TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
略号および用語の定義一覧 3
1. まとめ 4
ラットおよびカニクイザルにおける用量制限毒性：重篤な状態悪化および消化管毒性 6
毒性試験で認められたツカチニブの標的臓器 6
消化管 6
肝臓 6
生殖器 7
胚・胎児毒性 7
その他の毒性 7
トキシコキネティクスの評価 7
2. 単回投与毒性試験 9
2.1. ラットを用いた単回経口投与毒性試験 9
3. 反復投与毒性試験 10
3.1. ラット 10
3.1.1. ラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験 10
3.1.2. ラットを用いた 13 週間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験 12
3.2. サル 14
3.2.1. サルを用いた 5 日間経口投与用量設定試験 14
3.2.2. サルを用いた 28 日間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験 14
3.2.3. サルを用いた 13 週間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験 16
4. 遺伝毒性試験 17
4.1. 細菌を用いた復帰突然変異試験 17
4.2. マウスリンフォーマ TK 試験 18
4.3. マウス骨髄小核試験 19
5. がん原性試験 19
6. 生殖発生毒性試験 19
6.1. 受胎能及び初期胚発生に関する試験 19
6.2. 胚・胎児発生に関する試験 19

6.2.1. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験 20
6.2.2. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験 21
6.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 21
7. 局所刺激性試験 22
8. その他の毒性試験 22
8.1. 光安全性試験 22
8.1.1. In vitro 光毒性試験 22
8.1.2. In vivo 光毒性試験 22
8.2. 不純物の毒性試験 23
8.2.1. [redacted]のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験 23
8.2.2. [redacted]のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験 23
8.2.3. [redacted]のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験 23
9. 考察及び結論 24
9.1. ラットおよびカニクイザルにおける用量制限毒性 24
9.2. 毒性試験で認められたツカチニブの標的臓器 24
9.3. トキシコキネティクスの評価 25
9.4. 結論 25
10. 図表 26

LIST OF TABLES

Table 1. ツカチニブの毒性試験一覧 5
Table 2. 毒性試験でのツカチニブ曝露量の一覧 8

略号および用語の定義一覧

略号，用語	省略していない表現または定義
ALP	alkaline phosphatase：アルカリフォスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve：濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{12h}	area under the concentration-time curve through 12 hours：投与後 12 時間までの濃度 - 時間曲線下面積
BUN	blood urea nitrogen：血中尿素窒素
C_{max}	maximum observed plasma or serum concentration：最高血漿中濃度
CYP	cytochrome P450：シトクロム P450
DMSO	dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
EC_{50}	half maximal effective concentration：50%効果濃度
EGFR	epidermal growth factor receptor：上皮増殖因子受容体
GGT	gamma-glutamyl transferase：ガンマグルタミルトランスフェラーゼ
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
HER	human epidermal receptor：ヒト上皮増殖因子受容体
HNSTD	highest non-severely toxic dose：重篤な毒性が発現しない最大投与量
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
LDH	lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
MNPCE	micronucleated polychromatic erythrocytes：小核を有する多染性赤血球
NZW	New Zealand White：ニュージーランドホワイト種
PCE	polychromatic erythrocytes：多染性赤血球
PIF	photo-irritant factor
QTc	corrected QT interval：心拍数で補正した QT 間隔
S9	ポストミトコンドリア上清
SD	Sprague-Dawley
SDH	sorbitol dehydrogenase：ソルビトール脱水素酵素
STD10	severely toxic dose in 10% of the animals：供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量
SSL	solar simulated light：太陽光模擬ライト
TBIL	total bilirubin：総ビリルビン
TK	thymidine kinase：チミジンキナーゼ
UV	ultraviolet light：紫外線

1. まとめ

ツカチニブ（別名 ONT-380，ARRY-380 または AR00432380）は，ヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）を標的とする低分子の可逆的チロシンキナーゼ阻害薬であり，臨床投与経路は経口投与である。

ツカチニブは in vitro 試験においてツカチニブは HER2 に対する強力な阻害作用を示し，細胞内シグナル伝達の評価試験では，HER2 と同じく ErbB キナーゼファミリーに属するチロシンキナーゼである上皮増殖因子受容体（EGFR）と比較し，HER2 に対する選択性は 1000 倍を上回った（CTD 2.6.2）。また，in vitro 試験および in vivo 試験（ツカチニブ単独投与，トラスツズマブまたはドセタキセルとの併用投与）においてツカチニブの抗腫瘍活性が示され，マウス頭蓋内腫瘍異種移植モデルにおいても効果が認められた。ツカチニブの薬理作用は主に未変化体に基づくものと考えられた。

ツカチニブは主に胆汁排泄され，腎排泄は限定的である（CTD 2.6.4）。ツカチニブは主に CYP2C8 によって代謝される。ヒトにおける主要な代謝物である ONT-993 の曝露量は総薬物関連物質曝露量の 10%未満である。また，ツカチニブは CYP3A を時間依存的に阻害する。ヒトへのツカチニブ投与によりメトホルミンおよびクレアチニンの血中濃度が増加したことから，腎トランスポーターに対する阻害作用が示唆された。

本項に示すツカチニブの一連の毒性試験（3 種の分解物/不純物の反復投与毒性試験を含む）により得られた成績は，ツカチニブの臨床使用を支持するものと考えられた。毒性試験で認められた所見は，HER2 シグナル伝達阻害を機序とする本薬の薬理作用から概ね予想されたものであった。

ツカチニブの毒性は，医薬品規制調和国際会議（ICH）の抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9 および ICH S9 Q&A）に従い，HER2 陽性乳癌の治療における使用を支持する目的で一連の非臨床試験により評価した。すべての重要な試験は，Good Laboratory Practice（GLP）に準拠して実施した。

単回投与毒性試験はラットを用い，反復投与毒性試験はラットとカニクイザルを用いて実施した。ラットはげっ歯類の中で豊富な背景データが存在することから選択された。また，ツカチニブの単回投与により，カニクイザルに比べてイヌにおける嘔吐の頻度が高かったことから，非げっ歯類の動物種にはカニクイザルを用いることがツカチニブの毒性評価として妥当と判断した［カニクイザルでは 60 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回，計 9 回投与したところ嘔吐はみられなかったが，イヌでは 11～16 mg/kg の用量での単回投与で 36 例中 9 例に認められた（データ未提示）］。臨床での投与経路に基づき，毒性試験においてはツカチニブを経口（カニクイザル 5 日間および 28 日間投与試験では経鼻胃管）投与した。ツカチニブの反復投与毒性試験として，カニクイザルを用いた 5 日間投与用量設定試験，ならびにラットまたはカニクイザルを用いた 28 日間および 13 週間の反復投与毒性試験を実施した。また，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験，光毒性試験を実施した。加えて，ツカチニブの類縁物質のうち，ツカチニブの毒性試験では評価に十分な用量での投与が予想されない[redacted]分解物（[redacted]），[redacted]不純物（[redacted]）および[redacted]不純物（[redacted]）（CTD 2.3.S.3.2.1）についてラット 28 日間投与毒性試験および in silico 遺伝毒性評価を実施した。

申請製剤であるツカチニブ錠 50 mg および 150 mg に使用する添加剤のうち，塩化カリウムの 1 日最大使用量（[redacted] mg）が本邦における経口投与での使用前例（200 mg）を超え，新添加物に該当することから，公表文献を基に毒性評価を行い，その結果を CTD 1.13.4.1.4 に示した。

毒性試験の一覧を Table 1 に示す（CTD 2.6.7.1 も参照のこと）。

Table 1.　ツカチニブの毒性試験一覧

試験	投与	動物種	被験物質
単回投与毒性試験（GLP）			
単回投与	経口，単回	SD ラット	ツカチニブ
反復投与毒性試験（非 GLP）			
5 日間投与	経口（経鼻胃管），1 日 2 回（計 9 回）	カニクイザル	ツカチニブ
反復投与毒性試験（いずれも GLP）			
28 日間投与	経口（経鼻胃管），1 日 2 回	SD ラット	ツカチニブ
13 週間投与	経口，1 日 2 回	SD ラット	ツカチニブ
28 日間投与	経口，1 日 2 回	カニクイザル	ツカチニブ
13 週間投与	経口，1 日 2 回	カニクイザル	ツカチニブ
遺伝毒性試験（いずれも GLP）			
復帰突然変異	In vitro	*S typhimurium* および *Escherichia coli*	ツカチニブ
マウスリンフォーマ *Tk*	In vitro	マウスリンパ腫細胞 L5178Y	ツカチニブ
In vivo 小核	経口，単回	ICR マウス	ツカチニブ
生殖発生毒性試験（いずれも GLP）			
胚・胎児発生毒性	経口，1 日 2 回	SD ラット	ツカチニブ
胚・胎児発生毒性	経口，1 日 2 回	NZW ウサギ	ツカチニブ
その他の毒性試験（いずれも GLP）			
In vitro 光毒性	In vitro	BALB/c 3T3 細胞	ツカチニブ，ONT-993
In vivo 光毒性	経口，1 日 2 回	Long-Evans ラット	ツカチニブ
28 日間投与	経口，1 日 2 回	SD ラット	[redacted]
28 日間投与	経口，1 日 2 回	SD ラット	
28 日間投与	経口，1 日 2 回	SD ラット	
その他の毒性評価（非 GLP）			
遺伝毒性構造アラートの評価 [a]	In silico	該当なし	ツカチニブ，[redacted]

重要な非臨床試験の被験物質は，組成および構造，生化学的および生物物理学的プロファイルならびに不純物プロファイルの観点から，治験薬および市販予定製剤と同等であった（CTD 2.3.S.4.4）。
a: ツカチニブおよび各種不純物の遺伝毒性構造アラートの評価に関する報告書（TRN-5521，TRN-5587，TRN-5780，TRN-5790）を M4.3 参考文献として添付した。

ラットおよびカニクイザルにおける用量制限毒性：重篤な状態悪化および消化管毒性

ラットを用いた単回投与毒性試験では，ツカチニブを最高 300 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性が示された。ラットおよびカニクイザルを用いた最長 13 週間の反復投与毒性試験における用量制限毒性は，死戦期を招いた重篤な状態悪化（活動および摂餌量減少，円背位，正向反射喪失，冷感など）および消化管毒性（水様便，脱水など）であった。忍容性が得られなかった用量では，その他に肝臓の脆弱化（剖検所見），肝細胞の腫脹/淡明化，腎尿細管上皮の変性/再生（病理組織学的所見），消化管のびらん/潰瘍などが認められた。忍容性が示された用量では，臨床病理検査値の軽微な変化（赤血球パラメータの減少ならびに網状赤血球数，白血球数，好中球数，単球数，血小板数，血清肝機能マーカーおよびコレステロールの増加），体重低値，臓器重量増加ならびに肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）における病理組織学的変化が，ツカチニブ投与に起因する変化としてみられた。ラットの 28 日間および 13 週間投与毒性試験における STD10（供試動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量）は 60 mg/kg/日超であった。28 日間投与毒性試験では中間用量の 60 mg/kg/日において忍容性は良好であった。また，13 週間投与毒性試験においては，高用量である 60 mg/kg/日が無毒性量と判断された。カニクイザルの 28 日間および 13 週間投与毒性試験における HNSTD（重篤な毒性が発現しない最大投与量）はそれぞれ 20 および 40 mg/kg/日であり，無毒性量は両試験ともに 20mg/kg/日と判断された。

毒性試験で認められたツカチニブの標的臓器

消化管

消化管毒性はラットおよびカニクイザルの両動物種で認められた用量制限毒性であった。概して高用量での体重低値または体重増加量の減少を伴うものであり，ラットと比較してカニクイザルでより顕著であった。ラットを用いた 28 日間投与毒性試験では，高用量として 200 mg/kg/日を設定したが，一般状態の悪化，糞便量の減少および粘液便が認められたため，試験 8 日から用量を 120 mg/kg/日に減量して試験を継続した。消化管のびらん/潰瘍は，試験の前半での死亡例または状態悪化により安楽殺した個体においてのみにみられた。剖検予定日まで生存した個体には消化管の病理組織学的変化は認められなかった。カニクイザルでは消化管への影響を示唆する一般状態の変化（糞便異常）が 5 mg/kg/日以上の投与群で観察された。しかしながら，カニクイザルを用いた毒性試験のいずれにおいても，それらの一般状態変化に関連する消化管の病理組織学的変化はみられなかった。両動物種の一般状態の変化はいずれも休薬期間に回復した。

肝臓

ラットおよびカニクイザルを用いた毒性試験において，それぞれ 6 mg/kg/日以上および 20 mg/kg/日以上の投与群で肝細胞または肝胆道系への影響を示唆する変化が認められた。忍容性が示された用量では，血清肝機能マーカー［総ビリルビン（TBIL），γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT），アルカリフォスファターゼ（ALP），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）またはソルビトール脱水素酵素（SDH）など］および肝臓重量の増加ならびに小葉中心性肝細胞肥大がみられた。カニクイザルを用いた 28 日間投与毒性試験では，忍容性が示されなかった 60 および 90 mg/kg/日群において，中途死亡例の剖検では概して肝臓の脆弱化がみられ，病理組織学的検査において肝細胞の腫脹/淡明化が認められた一方で，血清肝機能マーカーに変化はみられなかった。これらの変

化は，剖検予定日まで生存した 60 mg/kg/日群の動物では観察されなかった。両動物種のいずれの毒性試験においても，カニクイザルの中途死亡例を除き，肝細胞の損傷を示す病理組織学的変化（変性，炎症，壊死など）は認められなかった。

生殖器

ラットを用いた 28 日間および 13 週間投与毒性試験において，雌の生殖器ならびに雄の乳腺および前立腺の変化が観察された。その所見として，子宮萎縮，膣の粘液産生，黄体の変化，乳腺小葉萎縮（雄），ならびに生殖器の臓器重量減少（子宮/子宮頸部および前立腺）がみられた。休薬期間を経て，20 mg/kg/日以上の投与群の雌における卵巣の所見が回復傾向にとどまったのを除き，病理組織学的所見は回復した。カニクイザルでは生殖器への影響は認められなかった。

胚・胎児毒性

ラットまたはウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験において，外表および内臓の変異および奇形，ならびに骨格の変異がみられた。ラットでは母動物で毒性がみられた 90 mg/kg/日よりも高い用量である 120 mg/kg/日以上で胚・胎児毒性が認められた。ウサギでは母動物において顕著な毒性がみられなかったが，胚・胎児毒性が 90 mg/kg/日以上の用量で認められた。

