12 ± 1	72 ± 8	9 ± 2	6 ± 1	24 ± 8
	*不純物B	50.0	10 ± 2	69 ± 7	8 ± 2	5 ± 2	19 ± 4
		150	11 ± 3	80 ± 8	12 ± 4	6 ± 0	26 ± 6
		500	11 ± 1	72 ± 4	11 ± 4	5 ± 1	23 ± 3
		1500[a]	11 ± 1	76 ± 7	10 ± 8	5 ± 2	25 ± 6
		5000[a]	12 ± 2	84 ± 3	9 ± 4	7 ± 3	24 ± 2
	2NF	1.00	106 ± 15	NT	NT	NT	NT
	SA	1.00	NT	414 ± 13	587 ± 65	NT	NT
	9AAD	75.0	NT	NT	NT	232 ± 108	NT

＊新薬承認情報提供時に置き換え

Report Title: *不純物B: Bacterial Reverse Mutation Assay							**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.010
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
	MMS	1000	NT	NT	NT	NT	410 ± 0
With activation	DMSO	50.0 µL/plate	18 ± 4	92 ± 9	10 ± 2	5 ± 2	29 ± 3
	*不純物B	50.0	18 ± 3	111 ± 14	11 ± 3	6 ± 3	30 ± 8
		150	21 ± 3	106 ± 9	8 ± 2	9 ± 3	27 ± 3
		500	23 ± 3	89 ± 5	9 ± 1	5 ± 0	27 ± 2
		1500[a]	20 ± 0	94 ± 11	10 ± 1	6 ± 2	25 ± 4
		5000[a]	20 ± 1	106 ± 13	11 ± 5	7 ± 3	25 ± 10
	2AA	1.00	211 ± 10	NT	64 ± 16	NT	NT
	2AA	2.00	NT	579 ± 28	NT	73 ± 5	NT
	2AA	15.0	NT	NT	NT	NT	223 ± 25

[a] Precipitate.
2AA, 2-aminoanthracene; 2NF, 2-nitrofluorene; 9AAD, 9-aminoacridine; DMSO, dimethylsulfoxide; MMS, methyl methanesulfonate; NT, not tested; S9, metabolic activation mixture; SA, sodium azide; SD, standard deviation

Table 30: Other Toxicity Studies: Bacterial Reverse Mutation Screen for *不純物C

Report Title: *不純物C: Bacterial Reverse Mutation Assay	**Test Article:** *不純物C	**Sponsor Reference Number:** APD334.TOX.006
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of Independent Assays:** 1	**GLP Compliance:** Yes
Strains: S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537; E. coli WP2uvrA	**Number of Replicate Cultures:** 3	
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** 1.3 to 2.9 x 10^8 cells per plate	
Vehicles: For test article: DMSO; for positive controls: DMSO, except sterile water for sodium azide		
Treatment: Plate incorporation		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: Toxicity was observed with all conditions beginning at 33.3, 100, 333, 667, 1000 or 3333 µg per plate		
Genotoxic Effects: Positive mutagenic responses (3.5x through 36.9x, maximum increases) were observed with TA98 and WP2uvrA in the presence and absence of S9 activation and with TA1537 in the presence of S9 activation. Equivocal responses (1.5x and 2.3x, maximum increases) were observed with TA100 in the presence of S9 activation and TA1537 in the absence of S9 activation, respectively. The increases were outside of the respective historical control limit but do not completely meet all protocol acceptance criteria for evaluation as positive		

Report Title: *不純物C: Bacterial Reverse Mutation Assay							**Sponsor Reference Number** APD334.TOX.006
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without activation	DMSO	50.0 µL/plate	17 ± 3	102 ± 4	15 ± 5	10 ± 4	32 ± 3
	*不純物C	0.333	NT	89 ± 5	21 ± 8	7 ± 4	NT
		1.00	NT	100 ± 10	18 ± 3	12 ± 2	NT
		3.33	24 ± 4	90 ± 10	20 ± 5	9 ± 3	NT
		6.67	NT	NT	NT	NT	34 ± 1
		10.0	45 ± 9	103 ± 5	19 ± 4	14 ± 1	33 ± 1
		25.0	56 ± 9	NT	NT	NT	NT
		33.3	56 ± 5	113 ± 9	14 ± 7	18 ± 2	61 ± 13

Report Title: *不純物C: Bacterial Reverse Mutation Assay							**Sponsor Reference Number** APD334.TOX.006
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
		50.0	59 ± 1	NT	NT	NT	NT
		66.7	58 ± 11	NT	NT	NT	130 ± 2
		100	44 ± 7	115 ± 13	0 ± 0	23 ± 3	181 ± 12
		333	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		667	NT	NT	NT	NT	0 ± 0
		1000	NT	NT	NT	NT	0 ± 0
		3333	NT	NT	NT	NT	0 ± 0[a]
		5000	NT	NT	NT	NT	0 ± 0[a]
	2NF	1.00	82 ± 5	NT	NT	NT	NT
	SA	1.00	NT	541 ± 43	686 ± 93	NT	NT
	9AAD	75.0	NT	NT	NT	196 ± 67	NT
	MMS	1000	NT	NT	NT	NT	435 ± 16
With activation	DMSO	50.0 µL/plate	27 ± 3	107 ± 9	11 ± 3	11 ± 2	36 ± 5
	*不純物C	6.67	30 ± 11	NT	NT	NT	44 ± 3
		10.0	28 ± 4	115 ± 10	16 ± 7	13 ± 3	46 ± 9
		33.3	34 ± 4	99 ± 10	14 ± 6	13 ± 2	89 ± 2
		66.7	33 ± 4	NT	NT	NT	121 ± 4
		100	37 ± 5	117 ± 13	15 ± 1	23 ± 1	151 ± 11
		333	85 ± 16	152 ± 3	15 ± 2	30 ± 1	429 ± 32
		500	NT	161 ± 9	9 ± 3	41 ± 11	NT
		667	178 ± 20	134 ± 20	13 ± 4	36 ± 5	1047 ± 7

Report Title: *不純物C: Bacterial Reverse Mutation Assay							**Sponsor Reference Number** APD334.TOX.006
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ±SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
		1000	185 ± 7	134 ± 12	0 ± 0	58 ± 4	1329 ± 188
		3333[a]	63 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	34 ± 11	212 ± 41
		5000[a]	0 ± 0	NT	NT	NT	0 ± 0
	2AA	1.00	204 ± 20	NT	67 ± 13	NT	NT
	2AA	2.00	NT	651 ± 19	NT	52 ± 14	NT
	2AA	15.0	NT	NT	NT	NT	273 ± 26

[a] Precipitate.
2AA, 2-aminoanthracene; 2NF, 2-nitrofluorene; 9AAD, 9-aminoacridine; DMSO, dimethylsulfoxide; MMS, methyl methanesulfonate; NT, not tested; S9, metabolic activation mixture; SA, sodium azide; SD, standard deviation

Table 31: Other Toxicity Studies: Phototoxicity

Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Incubation (minutes)**	**Ultraviolet Radiation Dose**	**Etrasimod Doses**	**Number/Sex/Group**	**Noteworthy Findings**	**Sponsor Reference Number**
Phototoxicity							
Mouse/ BALB/c 3T3 fibroblasts	In vitro	90	UVA: 5 J/cm^2 UVB: 21-22 mJ/cm^2	0.316–17.8 µg/mL	Not applicable	APD334 did not demonstrate phototoxic potential in this assay.	TX[redacted]001

UVA, long wave ultraviolet A; UVB, short wave ultraviolet B

＊新薬承認情報提供時に置き換え