その他の毒性

ツカチニブの in silico 評価の結果，遺伝毒性のアラートは示されなかった。また，細菌を用いた復帰突然変異試験，L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ *Tk* 試験およびマウスを用いた in vivo 小核試験の結果はいずれも陰性であり，ツカチニブは遺伝毒性を有さないと判断した。

BALB/c 3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験の結果，ツカチニブが光毒性を示す可能性が考えられた。しかしながら，有色ラットを用いた in vivo 光毒性試験ではツカチニブの投与に起因する皮膚および眼の光毒性を示す変化ならびに病理組織学的所見は認められず，ツカチニブの光毒性は陰性と判断した。

[redacted]分解物 [redacted]，[redacted]不純物 [redacted] および[redacted]不純物 [redacted] の in silico 評価の結果，遺伝毒性のアラートは示されなかった。また，それぞれを被験物質とした 28 日間投与毒性試験では，ヒト等価用量の 10 倍量を高用量としてラットに反復投与したところ，毒性変化はみられなかった。

トキシコキネティクスの評価

ラット，ウサギまたはカニクイザルの毒性試験においてツカチニブまたはその代謝物である ONT-993 の血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。ツカチニブの最高血漿中濃度（C_{max}）および濃度 - 時間曲線下面積（AUC）は，用量の増加に伴って増加し，多くの試験で投与初日と最終投与後の曝露量を比較すると蓄積が認められた。雄の曝露量は概して雌と同等または雌に比べて低値であった。ONT-993 の曝露量はツカチニブと比較して顕著に低かった。13 週間投与毒性試験のラットの STD10 およびカニクイザルの HNSTD におけるツカチニブの投与後 12 時間までの濃度 - 時間曲線下面積（AUC_{12h}）はそれぞれ 41.1 および 9.92 µg•h/mL であった。各毒性試験のツカチニブ曝露量の概要を Table 2 に示す。

Table 2.　毒性試験でのツカチニブ曝露量の一覧

試験番号	動物種	投与期間	STD10 または HNSTD (mg/kg/日)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{12h} (μg•h/mL)
単回投与毒性試験					
1140-027	SD ラット	1 日間	忍容性: 300	35.2	424[h]
反復投与毒性試験					
1140-028	SD ラット	28 日間	>60[a] (<120)[b]	5.37	29.6
8369684	SD ラット	13 週間	>60 [a,c]	6.36	41.1
JAY00097	カニクイザル	5 日間	120 [d]	13.4	84.0[e]
JAY00093	カニクイザル	28 日間	20 [d]	1.17	5.22
8369685	カニクイザル	13 週間	40 [d]	1.83	9.92
生殖発生毒性試験					
20160869	SD ラット	妊娠 7～17 日	母動物: >150[a,f]	9.55	60.6
			胚胎児: 120[f]	3.84	31.6
20144956	NZW ウサギ	妊娠 7～19 日	母動物: >150[f]	5.86	25.9
			胚胎児: 90[f]	2.03	6.1
その他の毒性試験（光毒性試験）					
20129137	Long-Evans ラット	3 日間	>60 [a,c]	6.3	28.3
臨床試験					
ONT-380-012[g]	ヒト	反復投与	300 mg 1 日 2 回	0.667	3.47

いずれの試験もツカチニブを 1 日 2 回，経口投与した。曝露量は，ヒト定常状態（臨床試験 ONT-380-012）または毒性試験の最終測定時の血漿中濃度データに基づき，幾何平均濃度を用いて算出した。
a: これらの投与量ではツカチニブ投与に関連する死亡はみられなかった。STD10 はこれら忍容性が示された投与量を上回るものと考えられた。
b: 試験開始時に高用量として設定した 200 mg/kg/日の投与群で 10/30 例が死亡したため，試験 8 日に投与量を 120 mg/ kg/日に減量した。投与量減量後 5 日間（主に減量後 2 日間）に 7/20 例が死亡したが，試験 13 日以降は 120 mg/kg/日群のすべての動物が生存した。投与量を減量直後にも死亡が認められたことから，120 mg/kg/日は忍容性が示されず STD10 に該当しないと判断した。なお，60 mg/kg/日では臨床病理検査値および生殖器の軽微な変化が認められたことに基づき，無毒性量は 20 mg/kg/日と判断した。
c: 60 mg/kg/日はこれらの試験の高用量であり，無毒性量（13 週間投与試験）または無影響量（光毒性試験）であった。
d: サルを用いた 5 日間，28 日間および 13 週間投与毒性試験の無毒性量は，それぞれ 60（一般状態および臨床病理検査値の変化に基づき），20（HNSTD と同一）および 20（40 mg/kg/日で抗生物質の処置を伴う糞便異常がみられたことに基づき）mg/kg/日であった。
e: AUC_t
f: 生殖発生毒性試験の曝露量は母動物のトキシコキネティクスデータに基づく。ラットおよびウサギの胚・胎児発生に関する試験では，高用量（いずれも 150 mg/kg/日）で母動物の死亡や重篤な毒性は認められなかった。母動物の無毒性量は，ラットでは低用量の 90 mg/kg/日で毒性がみられたため得られず，ウサギでは 90 mg/kg/日であった。また，ラットおよびウサギの胚・胎児の無毒性量はそれぞれ 90 および 60 mg/kg/日であった。なお，表中に示したラットおよびウサギの胚・胎児毒性発現用量（それぞれ 120 および 90 mg/kg/日）のヒト換算用量はそれぞれ 19.35 および 29.16 mg/kg/日である。
g: 試験報告書：ONT-380-012, Part D
h: AUC_{24h}

以上に示した通り，ツカチニブの毒性プロファイルは一連の非臨床試験により十分に明らかにされた。ラットおよびサルにおける用量制限毒性として，死戦期を招いた重篤な状態悪化または消化管毒性がみられた。標的臓器として消化管，肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）が特定され，さらには軽微な臨床病理検査値の変化がみられた。ツカチニブ

は遺伝毒性および光毒性を示さなかった。一方で，ツカチニブの投与に関連する胚・胎児毒性が認められた。ツカチニブの分解物/不純物のラット反復投与毒性試験では毒性は認められなかった。以上のように，ツカチニブの毒性は適切に特徴付けられており，概ね作用機序から予想された変化，または他の抗 HER2 薬の毒性プロファイルと一致していた。以上の毒性試験成績は，ツカチニブの臨床使用を裏付けるものと考えられた。

2. 単回投与毒性試験

2.1. ラットを用いた単回経口投与毒性試験

試験報告書：1140-027，概要表：2.6.7.5

雌雄 SD ラット（10 匹/性/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），30，100 または 300 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間観察した。また，各用量のサテライト群（6 匹/性/群）を設けて，トキシコキネティクスを評価した。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。また，ツカチニブの血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化，死亡および眼科学的所見は認められなかった。30 mg/kg 群の雄 1 例が試験 4 日に死亡したが，病理組織学的検査の結果，死因となるような変化は認められなかったこと，試験を通じて 1 例のみの死亡であったことから，ツカチニブ投与に起因しない偶発的な死亡と考えられた。体重および摂餌量の急性変化はみられなかった。なお，300 mg/kg 群の摂餌量および体重増加量の軽度な増加傾向が試験期間を通じて認められた。

血液凝固検査および尿検査においてツカチニブ投与に関連する変化はみられなかった。試験 2 日では，血液学的検査において 100 および 300 mg/kg 群で赤血球パラメータの軽微な減少，血液化学的検査において 100 および 300 mg/kg 群でコレステロールおよびグルコースの増加，300 mg/kg 群でカルシウムの軽微な減少（雄）および総ビリルビンの増加が認められた。試験 14 日では，臨床病理検査値の変化は認められなかった。

雌雄のツカチニブの曝露量に統計的有意差は示されなかったが，低用量では雄に比べて雌で高い傾向がみられた。30，100 および 300 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 1.60，9.19 および 35.2 µg/mL であり，AUC_{24h} はそれぞれ 7.47，94.8 および 424 µg•h/mL であった（いずれも雌雄合算値）。

剖検所見は認められなかった。300 mg/kg 群の雌で肝臓重量の増加がみられたが，病理組織学的変化は認められず，毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。ツカチニブ投与に関連する病理組織学的変化として，100 および 300 mg/kg 群の雄で骨格筋（ヒラメ筋）における軽微な単核球浸潤または筋線維変性/壊死の発現頻度増加がみられた。また，ツカチニブ投与との関連性が否定できない所見として，300 mg/kg 群の雌でリンパ節，胸腺および脾臓における軽微なリンパ球減少が認められた。リンパ球の減少はストレスに起因する可能性も考えられ，必ずしもツカチニブ投与に直接関連しているわけではないと考えられた。

以上のように，ラットにツカチニブを 0，30，100 または 300 mg/kg の用量で単回経口投与したところ，ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化，死亡および眼科学的所見は認められなかった。300 mg/kg 群の摂餌量および体重増加量の軽度な増加傾向は毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。100 または 300 mg/kg 群で試験 2 日にみられた赤血球パラメータおよびカルシウムの減少ならびにコレステロール，グルコースおよび総ビリルビンの増加は，試験 14 日には認められず，回復性が示された。300 mg/kg 群の雌で肝臓重量の増加がみられたが，病理組織学的変化は認められず，毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。ツカチニブ投与に関連する病理組織学的変化として，100 および 300 mg/kg 群の雄で軽微なヒラメ筋における単核球浸潤または筋線維変性/壊死の発現頻度増加が認められた。また，ツカチニブ投与との関連性が否定できない所見として，300 mg/kg 群の雌でリンパ組織における軽微なリンパ球減少が認められた。リンパ球の減少はストレスに起因する可能性も考えられ，必ずしもツカチニブ投与に直接関連しているわけではないと考えられた。これらのことから，ラットにツカチニブを最高 300 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性が示された。300 mg/kg における C_{max} および AUC_{24h} はそれぞれ 35.2 µg/mL および 424 µg•h/mL であった。

3. 反復投与毒性試験

3.1. ラット

3.1.1. ラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験

試験報告書：1140-028，概要表：2.6.7.7.1

雌雄 SD ラット（15 匹/性/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），20，60 または 200/120 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，10，30 または 100/60 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 28 日間経口投与し，ツカチニブの毒性を評価した。各群 5 匹/性には 4 週間の休薬期間を設けて回復性を検討した。また，各用量のサテライト群（9 匹/性群）を設けて，トキシコキネティクスを評価した。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。また，ツカチニブの血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

200 mg/kg/日で投与を開始した高用量群では，死亡例（死亡発見または瀕死例の安楽殺）が多発したことから，試験 8 日に 120 mg/kg/日に減量した。減量後も，主に最初の 2 日間で死亡例がみられ，試験 12 日までに，雄 8/20 例，雌 9/20 例に達した。試験 13 日以降に 200/120 mg/kg/日群（サテライト群も含め）で死亡例はみられなかった。病理組織学的検査を実施した多くの中途死亡例では消化管のびらんまたは潰瘍が認められ，死亡との関連する可能性が考えられた。

試験 10 日までに，ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化（活動性低下，円背位，正行反射喪失，冷感，呼吸困難，糞便の減少，粘液便，衰弱および肛門周囲の汚れ）が 200/120 mg/kg/日群のみに認められた。試験 14 日以降，一般状態変化の重症度は軽減し，200/120 mg/kg/日群で活動性低下，円背位，糞便の減少，水様便および削痩がみられたのみであった。休薬期間には，ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。眼科学的検査では，ツカチニブ投与に関連する変化はみられなかった。

200/120 mg/kg/日群では試験 1 週に体重減少がみられ，投与量を 120 mg/kg/日に減量した後も投与期間中の体重は対照群よりも有意に低値であった。200/120 mg/kg/日群は，摂餌量も試験 1 週に顕著に低く，投与期間中は試験 3 週を除いて対照群より低値であった。休薬期間中，200/120 mg/kg/日群の雄および雌の体重増加量は対照群と比較してそれぞれ 63%および 64%高く，摂餌量は対照群と同等であった。

血液凝固検査値および尿検査値のツカチニブ投与に関連する変化はみられなかった。血液学的検査では，20 および 60 mg/kg/日群においてツカチニブ投与に関連する変化は認められなかった。200/120 mg/kg/日群において，投与期間終了時（試験 29 日）に好中球数増加（雌雄）ならびに赤血球数およびヘモグロビンの減少（雄のみ）がみられた。血液化学的検査では，60 mg/kg/日以上の投与群でコレステロール値の上昇がみられ，60 mg/kg/日群においてそれ以外の変化は認められなかった。200/120 mg/kg/日群では，TBIL，GGT，ALP および SDH の増加がみられた（対照値の 2 倍未満）。カルシウムは，雄では試験 14 日と 29 日の両方でわずかな減少がみられた一方，雌では試験 14 日に増加し，試験 29 日ではわずかに減少した。休薬期間終了時の臨床病理検査では変化は認められず，投与期間にみられた変化の回復性が示された。

剖検では，ツカチニブ投与に関連する所見として，200/120 mg/kg/日群の中途死亡例の雌雄で，1 箇所以上の消化管組織（十二指腸，空腸，腺胃および非腺胃）で赤色化または赤色病巣が観察され，まれに非腺胃のびらん/潰瘍がみられた。これらの剖検所見は，亜急性炎症の有無にかかわらず，病理組織学的所見としての腸管のびらん/潰瘍を伴っていた。計画屠殺例および休薬後の動物にはこれらの所見は認められなかった。

投与期間終了時では，200/120 mg/kg/日群の雌雄における最終体重は対照群に比べて低値であった。ツカチニブの投与に関連する可能性がある臓器重量の変化として，200/120 mg/kg/日群の雌雄で肝臓および副腎重量の増加がみられたが，一貫した病理組織学的所見は伴わなかった。

病理組織学的検査では，200/120 mg/kg/日群の雄の骨格筋（ヒラメ筋）において筋線維変性/ヒラメ筋再生がみられ，腰筋で単核球浸潤の発現頻度増加が認められた。休薬期間終了時に，60 mg/kg/日群の雄 3/5 例で腰筋の単核球浸潤が観察されたが，用量反応関係はみられなかったため，毒物学的意義は低いと考えられた。

ツカチニブ投与に関連する病理組織学的所見が雌の膣および卵巣において認められた。投与期間終了時に，60 および 200/120 mg/kg/日群の雌で，膣上皮萎縮の発現頻度の増加および重症化がみられた。また，200/120 mg/kg/日群の雌全例で卵巣の卵胞閉鎖の発現頻度増加が観察された。これら所見の病因は明らかではなかった。雌の中途死亡例ではこれらの所見がより顕著であったため，死戦期の性周期の乱れを示している可能性があるが，直接的な被験物質の影響は否定できなかった。これらの変化は休薬後には認められなかった。

試験 27 日の雄と雌の C_{max} の比は 20，60 および 200/120 mg/kg/日群でそれぞれ 2.6，1.5 および 1.0 であり，低用量で性差がみられた。20 および 60 mg/kg/日群の試験 1 日から試験 27 日までの C_{max} 値の増加は 50%未満であった（高用量群は試験途中で投与量を減量したため，蓄積性を評価できなかった）。試験 27 日の AUC_{12h} は 20，60 および 200/120 mg/kg/日群でそれぞれ 3.15，29.6 および 72.5 µg•h/mL であった。試験 1 日および試験 27 日の AUC_{12h} は，雌雄共に用量に比例して増加した。

以上のように，ラットにツカチニブを 0，20，60 または 200/120 mg/kg/日の用量で 28 日間経口投与したところ，60 mg/kg/日まで忍容性は良好であった。200 mg/kg/日から減量した直後にも死亡例が認められたことから，120 mg/kg/日は不耐性の用量と判断した。また，無毒性量は 20 mg/kg/日と判断し，最終投与時の雄および雌の C_{max} はそれぞれ 0.508 および 1.32 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 2.32 および 4.35 µg•h/mL であった。STD10 は 60 mg/kg/日超（かつ 120 mg/kg/日未満）と結論した。なお，60 mg/kg/日の最終投与時の C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 5.37 µg/ mL および 29.6 µg•h/mL であった。

3.1.2. ラットを用いた 13 週間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験

試験報告書：8369684，概要表：2.6.7.7.2

雌雄 SD ラット（20 匹/性/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），6，20 または 60 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，3，10 または 30 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 13 週間経口投与し，ツカチニブの毒性を評価した。各群 5 匹/性には 4 週間の休薬期間を設けて回復性を検討した。また，各用量のサテライト群（9 匹/性/群とし，溶媒対照群のみ 3 匹/性/群とした）を設けて，トキシコキネティクスを評価した。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。また，ツカチニブおよび代謝物 ONT-993 の血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

ツカチニブ投与に関連する一般状態の変化，死亡および眼科学的所見は認められなかった。60 mg/kg/日群の雄の体重および体重増加量が試験 4 日から投与期間終了時まで対照群に比べて低値であった（試験 92 日の体重は対照群より 12%低かった）。この体重の低値は，摂餌量の減少に伴うものであり，投与期間中，60 mg/kg/日群の雄の摂餌量は対照群と比べて 10～20%低かった。これらの変化は，関連する一般状態の変化はみられなかったことから毒性学的意義に乏しいと判断した。休薬期間中の各ツカチニブ投与群の体重増加量は対照群と同等であった。

血液学的検査における軽微な変化として，60 mg/kg/日群において赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値）の減少，赤血球分布幅の増加が認められた。また，20 mg/kg/日以上の投与群の雌および 60 mg/kg/日群の雄では網状赤血球数の増加がみられた。60 mg/kg/日群の雌において炎症反応を示唆する軽微から軽度の血小板数，好中球数および単球数の増加が認められた。これらに関連する病理組織学的所見はみられなかった。

血液化学的検査では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌において AST の増加（対照値の最大 2.5 倍），60 mg/kg/日の雄および 6 mg/kg/日以上の雌で ALT（対照値の最大 2.5 倍）および ALP（対照値の最大 2.0 倍）の増加が認められ，肝細胞または肝胆道系への軽微な影響が示唆された。これらの変化については，軽微な小葉中心性肝細胞肥大および肝臓重量の増加との関連性が考えられた。また，60 mg/kg/日群においてクレアチニン，クロールおよびリンの軽微から軽度な増加が認められ，摂餌量または体重の低値もしくは尿量の減少に起因する腎前性の脱水を示唆するものと考えられた。

以上の臨床病理検査値の変化はいずれも程度が低かったことから毒性学的意義に乏しいと考えられた。また，概して休薬期間を経て回復性が示された。血液凝固検査および尿検査において変化は認められなかった。

投与期間終了時の臓器重量測定では，20 mg/kg/日以上の投与群の雌の肝臓重量の増加，ならびに 60 mg/kg/日群の雌の子宮/子宮頸部および雄の前立腺重量の減少がみられた。これらの臓器重量の変化は休薬後にはみられず，回復性が示された。

病理組織学的所見が 6 mg/kg/日以上の投与群の雌の肝臓（小葉中心性肝細胞肥大：軽微），卵巣（黄体数減少，黄体嚢胞および間質細胞増加：軽度から中等度），子宮（萎縮：軽微から軽度）および膣（粘液産生：軽度），ならびに雄の乳腺（小葉萎縮：軽微から重度）で認められた。休薬期間終了時には，20 mg/kg/日以上の投与群の雌の卵巣における黄体数減少および間質細胞増加を除いて上記の所見はみられず，回復性が示された。

ツカチニブの C_{max} および AUC_{12h} は，低用量では雄に比べて雌で高値であった。雌雄ともに，C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加し，試験 88 日の C_{max} および AUC_{12h} は試験 1 日の約 2～4 倍であった。試験 88 日の 6，20 および 60 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 105，864 および 6360 ng/mL であり，AUC_{12h} はそれぞれ 319，3700 および 41,100 ng•h/mL であった。

ONT-993 の C_{max} および AUC_{12h} の性差はツカチニブで認められたものよりも小さかった。曝露量はツカチニブの用量の増加に伴って増加した。ONT-993 の試験 1 日と試験 88 日の曝露量は同程度であり，蓄積はみられなかった。その結果，ツカチニブと ONT-993 の曝露比は概ね試験 1 日の方が試験 88 日よりも高く，また，雌に比べて雄で高かった。試験 88 日の 6，20 および 60 mg/kg/日群における ONT-993 の C_{max} はそれぞれ 6.41，15.1 および 25.7 ng/mL であり，AUC_{12h} はそれぞれ 32.6，116 および 181 ng•h/mL であった。

雌雄ラットにツカチニブを 0，6，20 または 60 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与したところ，いずれの用量でも忍容性は良好であった。6 mg/kg/日以上の雌で ALT および ALP の増加，小葉中心性肝細胞肥大，卵巣における黄体数減少，黄体嚢胞または間質細胞増加，子宮の萎縮ならびに膣の粘液産生が認められ，雄の乳腺で小葉萎縮がみられた。20 mg/kg/日以上の投与群では，網状赤血球数の増加，AST の増加（雌）および肝臓重量の増加（雌）が認められた。60 mg/kg/日群では，赤血球パラメータの減少，赤血球分布幅および網状赤血球数（雄）の増加，血小板数，好中球数および単球数の増加（雌），クレアチニン，クロールおよびリンの増加，子宮/子宮頸部（雌）および前立腺（雄）重量の減少がみられた。休薬期間終了時には雌の卵巣における黄体数減少および間質細胞増加を除いて上記の所見はみられず，回復性が示された。これらはいずれも毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。以上のことから，無毒性量は 60 mg/kg/日，STD10 は 60 mg/kg/日超と判断した。60 mg/kg/日群の試験 13 週における C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 6360 ng/mL および 41,100 ng•h/mL であった。

3.2. サル

3.2.1. サルを用いた 5 日間経口投与用量設定試験

試験報告書：JAY00097（参考），DM[redacted]-036，概要表：2.6.7.6.1，2.6.5.4.2

雄のカニクイザル（3 匹/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），60 または 120 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，30 または 60 mg/kg/回を 1 日 2 回，最終投与日のみ 1 日 1 回投与）で 5 日間経口投与し，ツカチニブの毒性およびトキシコキネティクスを評価した。投与期間終了後に 11 日間の休薬期間を設けた。

一般状態観察，体重および摂餌量測定ならびに臨床病理検査（血液学的検査および血液化学的検査）を行った。また，試験 1 日および 5 日にツカチニブの血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

60 mg/kg/日群ではいずれの評価項目にも毒性学的意義のある変化は認められなかった。

体重の変化はみられなかった。一般状態観察では，120 mg/kg/日群で投与期間から休薬期間にかけて嘔吐（投与期間のみ），眼瞼下垂，円背位および皮膚緊張低下が認められ，休薬期間にはさらに活動減少および摂餌量の減少がみられた。

臨床病理検査では，ツカチニブの投与に関連する変化として，120 mg/kg/日群で ALT（対照値の最大 8 倍），AST（対照値の最大 10 倍），乳酸脱水素酵素（LDH），ALP および TBIL の増加がみられ，肝細胞または肝胆道系への影響を示す可能性が考えられた。また，血中尿素窒素（BUN），クレアチニンおよびリンの増加は脱水と関連する変化，アルブミンの減少ならびにグロブリンおよび好中球数の増加は炎症に伴う変化と考えられた。好中球桿状核球およびデーレ小体が認められたことも，炎症性変化を示唆するものであった。ナトリウムおよびクロールの減少がみられ，嘔吐，脱水または腎臓への影響などで引き起こされる体液量の減少に伴う変化である可能性が考えられた。その他に，ヘモグロビン濃度の減少に加え，まれに網状赤血球数の減少が認められ，一般状態の悪化に関連する変化と考えられた。

以上のように，カニクイザルにツカチニブを 0，60 または 120 mg/kg/日の用量で 5 日間経口投与したところ，120 mg/kg/日群で一般状態の変化がみられたのに加え，一過性ではあるものの毒性学的意義のある臨床病理検査値の変化が認められたことに基づき，無毒性量は 60 mg/kg/日，HNSTD は 120 mg/kg/日と判断した。60 および 120 mg/kg/日の C_{max} はそれぞれ 4.46 および 13.4 µg/mL，AUC_t はそれぞれ 30.2 および 84.0 µg•h/mL であった。

3.2.2. サルを用いた 28 日間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験

試験報告書：JAY00093，概要表：2.6.7.7.3

雌雄カニクイザル（5 匹/性/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），20，60 または 90 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，10，30 または 45 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 28 日間経口投与し，ツカチニブの毒性およびトキシコキネティクスを評価した。各群 2 匹/性には 28 日間の休薬期間を設けて回復性を検討した。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，心電図測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。また，ツカチニブの血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

心電図測定，眼科学的検査ならびに臨床病理検査における血液凝固検査および尿検査では，いずれの用量においてもツカチニブ投与に関連する変化は認められなかった。

90 mg/kg/日群の全例および 60 mg/kg/日群の雌 1 例で体重または摂餌量の低値，円背位，嘔吐，皮膚緊張低下または脱水，活動減少もしくは水様便などの用量制限毒性が一般状態観察でみられたことから，試験 8 日～15 日に安楽殺した。同様の一般状態の変化は，予定剖検日まで生存した 60 mg/kg/日群の他の動物でも観察された。休薬期間中にこれらの所見はみられなくなった。

血液化学的検査では，60 および 90 mg/kg/日群の中途死亡例の最終採血日（試験 8～14 日）または生存例の試験 14 日の複数例に BUN の減少（15 mg/dL 未満）が認められた。試験 28 日では BUN の減少はみられず，変化は一過的なものと考えられた。また，60 mg/kg/日群の少数例の試験 14 日および 90 mg/kg/日群の最終採血日にアルブミン，総タンパク質およびアルブミン／グロブリン比（A/G 比）の減少がみられた（90 mg/kg/日群におけるこれらのパラメータの平均値は，対照群または投与前値と比較して 15～25%低値であった）。60 および 90 mg/kg/日群の中途死亡例の最終採血日（試験 8～14 日）ならびに生存例の試験 14 日および 28 日において，一部の動物で ALP の増加が認められた。これらの変化はカニクイザルの正常値の範囲内であったが，対照群および 20 mg/kg/日群ではみられなかったことから，ツカチニブ投与に関連する変化と考えられた。90 mg/kg/日群の最終採血日にトリグリセリドの増加が認められた。休薬期間終了時にこれらの変化はみられず，回復性が示された。

血液学的検査では，90 mg/kg/日群の多くの動物で最終採血日における白血球数および好中球数の増加（対照群の最高値より顕著に高値であった）が認められ，デーレ小体または好中球桿状核球もみられた。試験 28 日では，20 および 60 mg/kg/日群の一部の動物の好中球数が対照群の最高値よりも高値であった。これらの変化はいずれも休薬後にはみられなかった。

60 および 90 mg/kg/日群の中途死亡例の剖検において肝臓の脆弱化が認められ，概して肝細胞の腫脹/淡明化の病理組織学的所見を伴った。60 および 90 mg/kg/日群（中途死亡例および計画屠殺例）の肝臓重量の比体重値および比脳重量値は対照群に比べて高値であった。しかしながら，60 mg/kg/日群の計画屠殺例（試験 29 日に剖検）の肝臓に剖検所見および病理組織学的所見は認められなかった。

90 mg/kg/日群の雄 1 例および雌 2 例において，腎臓髄放線領域における尿細管上皮の再生像を伴う軽微な変性が認められた。60 および 90 mg/kg/日群のほとんどの動物で腎臓重量の比体重値が対照群に比べて高値であったが，病理組織学的変化がみられたのはこの 3 例のみであった。

休薬期間終了時には剖検所見および病理組織学的所見は認められず，臓器重量も対照群との明確な差異はみられなかった。

曝露量に性差は認められなかった。試験 1 日の 20，60 および 90 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 0.892，2.91 および 4.54 µg/mL であった。試験 28 日の 20 および 60 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 1.17 および 4.60 µg/mL であり，試験 1 日に比べて高値であった。試験 1 日の 20，60 および 90 mg/kg/日群の AUC_{12h} はそれぞれ 3.01，14.0 および 23.8 µg•h/mL であった。試験 28 日の 20 および 60 mg/kg/日群の AUC_{12h} はそれぞれ 5.22 および 26.4 µg•h/mL であり，それぞれ試験 1 日の 1.73 倍および 1.88 倍であった。C_{max} および AUC_{12h} は，いずれの測定日においても概ね用量の増加に伴って増加した。

以上のように，カニクイザルにツカチニブを 0，20，60 または 90 mg/kg/日の用量で 28 日間経口投与したところ，60 および 90 mg/kg/日群で一般状態の悪化（中途屠殺），血液学的検査および血液化学的検査値の変動，肝臓および腎臓重量（比体重値または比脳重量値）の増加が認められた。また，90 mg/kg/日群では，病理組織学的検査において肝臓（肝細胞の腫脹/淡明化）ならびに腎臓（尿細管上皮の変性）で所見がみられた。したがって，本試験におけるツカチニブの無毒性量および HNSTD は 20 mg/kg/日と考えられ，そのときの C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 1.17 µg/mL および 5.22 µg•h/mL であった。

3.2.3. サルを用いた 13 週間経口投与毒性試験および 28 日間回復性試験

試験報告書：8369685，概要表：2.6.7.7.4

雌雄カニクイザル（6 匹/性/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），5，20 または 40 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，2.5，10 または 20 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 13 週間経口投与し，ツカチニブの毒性およびトキシコキネティクスを評価した。各群 2 匹/性には 28 日間の休薬期間を設けて回復性を検討した。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，理学的検査，体温測定，心拍数および血圧測定，心電図測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。また，ツカチニブおよび ONT-993 の血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

5 mg/kg/日以上の投与群で糞便異常（赤色便，液状便，粘液便など）がみられた。40 mg/kg/日群ではこれに伴う変化として一過性の体重低値，削痩または血便が認められたことを踏まえ，40 mg/kg/日群でみられた糞便異常は毒性所見と判断した。主に試験の前半で，40 mg/kg/日群の雌雄各 3 例に対して獣医師の介入および抗生物質（アジスロマイシンまたはエンロフロキサシン）による治療を行ったところ，糞便異常は軽減した。休薬期間中に糞便異常は認められず，回復性が示された。

ツカチニブ投与による死亡はみられなかった。体重および摂餌量測定，理学的検査，体温および血圧測定ならびに眼科学的検査において，ツカチニブ投与に関連する変化は認められなかった。

5 mg/kg/日以上の投与群の雄で試験 2 日および 92 日に心拍数の上昇がみられたが，心電図測定での心拍数測定を含め，他の測定/検査で関連する変化がみられなかったことから毒性学的意義に乏しいと考えられた。

心電図測定では，PR 間隔，QRS 持続時間，QT 間隔，補正 QT（QTc）間隔および心拍数の変化はいずれの用量においても認められなかった。また，心電図の定性評価においても，ツカチニブ投与に起因する異常波形および不整脈は観察されなかった。

血液学的検査，血液凝固検査および尿検査においてツカチニブ投与の影響はみられなかった。試験 55 日または 93 日に 20 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で TBIL およびコレステロールの増加，雌でクレアチニンの増加がみられたが，いずれも軽微な変化で関連する他の所見が認められなかったことから毒性学的意義に乏しいと考えられた。これらの変化は休薬後にみられず，回復性が示された。

剖検および病理組織学的検査においてツカチニブ投与に関連する所見は認められなかった。40 mg/ kg/日群で肝臓重量の増加がみられた。TBIL の軽微な増加との関連性も考えられたが，剖検および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性学的意義に乏しい変化と判断した。休薬後に肝臓重量の増加はみられず，回復性が示された。

ツカチニブの C_{max} および AUC_{12h} に顕著な性差はみられなかった。曝露量は概ね用量比に伴って増加し，試験 91 日の曝露量は試験 1 日の最大 2 倍程度であった。5，20 および 40 mg/kg/日群の試験 91 日の C_{max}（雌雄合算値）はそれぞれ 36.1，139 および 1830 ng/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 145，557 および 9920 ng•h/mL であった。

ONT-993 の C_{max} および AUC_{12h} についても顕著な性差はみられなかった。曝露量は概ね用量比に伴って増加し，ツカチニブ反復投与による蓄積は認められなかった。5，20 および 40 mg/kg/日群の試験 91 日の ONT-993 の C_{max}（雌雄合算値）はそれぞれ 3.45，4.54 および 15.0 ng/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 6.96（雌のみ），21.5 および 103 ng•h/mL であった。

雌雄カニクイザルにツカチニブを 0，5，20 または 40 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与したところ，5 mg/kg/日以上の投与群で糞便異常および心拍数の増加が認められた。20 mg/kg/日以上の投与群では，TBIL，コレステロールおよびクレアチニンの軽微な増加がみられた。40 mg/kg/日群では，一過性の体重低値，削痩，血便（抗生物質による治療により症状は軽減した）および肝臓重量の増加が認められた。これらの所見は休薬によりいずれも回復性が示された。以上のように，40 mg/kg/日群において治療を要する糞便異常がみられたことから無毒性量は 20 mg/kg/日，HNSTD は 40 mg/kg/日と考えられた。20 および 40 mg/kg/日の C_{max} はそれぞれ 0.139 および 1.83 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 0.557 および 9.92 µg•h/mL であった。

4. 遺伝毒性試験

4.1. 細菌を用いた復帰突然変異試験

試験報告書：[redacted]，概要表：2.6.7.8.1

Salmonella typhimurium（TA98，TA100，TA1535，TA1537）および *Escherichia coli*（WP2 uvrA）を用い，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9）の存在下および非存在下で，ツカチニブの復帰突然変異誘発性の有無を検討した。プレート法を用い，用量設定試験および本試験を実施した。

用量設定試験は，ツカチニブを 1.5，5.0，15，50，150，500，1500 および 5000 µg/プレートの濃度で，各濃度につき 2 枚のプレートを用いて実施した。1500 µg/プレート以上で沈殿物が認められ，いずれの濃度においても顕著な細胞毒性はみられなかった。代謝活性化の有無にかかわらず，ツカチニブの変異原性はすべての試験菌株で陰性の基準に適合した。

用量設定試験の結果を受け，本試験はツカチニブを 50，150，500，1500 および 5000 µg/プレートの濃度で，各濃度につき 3 枚のプレートを用いて実施した。1500 µg/プレート以上で沈殿物が認められ，いずれの濃度においても顕著な細胞毒性はみられなかった。代謝活性化の有無にかかわらず，ツカチニブの変異原性はすべての試験菌株で陰性の基準に適合した。溶媒および陽性対照のデータから，代謝活性化系の存在下および非存在下において化学物質の変異原性を検出する本試験系の妥当性が実証された。

以上のように，本試験の条件下において，ツカチニブは代謝活性化の有無にかかわらず *Salmonella* 菌株 TA98，TA100，TA1535 および TA1537 ならびに *E.coli* 菌株 WP2 uvrA において遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。

4.2. マウスリンフォーマ TK 試験

試験報告書：[redacted]，概要表：2.6.7.8.2

マウスリンパ腫細胞（L5178Y/TK$^{+/-}$）を用いて，代謝活性化系（Aroclor 誘導ラット肝 S9）の存在下および非存在下でツカチニブの遺伝毒性を評価するマウスリンフォーマ TK 試験を実施した。用量設定試験および本試験［1 回目（4 時間曝露）および 2 回目（24 時間曝露）試験］を実施した。

用量設定試験のツカチニブの濃度は 0.5～4810 µg/mL とした。150 µg/mL 以上で沈殿物がみられた。ツカチニブ濃度に伴う浮遊細胞増殖率の変化および沈殿のプロファイルに基づいて本試験の濃度範囲を設定した。

本試験の 1 回目試験では，代謝活性化の存在下または非存在下で，ツカチニブを 10～150 µg/mL の濃度で細胞に 4 時間曝露したところ，50 µg/mL 以上で沈殿物が認められた。10，25，40 および 50 µg/mL の濃度範囲でクローニングを実施した結果，代謝活性化の有無にかかわらず，溶媒対照と比較した変異頻度は陽性の判断基準を下回った。

2 回目試験では，代謝活性化の非存在下で，ツカチニブを 0.5～25 µg/mL の濃度で細胞に 24 時間曝露したところ，いずれの濃度においても沈殿物は認められなかった。0.5，2.0，3.0，4.0 および 5.0 µg/mL の濃度範囲でクローニングを実施した結果，濃度依存的な変異頻度の増加が観察されたが，いずれの濃度においても溶媒対照と比較した変異頻度は陽性の判断基準を下回った。

陽性対照（メタンスルホン酸メチル）および溶媒対照におけるトリフルオロチミジン耐性コロニーの大きさは直径約 0.2～1.1 mm の範囲と定義した。陽性対照のコロニーの大きさに応じたコロニー数は想定の範囲内であり，試験系の妥当性が実証された。

以上のように，本試験の条件下でツカチニブは遺伝子突然変異誘発性を示さなかった。

4.3. マウス骨髄小核試験

試験報告書：[redacted]，概要表：2.6.7.9.1

マウス骨髄における小核を有する多染性赤血球を測定することで，ツカチニブの染色体異常誘発能および異数性誘発能の有無を評価した。用量設定試験および本試験を実施した。

用量設定試験では，ツカチニブを雄 ICR マウス（2 匹/群）に 1，10，100 または 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，雌雄マウス（5 匹/性）に 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。死亡例は認められなかった。10 および 1000 mg/kg 群の各 1 例と 2000 mg/kg 群の雄全例で立毛がみられたが，そのほかに状態の変化はみられなかったことから 2000 mg/kg を最大耐量と判断し，本試験の高用量として設定することとした。

本試験では，ツカチニブを雌雄 ICR マウス（5 匹/性/群）に 0（溶媒対照），500，1000 または 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与後 24 時間に大腿骨骨髄を採取した。また，陽性対照としてシクロホスファミドを 50 mg/kg の用量で単回経口投与して投与後 24 時間に大腿骨骨髄を採取した群（5 匹/性），ならびにツカチニブを 0（溶媒対照）または 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与後 48 時間に大腿骨骨髄を採取した群（5 匹/性/群）を別途設けた。採取した大腿骨骨髄を用いて骨髄塗抹標本を作製し，メイ・グリュンワルド・ギムザ染色で染色した。顕微鏡で多染性赤血球（PCE）を観察し，小核を有する PCE（MNPCE）を計数した。溶媒対照群と比較したツカチニブ投与群における MNPCE の発現（10,000 PCE 中の MNPCE 発現率）について，二項分布に基づく Kastenbaum-Bowman の数表により統計解析した。

試験期間中に死亡例はみられず，一般状態の変化も認められなかった。ツカチニブのいずれの用量群においても MNPCE の有意な発現率上昇はみられず，過去の溶媒対照群の背景データの範囲内であった。溶媒対照群および陽性対照群の MNPCE 発現率についても背景データの範囲内であり，当該試験系の妥当性が実証された。

以上のように，雌雄マウスにツカチニブを最大 2000 mg/kg の用量で単回経口投与したところ，死亡または毒性の臨床徴候は認められず，骨髄における MNPCE の発現率の有意な増加もみられなかった。したがって，ツカチニブはマウス骨髄小核試験において小核誘発性を示さなかった。

5. がん原性試験

ツカチニブのがん原性試験は実施していない。

6. 生殖発生毒性試験

6.1. 受胎能及び初期胚発生に関する試験

ツカチニブの受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施していない。

6.2. 胚・胎児発生に関する試験

ラットおよびウサギを用い，ツカチニブの胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験を実施した。以下に示すとおり，用量設定試験においてツカチニブの催奇形性が認められたことから，ICH S9 Q&A に従い本試験は実施しなかった。

6.2.1. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験

試験報告書：20160869，概要表：2.6.7.13.1

妊娠 SD ラット（6 匹/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），90，120 または 150 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，45，60 または 75 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で妊娠 7 日から 17 日まで経口投与し，胚・胎児発生への影響について評価した。また，各用量のサテライト群（6 匹/群とし，溶媒対照群のみ 3 匹/群とした）を設けて，トキシコキネティクスを評価した。

母動物の一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，卵巣および子宮の検査ならびに剖検に加え，ツカチニブおよび代謝物 ONT-993 の血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。また胎児について，体重測定，性別判定ならびに外表，内臓および骨格観察を実施した。

母動物において，ツカチニブ投与に関連する死亡および剖検所見はみられなかった。120 mg/kg/日以上の投与群で脱毛または被毛の薄化が認められた。体重への影響がみられ，妊娠 21 日における 90，120 および 150 mg/kg/日群の体重はそれぞれ溶媒対照群の 93%，89%および 85%であり，妊娠 7 日から 21 日までの体重増加量はそれぞれ溶媒対照群の 85%，73%および 66%であった。また，妊娠 7 日から 21 日までの 90，120 および 150 mg/kg/日群の摂餌量はそれぞれ溶媒対照群の 96%，85%および 73%であった。

卵巣および子宮の検査では，90 mg/kg/日以上の投与群において着床数，総胎児数および生存胎児数の減少，ならびに着床前後の胚損失率および吸収胚数の増加が認められた。

120 mg/kg/日以上の投与群では胎児体重の低値がみられ，骨格の変異として，後肢の足根骨および指骨，前肢の指骨および中足骨の平均骨化数の減少が認められた。外表および内臓観察では，ツカチニブ投与に関連する変化はみられなかった。

ツカチニブの C_{max} および AUC_{12h} は，妊娠 7 日および 17 日で用量の増加に伴って増加した。妊娠 7 日と 17 日の曝露量に顕著な違いはみられなかった。

ONT-993 の C_{max} および AUC_{12h} は，妊娠 7 日および 17 日ともに用量の増加に伴って増加した。いずれの用量でも妊娠 17 日の曝露量は妊娠 7 日に比べて低かった。ONT-993 の曝露量はツカチニブと比較して顕著に低かった。

以上のように，妊娠ラットにツカチニブを 0，90，120 または 150 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から 17 日まで経口投与したところ，母動物では 120 mg/kg/日以上の投与群で被毛への影響がみられ，90 mg/kg/日以上の投与群で体重，体重増加量および摂餌量の減少が認められた。90 mg/kg/日以上の投与群においてみられた着床数の減少は，着床前の胚損失率の増加ならびに総胎児数および生存胎児数の減少をもたらした。また，90 および 150 mg/kg/日群でみられた吸収胚数の増加は着床後の胚損失率の増加をもたらした。胚・胎児では，120 mg/kg/日以上の投与群において胎児の体重の低値および骨格の変異（後肢の足根骨および指骨，前肢の指骨および中足骨の平均骨化数の減少）が認められたが，外表および内臓の異常はみられなかった。無毒性量は，母動物については求めることができず，胚・胎児については 90 mg/kg/日と考えられた。また，母動物の HNSTD は 150 mg/kg/日と判断した。母動物の妊娠 17 日における 90 および 150 mg/kg/

日の C_{max} はそれぞれ 2420 および 9550 ng/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 16,400 および 60,600 ng•h/mL であった。

6.2.2. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験

試験報告書：20144956，概要表：2.6.7.13.2

妊娠 NZW ウサギ（6 匹/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），60，90，120 または 150 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，30，45，60 または 75 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で妊娠 7 日から 19 日まで経口投与し，胚・胎児発生への影響について評価した。また，トキシコキネティクスを評価した。

母動物の一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，卵巣および子宮の検査ならびに剖検に加え，ツカチニブの血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。また胎児について，体重測定，性別判定ならびに外表，内臓および骨格観察を実施した。

母動物について，ツカチニブ投与に関連する死亡，一般状態の変化および剖検所見はみられなかった。120 mg/kg/日以上の投与群で体重，体重増加量および摂餌量の減少が認められ，毒性変化と判断した。60 および 90 mg/kg/日群では摂餌量の減少が認められたが，体重への影響はみられなかった。

卵巣および子宮の検査では，90 mg/kg/日以上の投与群において後期吸収胚，総吸収胚および着床後損失率の増加ならびに生存胎児数および雄胎児率の減少が認められた。

外表および内臓観察では 90 mg/kg/日以上の投与群でドーム状頭部および脳室拡張がみられ，骨格観察では 90 および 120 mg/kg/日群において頭蓋骨前頭骨および頭頂骨の骨化不全および頭頂部の大泉門開大が認められた。骨化数に対する影響はみられなかった。150 mg/kg/日群で骨格変異が認められなかったのは，生存胎児数が少なかったことに起因する可能性が考えられた。

ツカチニブの C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加した。妊娠 7 日と比較して妊娠 19 日の曝露量は高く，蓄積比は用量依存的に増加した。

以上のように，妊娠ウサギにツカチニブを 0，60，90，120 または 150 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から 19 日まで経口投与したところ，120 mg/kg/日以上の投与群で体重，体重増加量および摂餌量の減少が認められた。卵巣および子宮の検査では，90 mg/kg/日以上の投与群において後期吸収胚，総吸収胚および着床後損失率の増加がみられ，それらに関連して生存胎児数および雄胎児率の減少が認められた。胎児の異常として，90 mg/kg/日以上の投与群で，ドーム状頭部，脳室拡張，頭蓋骨前頭骨および頭頂骨の骨化不全および頭頂部の大泉門開大がみられた。これらの結果に基づき無毒性量は，母動物については 90 mg/kg/日，胚・胎児については 60 mg/kg/日と判断した。また，母動物の HNSTD は 150 mg/kg/日と考えられた。母動物の妊娠 19 日における 60，90 および 150 mg/kg/日の C_{max} はそれぞれ 706，2030 および 5860 ng/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 1640，6100 および 25,900 ng•h/mL であった。

6.3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ツカチニブの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施していない。

7. 局所刺激性試験

ツカチニブの局所刺激性試験は実施していない。なお，安全性薬理試験の一環としてツカチニブの胃刺激性を検討した試験については，CTD 2.6.2.4.7 項に示した。

8. その他の毒性試験

8.1. 光安全性試験

8.1.1. In vitro 光毒性試験

試験報告書：MB [redacted]-24471.30，概要表：2.6.7.17.4

紫外線 A（UVA）の照射下および非照射下において，3T3 細胞に対するツカチニブおよび ONT-993 の細胞毒性および光毒性を評価した。

Hanks 緩衝生理食塩液（1%DMSO）中にツカチニブまたは ONT-993 をそれぞれ 31.6 または 100 µg/mL の濃度に溶解した溶液を用いて紫外可視光吸光度スキャンを行った。いずれも 315～400 nm に吸収を認め，潜在的な光毒性が示唆された。3T3 細胞を播種した 2 枚のウェルプレートにそれぞれ各被験物質（濃度を 8 段階希釈）または陽性対照（クロルプロマジン）を添加して 1 時間プレインキュベートした。1 枚のウェルプレートに対して 5 J/cm^2 のエネルギー密度で SSL 照射し，もう 1 枚のウェルプレートは光照射せずに暗所に保持した。処理培地を培養培地に置き換え，約 24 時間後，3 時間のニュートラルレッド取り込みにより細胞生存率を測定して細胞毒性の 50%効果濃度（EC_{50} 値）を算出し，Photo-Irritant Factor（PIF 値）を求めた。

その結果，ツカチニブおよび ONT-993 の PIF 値はそれぞれ 7.3 および 8.4 であり，いずれも光毒性を有する可能性が示された。なお，クロルプロマジンの PIF 値は 36.0 であった。

8.1.2. In vivo 光毒性試験

試験報告書：20129137，概要表：2.6.7.17.5

雌 Long-Evans 有色ラット（5 匹/群）にツカチニブを 0（溶媒対照），6，20 または 60 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，3，10 または 30 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 3 日間経口投与し，最終投与後 90 分にキセノンランプで UVA，UVB および可視光を照射して，ツカチニブの眼および皮膚における光毒性を評価した。UV 非照射群として，ツカチニブを 60 mg/kg/日の用量で同様に投与し，UV を照射しない群を設けた（5 匹/群）。また，各用量のサテライト群（8 匹/群とし，溶媒対照群のみ 3 匹/群とした）を設けた。

一般状態，死亡の有無および皮膚反応の観察，体重測定，眼科学的検査ならびに眼の病理組織学的検査を実施した。また，サテライト群の血漿中ツカチニブ濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。

ツカチニブ投与に関連する死亡および一般状態の変化は認められなかった。UV 曝露による体重増加への影響はみられなかった。なお，30 mg/kg/日を投与した UV 照射群および非照射群で共に体重増加量の軽微な減少が試験 1～4 日および試験 1～7 日に認められた。

皮膚反応観察，眼科学的検査および眼の病理組織学的検査において，ツカチニブ投与に関連する変化はみられなかった。

以上のように，本試験においてツカチニブの光毒性は認められず，無影響量は 60 mg/kg/日と判断した。60 mg/kg/日を 5 回目投与後の C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 6300 ng/mL および 28,300 ng•h/mL であった。

8.2. 不純物の毒性試験

8.2.1. [redacted] のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験

試験報告書：1451-008，概要表：2.6.7.17.1

[redacted] はツカチニブの[redacted]分解物である。毒性試験で用いたツカチニブのロットにおける [redacted] の含有量が少量であったことから，雌雄 SD ラット（10 匹/性/群）に [redacted] を 0（溶媒対照），0.620，1.86 または 6.20 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，0.310，0.930 または 3.10 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 28 日間経口投与し，[redacted] の毒性を評価した。投与量は，[redacted] のヒト等価用量の 1 倍，3 倍および 10 倍とした。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。

いずれの観察，測定および検査においても [redacted] 投与に関連する変化は認められなかった。以上のことから本試験における [redacted] の無影響量は 6.20 mg/kg/日と判断した。

8.2.2. [redacted] のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験

試験報告書：1019-066，概要表：2.6.7.17.2

[redacted] はツカチニブの[redacted]不純物である。毒性試験で用いたツカチニブのロットにおける [redacted] の含有量が少量であったことから，雌雄 SD ラット（10 匹/性/群）に [redacted] を 0（溶媒対照），0.186，0.558 または 1.86 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，0.0930，0.279 または 0.930 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 28 日間経口投与し，[redacted] の毒性を評価した。投与量は，[redacted] のヒト等価用量の 1 倍，3 倍および 10 倍とした。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。

いずれの観察，測定および検査においても [redacted] 投与に関連する変化は認められなかった。以上のことから本試験における [redacted] の無影響量は 1.86 mg/kg/日と判断した。

8.2.3. [redacted] のラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験

試験報告書：1019-074，概要表：2.6.7.17.3

[redacted] はツカチニブの[redacted]不純物である。毒性試験で用いたツカチニブのロットにおける [redacted] の含有量が少量であったことから，雌雄 SD ラット（10 匹/性/群）に [redacted] を 0（溶媒対照），0.247，0.741 または 2.47 mg/kg/日の用量（それぞれ 0，0.1235，0.3705 または

1.2350 mg/kg/回を 1 日 2 回，約 12 時間間隔）で 28 日間経口投与し，[redacted] の毒性を評価した。投与量は，[redacted] のヒト等価用量の 1 倍，3 倍および 10 倍とした。

一般状態および死亡の有無の観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，臨床病理検査（血液学的検査，血液化学的検査，血液凝固検査および尿検査），剖検，臓器重量測定ならびに病理組織学的検査を行った。

いずれの観察，測定および検査においても [redacted] 投与に関連する変化は認められなかった。以上のことから本試験における [redacted] の無影響量は 2.47 mg/kg/日と判断した。

9. 考察及び結論

9.1. ラットおよびカニクイザルにおける用量制限毒性

ラットを用いた単回投与毒性試験では，ツカチニブを最高 300 mg/kg の用量で単回投与したときの忍容性が示された。ラットおよびカニクイザルを用いた反復投与毒性試験では，ツカチニブを 1 日 2 回経口投与した。これらの試験における用量制限毒性は，死戦期を招いた重篤な状態悪化および消化管への影響であり，これらの所見に基づいてツカチニブの忍容性を判断した。ラットを用いた 13 週間投与毒性試験では，高用量である 60 mg/kg/日の忍容性は良好で，無毒性量は 60 mg/kg/日，STD10 は 60 mg/kg/日超と判断した。また，カニクイザルを用いた 13 週間投与毒性試験における無毒性量は 20 mg/kg/日，HNSTD は高用量の 40 mg/kg/日と判断した。ラット 60 mg/kg/日およびカニクイザル 40 mg/kg/日の C_{max} はそれぞれ 6.36 および 1.83 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 41.1 および 9.92 µg•h/mL であった。忍容性が示された用量でのツカチニブ投与に起因する変化として，臨床病理検査値の軽微な変化，体重低値，臓器重量増加ならびに肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）における病理組織学的変化がみられた。ラットまたはカニクイザルの 28 日間投与毒性試験では，忍容性が得られなかった用量群の中途死亡例において消化管（ラット）または肝臓（カニクイザル）に病理組織学的変化が認められた。

9.2. 毒性試験で認められたツカチニブの標的臓器

ラットまたはカニクイザルを用いた試験における消化管毒性を示す一般状態の変化として糞便異常などが認められ，時には他の状態悪化を示す臨床徴候を伴っていた。これらの変化は概して体重低値または体重増加量の減少と関連していた。消化管毒性に関する一般状態の変化がみられた動物のうち，計画屠殺例では病理組織学的所見はみられず，また，一般状態の変化については休薬による回復性が示された。一方，ラットの忍容性が得られなかった用量群の中途死亡例では，腸管のびらん/潰瘍が認められた。

ラットおよびカニクイザルにおいて，それぞれ 6 mg/kg/日以上および 20 mg/kg/日以上の投与群で肝細胞または肝胆道系への影響を示唆する変化が認められた。忍容性が示された用量では，血清肝機能マーカー（TBIL，AST，ALT など：概ね 2.5 倍以下）および肝臓重量の増加ならびに小葉中心性肝細胞肥大がみられた。カニクイザルを用いた 28 日間投与毒性試験では，忍容性が示されなかった 60 および 90 mg/kg/日群において，中途死亡例の剖検では肝臓の脆弱化が認められ，病理組織学的検査では肝細胞の腫脹/淡明化が認められた一方で，血清肝機能マーカーに変化はみられなかった。ラットおよびカニクイザルのいずれの毒性試験においても，カニクイ

ザルの中途死亡例を除いて肝細胞の損傷を示す病理組織学的変化（変性，炎症，壊死など）は認められなかった。

ラットを用いた 28 日間および 13 週間投与毒性試験において，雌の生殖器ならびに雄の乳腺および前立腺の変化が観察された。その所見として，子宮萎縮，膣の粘液産生，黄体の変化，乳腺小葉萎縮（雄），ならびに生殖器の臓器重量減少（子宮/子宮頸部および前立腺）がみられた。休薬期間を経て，20 mg/kg/日以上の投与群の雌における卵巣の所見が回復傾向にとどまったのを除き，病理組織学的所見は回復した。カニクイザルでは生殖器への影響は認められなかった。

ラットまたはウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験において，胚・胎児毒性がみられた。ラットでは母動物で毒性（体重および体重増加量および摂餌量の減少）がみられた 90 mg/kg/日よりも高い用量である 120 mg/kg/日以上で胚・胎児毒性（着床数，総胎児数および生存胎児数の減少，着床前後の胚損失率および吸収胚数の増加，骨格変異）が認められた。ウサギでは母動物において顕著な毒性がみられなかった一方で，90 mg/kg/日以上の用量で胚・胎児毒性として外表，内臓および骨格の奇形または変異が認められた。このようにツカチニブはウサギに対して催奇形性を示し，この時の曝露量は臨床曝露量と同程度であった。

In vitro および in vivo 遺伝毒性試験においてツカチニブは遺伝毒性を示さなかった。In vitro 光毒性試験ではツカチニブが光毒性を有する可能性が示されたが，その後の有色ラットを用いた in vivo 光毒性試験では，皮膚反応観察，眼科学的検査および眼の病理組織学的検査で変化はみられず，ツカチニブの光毒性は認められなかった。

[redacted]分解物 [redacted]，[redacted]不純物 [redacted] および[redacted]不純物 [redacted] の in silico 評価の結果，遺伝毒性のアラートは示されなかった。また，それぞれを被験物質とした 28 日間投与毒性試験において毒性変化はみられなかった。

9.3. トキシコキネティクスの評価

ラット，ウサギまたはカニクイザルの毒性試験においてツカチニブまたは ONT-993 の血漿中濃度を測定し，トキシコキネティクスを評価した。ツカチニブの C_{max} および AUC は，用量の増加に伴って増加し，多くの試験で投与初日と最終投与後の曝露量を比較すると蓄積が認められた。雄の曝露量は概して雌と同等または雌に比べて低値であった。ONT-993 の曝露量はツカチニブと比較して顕著に低かった。13 週間投与毒性試験のラットの STD10 およびカニクイザルの HNSTD におけるツカチニブの C_{max} はそれぞれ 6.36 および 1.83 µg/mL，AUC_{12h} はそれぞれ 41.1 および 9.92 µg•h/mL であった（Table 2）。なお，ヒトに本申請の用量である 300 mg を 1 日 2 回経口投与したときの C_{max} および AUC_{12h} はそれぞれ 0.667 µg/mL および 3.47 µg•h/mL であった。

9.4. 結論

ツカチニブの毒性試験として，ラットを用いた単回投与毒性試験，ラットおよびカニクイザルを用いた反復投与毒性試験，ラットおよびウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（用量設定試験）ならびに遺伝毒性および光毒性を評価した in vitro および in vivo 試験を実施した。また，ツカチニブの[redacted]分解物（[redacted]），[redacted]不純物（[redacted]）および[redacted]不純物（[redacted]）のラットを用いた反復投与毒性試験をおこなった。ツカチニブの毒性プロファイルはこれら一連の非臨床試験により十分に明らかにされた。ラットおよびサルにお

ける用量制限毒性として，死戦期を招いた重篤な状態悪化または消化管毒性を示唆する一般状態変化がみられた。標的臓器として消化管，肝臓，生殖器（雌ラット），骨格筋および乳腺（雄ラット）が特定された。ツカチニブは遺伝毒性および光毒性を示さなかった。一方で，ツカチニブの投与に関連する胚・胎児毒性が認められた。ツカチニブの分解物/不純物の毒性はみられなかった。以上のように，ツカチニブの毒性は適切に特徴付けられており，概ね作用機序から予想された変化，または他の抗 HER2 薬の毒性プロファイルと一致していた。認められた所見の回復性や臨床での管理可能性も鑑み，以上の毒性試験成績は，ツカチニブの臨床使用を裏付けるものと考えられた。

10. 図表

図表は本文中または概要表に示した。

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW 3
2.6.7.2 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES 5
2.6.7.3 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA 5
2.6.7.4 TOXICOLOGY: DRUG SUBSTANCE 5
2.6.7.5 SINGLE-DOSE TOXICITY 6
2.6.7.6 REPEAT-DOSE TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES 7
2.6.7.6.1 A Dose-Range Finding Study of AR00432380 Administered by Gavage to Cynomolgus Monkeys 7
2.6.7.7 REPEAT-DOSE TOXICITY: PIVOTAL STUDIES 11
2.6.7.7.1 28-Day Repeat-Dose Oral Toxicity Study of ARRY-432380 in Rats Followed by a 4-Week Recovery 11
2.6.7.7.2 13-Week Good Laboratory Practices (GLP) Twice Daily Oral Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Sprague Dawley Rats Followed by a 28-Day Recovery 15
2.6.7.7.3 A 28-Day Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Cynomolgus Monkeys Followed by a 28-Day Recovery 21
2.6.7.7.4 A 13-Week Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Cynomolgus Monkeys Followed by a 28-Day Recovery 28
2.6.7.8 GENOTOXICITY: IN VITRO 30
2.6.7.8.1 Bacterial Reverse Mutation Assay (Ames Test) with Tucatinib 30
2.6.7.8.2 In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test 33
2.6.7.9 GENOTOXICITY: IN VIVO 36
2.6.7.9.1 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test 36
2.6.7.10 CARCINOGENICITY 38
2.6.7.11 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES 38
2.6.7.12 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION 38
2.6.7.13 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT 39
2.6.7.13.1 An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rats 39
2.6.7.13.2 An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rabbits 43
2.6.7.14 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – EFFECTS ON PRE- AND POSTNATAL DEVELOPMENT, INCLUDING MATERNAL FUNCTION 45
2.6.7.15 STUDIES IN JUVENILE ANIMALS 45
2.6.7.16 LOCAL TOLERANCE 45
2.6.7.17 OTHER TOXICITY STUDIES 46
2.6.7.17.1 [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats 47

2.6.7.17.2 [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats 48
2.6.7.17.3 [redacted]: A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats 49
2.6.7.17.4 In Vitro Phototoxicity Study in Balb/c 3T3 Cells 50
2.6.7.17.5 In Vivo Phototoxicity Study of Tucatinib in Pigmented Rats 51

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Tucatinib[a]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)[a]	GLP	Testing Facility	Study Number
Single-Dose Toxicity							
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	1 day	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted]	1140-027
Repeat-Dose Toxicity							
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	28 days	0, 20, 60, 200/120	Yes	[redacted]	1140-028
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	13 weeks	0, 6, 20, 60	Yes	[redacted]	8369684
	Cynomolgus Monkeys	Oral gavage	5 days	0, 60, 120	No	[redacted]	JAY00097
	Cynomolgus Monkeys	Oral gavage	28 days	0, 20, 60, 90	Yes	[redacted]	JAY00093
	Cynomolgus Monkeys	Oral gavage	13 weeks	0, 5, 20, 40	Yes	[redacted]	8369685
Genotoxicity							
Bacterial reverse mutation	*S typhimurium* tester strains TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *E coli* tester strain WP2 *uvr*A	In vitro	–	0, 50, 150, 500, 1500, and 5000 µg per plate	Yes	[redacted]	[redacted]
mouse lymphoma Tk gene mutation	L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells	In vitro	–	0, 10, 25, 40, and 50 µg/mL	Yes	[redacted]	[redacted]
Micronucleus	ICR Mice	Oral gavage	Single dose	0, 500, 1000, 2000	Yes	[redacted]	[redacted]
Carcinogenicity							
Not Applicable	–	–	–	–	–	–	–

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Tucatinib[a]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)[a]	GLP	Testing Facility	Study Number
Reproductive and Developmental Toxicity							
Embryo-fetal development							
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	11 days	0, 90, 120, 150	Yes	[redacted]	20160869
	New Zealand White Rabbits	Oral gavage	13 days	0, 60, 90, 120, 150	Yes	[redacted]	20144956
Local Tolerance							
Not Applicable	–	–	–	–	–	–	–
Other Toxicity Studies							
Impurity studies							
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	28 days	[redacted] ([redacted]) at 0, 0.620, 1.860, 6.2	Yes	[redacted]	1451-008
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	28 days	[redacted] ([redacted]) at 0, 0.186, 0.558, 1.86	Yes	[redacted]	1019-066
	Sprague Dawley Rats	Oral gavage	28 days	[redacted] at 0, 0.247, 0.741, 2.47	Yes	[redacted]	1019-074
Phototoxicity studies							
	BALB/c 3T3 cells	In vitro	NA	Tucatinib: 0, 2.15-147 µg/mL, ONT-993: 0, 6.81-464 µg/mL	Yes	[redacted]	MB [redacted]-24471.30
	Long-Evans Rats	Oral gavage	6 doses over 4 days, every 12 hours	0, 6, 20, 60	Yes	[redacted]	20129137

Abbreviation: GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable. Underlined dose level indicates no-observed-adverse-effect-level.
a Unless otherwise indicated.

2.6.7.2 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES

See CTD 2.6.4.3.3

2.6.7.3 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA

See CTD 2.6.5.4.3 and CTD 2.6.5.4.4

2.6.7.4 TOXICOLOGY: DRUG SUBSTANCE

Table 1: Tucatinib Drug Information

INN	tucatinib
USAN	tucatinib
Chemical name:	N^4-(4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-7-yloxy)-3-methylphenyl)-N^6-(4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol-2-yl)quinazoline-4,6-diamine
Company codes:	AR00432380, ARRY-432380, ARRY-380, ONT-380, SGD-7715
CAS registry number	937263-43-9
KEGG Number	D11141
Molecular formula	$C_{26}H_{24}N_8O_2$
Molecular weight	480.52 g/mol

2.6.7.5 SINGLE-DOSE TOXICITY

Test Article: Tucatinib[a]

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Doses[b] (mg/kg/dose)	Number/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Rat/Sprague Dawley	Oral gavage, QD, 5 mL/kg/dose (0.5% sodium carboxy methylcellulose & 0.1% Poloxamer 188 in deionized water (w/v), pH 7/ Suspension) Lot [redacted]	0, 30, 100, 300	10F/10M & 6M[c]/6F[c]	NA	**30 mg/kg**: Unscheduled death[d]. **≥100 mg/kg**: ↓ red cell mass[e], ↑ cholesterol[e], ↑ glucose[e], ↑ mononuclear infiltrates and/or myofiber degeneration/necrosis in soleus skeletal muscle (M). **300 mg/kg:** ↑ food consumption, ↑ total bilirubin[e], ↑ liver weights (F), lymphoid depletion in lymph nodes, thymus gland and spleen (F).	1140-027/ Yes

Toxicokinetic Parameters (Combined Sexes[f]):

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
C_{max} (µg/mL)	NA[g]	1.60	9.19	35.2
AUC_{24} (µg•h/mL)	NA[g]	7.47	94.8	424

AUC_{24} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not available; NOAEL = no observed adverse effect level; QD = once daily; TK = toxicokinetics.
a. Tucatinib is also known as ARRY-432380.
b. All doses are expressed as mg of active test article moiety per kg of body weight.
c. Animals designated for TK evaluations.
d. One male was found dead prior to study completion. The cause of death of this animal was not apparent microscopically. Death of this animal was not considered to be related to test article administration.
e. Day 2 only, resolved by Day 14.
f. 6 animals/ sex/group.
g. A toxicokinetic control group was not included in the study design.

2.6.7.6 REPEAT-DOSE TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES

2.6.7.6.1 A Dose-Range Finding Study of AR00432380 Administered by Gavage to Cynomolgus Monkeys

Test Article: AR00432380

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing:** Days 1 through 5 (AR00432380)[a]	**Study No.:** JAY00097
Initial Age: 2.8 to 4.3 years	**Duration of Postdose:** None	**Report Title:** A Dose-Range Finding Study of AR00432380 Administered by Gavage to Cynomolgus Monkeys
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (Nasal Gavage)	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** Control	
	Article: 30% Captisol®; Lot No. [redacted]	**GLP Status:** No
No Observed Adverse Effect Level: 60 mg/kg/day		

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0 (Control)	60	120
Number of Animals[b] Dose Session A: Days 1-5 (AR00432380)[a]	M/3	M/3	M/3
Toxicokinetics[c]			
Noteworthy Findings			
Unscheduled Euthanasia	0	0	0
Clinical Observations and Qualitative Food Consumption[d]			
Dose Session A: Days 1-5; Days 6-16			
Emesis	–	–	3 (3); 0 (0)
Decreased skin turgor	–	–	1 (1); 1 (4)
Decreased activity	–	–	0 (0); 3 (4)
Sunken eyes (right and left)	–	–	1 (1); 1 (2)
Hunched appearance	–	–	2 (2); 2 (3)
Reduced food consumption	–	–	0 (0); 3 (4)
Body Weight	–	–	–

Study Number: JAY00097 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0 (Control)	60	120
Number of Animals[b] Dose Session A: Days 1-5 (AR00432380)[a]	M/3	M/3	M/3
Clinical Chemistry[e,f]			
Albumin (g/dL)			
Prestudy[g]	–	–	3.30
Day 10	–	–	2.60
Day 13	–	–	2.80
Day 15	NS	NS	[2.5; 2.9; 2.9]
Day 16	–	–	2.80
Blood Urea Nitrogen (mg/dL)			
Prestudy[g]	–	–	21.7
Day 5	–	–	61.0
Creatinine (mg/dL)			
Prestudy[g]	–	–	0.73
Day 5	–	–	2.83
Phosphorus (mg/dL)			
Prestudy[g]	–	–	[6.0]
Day 5	–	–	[11.4]
Sodium (mEq/L)			
Prestudy[g]	–	–	[147; 149]
Day 5	–	–	[138; 138]
Chloride (mEq/L)			
Prestudy[g]	–	–	[111; 116]
Day 5	–	–	[88; 98]

Study Number: JAY00097 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0 (Control)	60	120
Number of Animals[b] Dose Session A: Days 1-5 (AR00432380)[a]	M/3	M/3	M/3
Alanine Aminotransferase (U/L)			
Prestudy[g]	–	–	[25]
Day 10	–	–	[208]
Aspartate Aminotransferase (U/L)			
Prestudy[g]	–	–	[30]
Day 10	–	–	[293]
Total Bilirubin (mg/dL)			
Prestudy[g]	–	–	0.50
Day 1	–	–	0.73
Day 5	–	–	1.30*
Lactate Dehydrogenase (U/L)			
Prestudy[g]	–	–	[317]
Day 10	–	–	[1302]
Alkaline Phosphatase (U/L)			
Prestudy[g]	–	–	[397]
Day 5	–	–	[602]
Hematology[e,f]			
Hemoglobin (g/dL)[h]			
Prestudy[g]	–	–	13.00
Day 10	–	–	10.63
Day 13	–	–	10.87
Day 15	NS	NS	[10.3; 11.6; 11.7]
Day 16	–	–	10.97

Abbreviations: –=no Noteworthy Findings; *=ANOVA with Dunnett's/Dunn's (P≤0.05); GLP=Good Laboratory Practice; M=male; NS=no samples available for analysis.

a Animals in Dose Session A were dosed via nasal gavage (2 mL/kg/dose) twice daily (12 hours ± 30 minutes) at 0, 30, and 60 mg/kg/dose. AR00432380 was administered twice daily for 4 consecutive days (Days 1-4) for a total dose of 0, 60, and 120 mg/kg/day, respectively, and once on the fifth day (Day 5, a.m. only).

b After the last samples were collected, the animals were returned to the Testing Facility animal colony.

c Plasma samples were collected prior to dose and 1, 2, 4, 8 and 12 hours after the first daily (a.m.) dose on Days 1 and 5 and forwarded to the Sponsor who elected to report the bioanalytical or toxicokinetic data separately.

d Number of animals (number of incidences) are shown for the dose phase Days 1-5 and off-dose phase Days 6-16. Only one incidence was counted per animal per day.

e Group means are shown except where absolute values for individual noteworthy animals are shown in brackets. Prestudy data included for reference.

f Some findings may have been impacted by the clinical observations of dehydration and emesis.

g Prestudy data shown represents Day -1 for Groups 1-3.

h One of the three 60 mg/kg/day males also had a lower reticulocyte count during most of the time period noted for hemoglobin changes (Days 10 to 16), indicating a lack of response to decreased red cell mass. The low reticulocyte count may have been related to the poor clinical condition of this animal. On Day 10 this animal had increased white blood cell counts (neutrophils, bands and monocytes) and Döhle bodies (also present on Day 5 for the other 2 animals in this group). These changes to white blood cells were consistent with inflammation, and counts returned to or below baseline by Day 16. By Day 15, the low red blood cell mass was only partially recovered and the leukocyte changes were fully recovered.

2.6.7.7 REPEAT-DOSE TOXICITY: PIVOTAL STUDIES

2.6.7.7.1 28-Day Repeat-Dose Oral Toxicity Study of ARRY-432380 in Rats Followed by a 4-Week Recovery

Report Title: 28-Day Repeat-Dose Oral Toxicity Study of ARRY-432380 in Rats Followed by a 4-Week Recovery **Test Article: ARRY-432380**
Species/Strain: Rats/Crl:CD (SD) **Duration of Dosing:** 28 days **Study Number:** 1140-028
Initial Age: Approximately 6 weeks at receipt **Duration of Postdose:** 28 days
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] **Method of Administration:** Oral gavage **GLP Compliance:** Yes
Vehicle: 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC, sodium salt, medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in water, pH 7
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day) [a]	0	20	60	200/120[b]	0	20	60	200/120[b]
Number of TK Animals	9	9	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics[c]:								
C_{max} (µg/mL)								
Day 1	–	0.394	3.34	14.4	–	1.19	5.49	19.9
Day 27	–	0.508	4.78	9.37	–	1.32	7.27	9.41
AUC_{12h} (µg·h/mL)								
Day 1	–	0.846	3.76	74.9	–	1.68	18.9	117
Day 27	–	2.32	27.0	62.8	–	4.35	33.6	92.4
Number of Main Study Animals	15	15	15	15	15	15	15	15
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[d]	0	0	0	8	0	0	0	9
Clinical Observations[e]								
Activity decreased	0/0	0/0	0/0	8/8	0/0	0/0	0/0	10/9
Righting reflex lost	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Feces few/absent	0/0	0/0	0/0	10/8	0/0	0/0	0/0	11/11
Feces mucoid	0/0	0/0	0/0	6/6	0/0	0/0	0/0	7/7
Feces soft	0/0	0/0	0/0	4/2	0/0	0/0	0/0	3/1
Feces watery	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	2/2
Emaciated	0/0	0/0	0/0	9/9	0/0	0/0	0/0	11/11
Posture hunched	0/0	0/0	0/0	10/10	0/0	0/0	0/0	5/5
Thin	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	3/3
Hair absent	0/0	5/2	13/3	4/2	20/4	1/1	8/1	56/6

Study Number: 1140-028 (Continued)

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day) [a]	0	20	60	200/120[b]	0	20	60	200/120[b]
Hair discolored, Brown	0/0	0/0	0/0	6/5	0/0	0/0	0/0	8/6
Breathing difficulties	0/0	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	2/2
Skin cold to touch	0/0	0/0	0/0	10/9	0/0	0/0	0/0	6/6
Body Weight[f] (g) (%)								
Day 7	249.2	+2	0	-31**	189.2	-3	-2	-30**
Day 14	267.5	+2	-1	-24*	189.5	-4	-4	-25**
Day 21	336.9	+1	-1	-14**	229.5	-5*	-4	-14**
Day 28	372.7	+1	-2	-15**	245.9	-5	-5	-24**
Food Consumption[f] (g/animal/day) (%)								
Days 1→7	24.1	-2	-1	-65**	17.6	-3	-8*	-75**
Days 7→14	23.0	0	+1	-26	16.5	-3	-7	-20**
Days 14→21	26.9	+1	-2	0	19.6	-4	-3	+2
Days 21→28	26.6	+1	-2	-18*	19.0	-2	-8	-37*
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology[g]								
Erythrocytes (10^6/μL) (Day 29)	8.333	8.223	8.239	7.824*	8.273	8.031	8.093	8.382
Hemoglobin (g/dL) (Day 29)	16.47	16.54	16.21	15.47*	16.31	16.04	16.11	16.72
Neutrophils (10^3/μL) (Day 29)	2.027	2.095	3.023	4.240*	1.257	1.648	1.850*	4.593**
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry[g]								
Calcium (mg/dL)								
Day 14	10.03	10.02	9.93	9.56**	9.89	9.83	9.99	10.25*
Day 29	9.79	9.72	9.67	9.10**	9.84	9.73	10.11*	8.92
ALP (U/L)								
Day 14	262.7	245.3	290.3	255.7	164.7	149.7	164.8	199.2
Day 29	199.7	184.1	209.1	212.4	119.9	105.1	125.0	165.5**
Total bilirubin (mg/dL)								
Day 14	0.14	0.13	0.13	0.20*	0.11	0.11	0.14*	0.20**
Day 29	0.15	0.16	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.23*

Study Number: 1140-028 (Continued)

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day) [a]	0	20	60	200/120[b]	0	20	60	200/120[b]
GGT (U/L)								
Day 14	1.1	1.0	1.1	1.7	1.3	1.3	1.3	2.0*
Day 29	1.3	1.3	1.3	2.1*	1.7	1.7	2.0	3.2
Sorbitol Dehydrogenase (U/L)								
Day 14	6.65	7.79	7.89	11.87*	6.57	7.89	7.61	11.95**
Day 29	6.03	5.79	6.01	5.34	6.19	6.07	6.66	11.73
Cholesterol (mg/dL)								
Day 14	55.3	57.5	64.7*	87.9**	54.2	57.7	84.7**	107.3**
Day 29	56.0	58.5	78.5**	97.0**	58.8	67.3	110.5**	103.5**
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights[f] (%)								
Number Examined	10	10	10	4	10	10	10	3
Body Weights (g)	336.1	0	-1	-11*	222.4	-6	-6	-17**
Adrenal gland (g)	0.0636	0	+10	+11	0.0758	-7	+4	+21
Adrenal gland/BWt (%)	0.01896	0	+11	+24	0.03416	-1	+10	+47**
Adrenal gland/BrWt (ratio)	0.03230	+4	+15	+17	0.04128	-4	+2	+27
Liver (g)	11.6297	+5	+6	+6	7.6778	-2	+4	+4
Liver/BWt (%)	3.45794	+4	+8	+19*	3.45536	+5	+11*	+25**
Liver/BrWt (ratio)	5.89417	+9	+12	+11	4.19544	+1	+2	+8
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology[h]								
Number Examined	10	10	10	12	10	10	10	12
Ovaries								
Atresia, increased follicular								
mild	NA	NA	NA	NA	0	0	0	11
Skeletal muscle, soleus								
degeneration/regeneration, myofiber								
minimal	1	0	1	5	1	0	1	1
Vagina								
atrophy								
minimal	NA	NA	NA	NA	0	1	2	2
mild	NA	NA	NA	NA	0	0	0	6
moderate	NA	NA	NA	NA	0	0	0	4

Study Number: 1140-028 (Continued)

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0	20	60	200/120[b]	0	20	60	200/120[b]
Number of Recovery Animals	5	5	5	3	5	5	5	3
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations[e]								
Hair absent	3/1	2/1	8/1	4/1	4/1	0/0	3/1	29/3
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights[e] (%)								
Number Examined	5	5	5	3	5	5	5	3
Adrenal gland (g)	0.0706	+2	-2	+3	0.0624	+4	+17	+37
Adrenal gland/BWt (%)	0.01624	-2	+4	+10	0.02510	+6	+22	+46*
Adrenal gland/BrWt (ratio)	0.03600	-4	-4	+12	0.03470	+3	+15	+36
Liver (g)	13.2942	+13	-7	+1	7.6700	+5	+5	+10
Liver/BWt (%)	3.03310	+9	-2	+10	3.08998	+7	+9	+17*
Liver/BrWt (ratio)	6.80460	+7	-10	+10	4.24568	+5	+4	+9
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: –=No noteworthy findings; *=ANOVA and Dunnett; Significantly different from control, (P<0.05); **=ANOVA and Dunnett; Significantly different from control, (P<0.01); ALP=alkaline phosphatase; BWt=body weight; BrWt=brain weight; C_{max}=maximum (peak) observed drug concentration; GGT=gamma glutamyltransferase; GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable; TK=toxicokinetic; SD=Sprague Dawley; AUC_{12h}=area under the curve from time 0 to 12 hours

a Doses were administered twice daily, 12 hours (±30 minutes) apart, based on the first daily dose on each dosing day for the last animal dose/group/sex.

b During the first 12 days on study, multiple deaths occurred at the 200 mg/kg/day dose level. The dose level was reduced to 120 mg/kg/day on Day 8.

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

d During the first 12 days on study, 8 male and 9 female main study animals at 200 mg/kg/day were found dead or euthanized in extremis. The dose level was reduced to 120 mg/kg/day on Day 8. The cause of death for main study animals that were microscopically examined was interpreted to be resultant of gastrointestinal erosion/ulceration and undetermined if it was test article related.

e Reported as number observed/number of animals affected.

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 Group means are shown.

h Reported as number observed.

2.6.7.7.2 13-Week Good Laboratory Practices (GLP) Twice Daily Oral Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Sprague Dawley Rats Followed by a 28-Day Recovery

Report Title: 13-Week Good Laboratory Practices (GLP) Twice Daily Oral Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Sprague Dawley Rats Followed by a 28-Day Recovery Phase

Test Article: Tucatinib

Species/Strain: Rats/Crl:CD (SD)
Initial Age: 8 to 9 weeks
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Recovery: 28 days
Method of Administration: Oral gavage
Vehicle Control Article: 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC, sodium salt, medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in deionized water, pH 7 ± 0.1

Study No.: 8369684

GLP Compliance: Yes

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 60 mg/kg/day

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Number of Toxicity Animals at Study Start	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Number of Toxicokinetic Animals	**3**	**9**	**9**	**9**	**3**	**9**	**9**	**9**
Toxicokinetics Tucatinib:								
Day 1								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	60.8	1130	11,100	NC	228	1650	20,500
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	23.4	227	2120	<1.00	61.1	293	4120
Week 13								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	194	3290	44,700	NC	536	4320	40,800
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	63.8	751	8250	<1.00	173	1180	8010
Toxicokinetics ONT-993:								
Day 1								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	20.3	90.8	181	NC	26.7	90.6	278
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	3.94	12.9	31.0	<1.00	5.49	14.6	46.3
Week 13								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	34.5	145	214	NC	31.1	98.0	200
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	6.39	19.8	29.7	<1.00	6.69	14.6	35.4
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[b]	1	0	1	0	1	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–

Study No.: 8369684 (Continued)

Sex	Male				Female			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Body Weight (%)[c]								
Day 1	305 g	-1.3	-1.0	-0.7	–	–	–	–
Day 15	390 g	-2.3	-2.3	-7.2*	–	–	–	–
Day 32	466 g	-2.1	-2.1	-9.0*	–	–	–	–
Day 64	556 g	-2.9	-3.8	-9.5*	–	–	–	–
Day 92	622 g	-4.2	-4.2	-11.9*	–	–	–	–
Body Weight Change (g)					–	–	–	–
Days 1 to 4	19	16	18	7*	–	–	–	–
Days 4 to 8	27	26	25	20*	–	–	–	–
Days 8 to 11	19	20	17	14*	–	–	–	–
Days 25 to 29	17	14	15	11*	–	–	–	–
Days 29 to 32	11	13	12	8*	–	–	–	–
Days 64 to 71	23	16*	19	13*	–	–	–	–
Days 85 to 92	14	10	11	6*	–	–	–	–
Days 1 to 92	318	296	295	245*	–	–	–	–
Food Consumption (%)[c]								
Days 1 to 8	28 g/animal/day	-3.6	0.0	-14.3*	19 g/animal/day	0.0	0.0	-15.8*
Days 8 to 15	29 g/animal/day	-3.4	-3.4	-10.3*	–	–	–	–
Days 36 to 43	30 g/animal/day	-3.3	-3.3	-10.0*	–	–	–	–
Days 43 to 50	30 g/animal/day	-6.7	-3.3	-13.3*	–	–	–	–
Days 64 to 71	31 g/animal/day	-6.5	-6.5	-12.9*	–	–	–	–
Days 71 to 78	30 g/animal/day	-6.7*	-3.3	-13.3*	–	–	–	–
Days 78 to 85	30 g/animal/day	-3.3	0.0	-13.3*	–	–	–	–
Days 85 to 92	30 g/animal/day	-3.3	-6.7	-20.0*	–	–	–	–
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–

Study No.: 8369684 (Continued)

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Hematology								
Day 54								
Reticulocyte count (E3/uL)	226.5	227.6	234.4	269.6*	137.6	142.9	158.3	166.7*
Red cell distribution width (%)	13.1	13.0	13.2	14.4*	11.4	11.5	11.6	12.1*
Platelet count (E3/uL)	1100	1086	1097	1192	1017	1061	1026	1179*
Neutrophil count (E3/uL)	1.79	1.74	1.93	1.70	0.89	0.79	0.82	1.27*
Monocyte count (E3/uL)	0.23	0.24	0.23	0.24	0.15	0.13	0.15	0.23*
Day 93								
Red blood cell count (E6/uL)	9.09	9.23	9.00	8.72	8.53	8.50	8.47	8.19*
Hemoglobin (g/dL)	16.0	16.3	15.8	15.5	15.9	15.9	15.7	15.3*
Hematocrit (%)	51.0	51.7	50.4	49.3	49.4	49.5	48.8	47.7*
Reticulocyte count (E3/uL)	205.7	195.3	215.8	243.3*	131.2	147.6	157.0*	166.4*
Red cell distribution width (%)	13.3	13.0	13.4	13.8	11.1	11.3	11.4	11.6*
Platelet count (E3/uL)	1081	1044	1094	1158	921	987	920	1114*
Neutrophil count (E3/uL)	1.77	1.51	1.65	1.95	0.75	0.88	0.82	1.28*
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–

Study No.: 8369684 (Continued)

Sex	Male				Female			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Clinical Chemistry								
Day 54								
Alanine aminotransferase (U/L)	36	38	41*	42*	31	37	41	51*
Alkaline phosphatase (U/L)	99	101	103	120*	–	–	–	–
Creatinine (mg/dL)	0.6	0.6	0.6	0.7*	0.7	0.7	0.7	0.7*
Chloride (mmol/L)	–	–	–	–	101	103*	102	103*
Phosphorus (mg/dL)	7.7	7.8	7.5	8.5*	6.7	6.8	7.0	7.5*
Cholesterol (mg/dL)	101	100	100	136*	107	110	122	148*
Triglycerides (mg/dL)	79	61	63	51*	–	–	–	–
Day 93								
Aspartate aminotransferase (U/L)	–	–	–	–	92	128	188*	146*
Alanine aminotransferase (U/L)	37	38	40	44*	28	44*	68*	52*
Alkaline phosphatase (U/L)	83	82	96	116*	34	49*	62*	45*
Creatinine (mg/dL)	0.7	0.7	0.6	0.8*	–	–	–	–
Chloride (mmol/L)	101	101	102	103*	–	–	–	–
Phosphorus (mg/dL)	6.7	6.8	6.7	7.4*	–	–	–	–
Cholesterol (mg/dL)	105	103	97	139*	113	102	112	158*
Triglyceride (mg/dL)	110	89	75*	60*	–	–	–	–
Glucose (mg/dL)	94	91	95	105*	–	–	–	–
Calcium (mg/dL)	11.4	11.6	11.2	11.0*	12.0	11.7*	11.7	11.6*
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights								
Liver								
Absolute Organ Weight (%)[c]	–	–	–	–	7.5465 g	-2.8	5.8	6.9
Organ to Body Weight (%)	–	–	–	–	2.5624	2.3998	2.6200	2.9119*
Organ to Brain Weight (%)	–	–	–	–	364.0180	356.5683	388.1867	395.1218
Uterus/Cervix								
Absolute Organ Weight (%)[c]	NA	NA	NA	NA	0.7829 g	5.9	-2.5	-28.3*
Organ to Body Weight (%)	NA	NA	NA	NA	0.2654	0.2712	0.2516	0.2021*
Organ to Brain Weight (%)	NA	NA	NA	NA	37.7942	40.4570	37.0333	27.5368*
Prostate								
Absolute Organ Weight (%)[c]	1.4711 g	0.1	-3.2	-14.6	NA	NA	NA	NA
Organ to Body Weight (%)	0.2488	0.2594	0.2539	0.2409	NA	NA	NA	NA
Organ to Brain Weight (%)	64.4283	65.7580	62.0158	55.1113*	NA	NA	NA	NA

Study No.: 8369684 (Continued)

Sex	Male				Female			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology								
Number of Animals Examined	15	15	15	15	15	15	15	15
Liver								
Hepatocyte hypertrophy, centrilobular								
Severity Minimal	0	0	0	0	0	0	1	10
Number of Animals Examined	14	15	13	11	15	0	0	15
Mammary gland								
Atrophy, lobule								
Severity Minimal	0	1	3	0	0	NA	NA	0
Severity Slight	0	0	3	1	0	NA	NA	0
Severity Moderate	0	0	0	5	0	NA	NA	0
Severity Marked	0	0	0	4	0	NA	NA	0
Number of Animals Examined	NA	NA	NA	NA	15	15	15	15
Ovary								
Corpora lutea, decreased								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	1	2
Severity Moderate	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1
Cyst, corpus luteum								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	0	2
Increased interstitial cells								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	0	2
Number of Animals Examined	NA	NA	NA	NA	15	15	15	15
Uterus								
Atrophy								
Severity Minimal	NA	NA	NA	NA	0	2	2	6
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	0	6
Number of Animals Examined	NA	NA	NA	NA	15	15	15	15
Vagina								
Mucification, epithelium								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	1	5

Study No.: 8369684 (Continued)

Sex	Male				Female			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**	**0 (Control)**	**6 (Low)**	**20 (Mid)**	**60 (High)**
Number of Toxicity Animals in Recovery	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
Clinical Chemistry								
Day 28								
Aspartate aminotransferase (U/L)	–	–	–	–	102	105	305	103
Alanine aminotransferase (U/L)	–	–	–	–	27	30	123	30
Histopathology								
Number of Animals Examined	NA	NA	NA	NA	5	5	5	5
Ovary								
Corpora lutea, decreased								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0
Severity Marked	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1
Increased interstitial cells								
Severity Slight	NA	NA	NA	NA	0	0	0	1

Abbreviations: –=no noteworthy findings; *=statistically significant based on actual data (not on percent difference); AUC_{12h}=area under concentration-time curve from time 0 to 12 hours postdose; $C_{max\ (0\text{-}12h)}$=maximum (peak) observed drug concentration from 0 to 12 hours; GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable; NC=not calculated, below the lower limit of quantitation (<1.00 ng/mL)

a Doses were administered twice daily, 12 hours (±30 minutes) apart, based on the first daily dose on each dosing day for the last animal dose/group/sex.

b One control group male was found dead on Day 26 of the dosing phase with no other previous clinical observations. One Group 3 male was found dead on Day 67 of the dosing phase had clinical observations of scab and thinning haircoat on the left side of the head. This animal also had macroscopic findings of large spleen and liver correlating to lymphoma which was the cause of death. One control female was euthanized on Day 80 of the dosing phase with clinical observations of irregular respiration and red discolored haircoat. Macroscopic observations included discolored lung, lung adhesion, and abnormal contents in the thoracic cavity. None of the deaths were considered test article related.

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

2.6.7.7.3 A 28-Day Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Cynomolgus Monkeys Followed by a 28-Day Recovery

Report Title: A 4-Week Toxicity Study of ARRY-432380 Administered Twice-Daily by Nasal Gavage to Cynomolgus Monkeys, with a 4-Week Recovery Period

Test Article: ARRY-432380

Species/Strain: Monkeys/Cynomolgus	**Duration of Dosing:** 28 days[a]	**Study No.:** JAY00093
Initial Age: 1.7 to 5.7 years	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral Gavage (Nasal Gavage)	
Special Features: Troponin T analysis	**Vehicle/Formulation:** 0.5% Tween® 80 (Polysorbate 80, Crillet-4HP) in deionized water, pH 2.6, Lot No. [redacted]	

No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[b]	**0 (Control)**		**20**		**60**		**90**	
Number of Animals[c]								
Main Study:	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3
Recovery:	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2
Toxicokinetics[d] (Mean):								
ARRY-432380								
C_{max} (µg/mL), Day 1			0.892		2.91		4.54	
C_{max} (µg/mL), Day 28			1.17		4.60		NS[e]	
AUC_{12h} (µg·h/mL), Day 1			3.01		14.0		23.8	
AUC_{12h} (µg·h/mL), Day 28			5.22		26.4		NS[e]	
Noteworthy Findings								
Unscheduled Euthanasia[f]	0	0	0	0	0	1	5	5
Clinical Observations and Qualitative Food Consumption, Days 1-57[g]								
Low to no food consumption	–	–	1 (1)	–	3 (10)	4 (17)	5 (16)	4 (18)
Watery feces	4 (4)	1 (3)	2 (6)	1 (3)	5 (47)	5 (30)	5 (28)	5 (23)
Decreased activity	–	–	–	–	1 (2)	1 (3)	2 (10)	–
Emesis	–	–	–	1 (1)	2 (3)	1 (2)	1 (1)	5 (18)
Hunched appearance	–	–	–	–	–	–	–	1 (3)
Decreased skin turgor (dehydration)	–	–	–	–	–	–	1 (1)	–

Study No.: JAY00093 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[b]	**0 (Control)**		**20**		**60**		**90**	
Number of Animals[c]								
Main Study:	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3
Recovery:	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2
Body Weight[h]								
Week 1	–	–	–	–	–	–	–	[-11%]
Week 2	–	–	–	–	–	[-12%]	–	–
Electrocardiology (qualitative)	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry[i,j]								
Blood Urea Nitrogen								
Day 14	-23%		-17%		-38%		-47%/-46%[k]	
Albumin[l]								
Day 14	–		–		-9%		-24%/-28%[k]	
Day 28	-7%		-7%		-14%		NA	
Day 56 (Recovery)	+17%		-18%		-15%		NA	
Hematology[m]								
White Blood Cell Count ($10^3/\mu L$)								
Unscheduled/Day 14	[18.1]		–		–		[24.2; 26.3; 25.5; 37.2; 37.8; 26.9]	
Neutrophils ($/\mu L$)								
Unscheduled/Day 14	[8181]		–		–		[10,941; 13,005; 16,391; 24,701; 17,388; 12,105]	
Day 28	7150		11,010		14,945		NA	

Study No.: JAY00093 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[b]	**0 (Control)**		**20**		**60**		**90**	
Number of Animals[c]								
Main Study:	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3
Recovery:	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Troponin T	–	–	–	–	–	–	–	–
Terminal Euthanasia (Day 29)								
Number Evaluated	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/2	M/0	F/0
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	NA	NA
Organ Weights[n]								
Liver								
Absolute weight (g, %)	78.944	68.828	–	–	105%	112%	NA	NA
Organ to Body Weight (g/kg, %)	20.620	23.987	–	–	124%*	121%	NA	NA
Organ to Brain Weight (g/g, %)	1.170	1.113	–	–	103%	112%	NA	NA
Kidney								
Absolute weight (g, %)	14.572	13.636	–	–	113%	99%	NA	NA
Organ to Body Weight (g/kg, %)	3.790	4.763	–	–	135%*	107%	NA	NA
Organ to Brain Weight (g/g, %)	0.217	0.220	–	–	111%	100%	NA	NA
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Study No.: JAY00093 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[b]	**0 (Control)**		**20**		**60**	
Number of Animals[c]						
Main Study:	M/3	F/3	M/3	F/3	M/3	F/3
Recovery:	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2
Postdose Evaluation, Days 30-57	–	–	–	–	–	–
Recovery Euthanasia, Day 57						
Number Evaluated	M/2	F/2	M/2	F/2	M/2	F/2
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–
Organ Weights[n]						
Liver						
Absolute weight (g, %)	64.360	54.045	–	–	102%	114%
Organ to Body Weight (g/kg, %)	21.125	21.690	–	–	90%	106%
Organ to Brain Weight (g/g, %)	0.940	0.905	–	–	103%	105%
Kidney						
Absolute weight (g, %)	12.192	10.282	–	–	126%	123%
Organ to Body Weight (g/kg, %)	3.970	4.125	–	–	112%	114%
Organ to Brain Weight (g/g, %)	0.175	0.175	–	–	129%	111%
Histopathology	–	–	–	–	–	–

Study No.: JAY00093 (Continued)

Mortality Summary: All 90 mg/kg/day-dosed animals and one 60 mg/kg/day-dosed animal were euthanized prematurely (Days 8-15) due to dose-limiting adverse clinical signs, including reduced food consumption, hunched appearance, emesis, decreased skin turgor/dehydration, decreased activity, weight loss and/or watery feces. Similar adverse effects were observed in other animals in the 60 mg/kg/day-dosed group that survived until scheduled necropsy.

Animal No. /Sex	Dose Level (mg/kg/day)	Day of last dose	Day of Euthanasia	Animal No. /Sex	Dose Level (mg/kg/day)	Day of last dose	Day of Euthanasia
4503 F	90	8	8	4505 F	90	8	13
4001 M	90	9	9	4002 M	90	9	14
4003 M	90	7	12	4501 F	90	9	14
4004 M	90	7	12	4502 F	90	9	14
4005 M	90	7	12	3504 F	60	9	15
4504 F	90	8	13				

Noteworthy findings

Clinical Observations: Animal 4001 (90 mg/kg/day) was euthanized following dosing on Day 9. This animal had frequent red (presumed blood) watery feces, decreased activity and reduced food consumption. Veterinary examination indicated the animal to be dehydrated and appeared to have a painful abdomen (i.e., hunched appearance). The animal was provided dietary supplements and treated with subcutaneous fluids (Lactated Ringers Solution [LRS]), Buprenex® (for pain) and Pepto-Bismol® and Baytril® (antibiotic) for the red watery feces. Animal 4503 (90 mg/kg/day) was euthanized following dosing on Day 8. This animal had watery feces, frequent emesis and was dehydrated; as a result it was provided fruit and subcutaneous fluids. Veterinary examination indicated that the animal appeared to have a painful abdomen (i.e., hunched appearance) and it was treated with Buprenex®. Similar clinical signs were observed in most of the surviving animals in the 90 mg/kg/day-treated group (severity and frequency was variable between individuals), and as a result dosing was suspended due to concern for the animals' health. Affected animals were treated as necessary with dietary supplements, subcutaneous fluids, Pepto-Bismol® and Baytril®. After several days the adverse clinical signs were diminished in some animals, however, the Study Director and Sponsor determined that the extended duration of the dose-free period would negatively impact the study objectives and resuming dosing would likely result in the reappearance of the adverse clinical signs; hence, necropsy and collection of terminal samples were determined to be most consistent with the study design. (cont'd)

Study No.: JAY00093 (Continued)

Clinical Observations (Cont'd)
Dosing of Animal 3504 (60 mg/kg/day) was discontinued on Day 9 due to watery feces, dehydration, weight loss, reduced food consumption and apparent abdominal pain, similar to that present in the abovementioned 90 mg/kg/day-dosed animals. Animal 3504 was treated with dietary supplements, subcutaneous fluids and Buprinex®. After 5 dose-free days the animal was very slowly responding to treatment (stool was firm-mounding and food consumption was improved), however, the animal's overall condition was such that resumption of dosing was not appropriate and the animal was euthanized.
Body Weight: Animal 3504 (60 mg/kg/day) and 4504 (90 mg/kg/day) exhibited notable weight loss (11%-12%). Body weights for all other unscheduled euthanasia animals increased or remained stable.
Clinical Pathology: Data shown elsewhere with animals surviving to terminal or recovery necropsy.
Pathology: Swelling and cytoplasmic rarefaction of hepatocytes in the liver and degeneration of tubular epithelium in the kidney were noted. Although statistical analysis was not appropriate, increased liver weight was also considered to be test article-related at the high dose. The notable gross necropsy finding was friable liver corresponding microscopically with mild to marked cytoplasmic rarefaction and swelling of hepatocytes. Liver to brain weight ratios for most 90 mg/kg/day-dosed male and female animals and liver to body weight ratios for most animals in this dose group were increased compared with the highest control value on Day 29. Mean liver to brain weight ratios and liver to body weight ratios for 60 mg/kg/day-dosed animals were increased (statistically significant for males) compared with the mean control group value on Day 29. The liver to body weight ratio was also increased for the 60 mg/kg/day-dosed animal (3504) euthanized on Day 15 compared with the highest control group value on Day 29. The microscopic evaluation of kidneys revealed minimal degeneration of tubular epithelium of the medullary rays in one male (4001) and two females (4502 and 4504) in the 90 mg/kg/day-dosed group. Tubular degeneration was characterized by shrunken and fragmented cells sometimes accompanied by basophilic granules of mineralization. Regenerative epithelial cells in mitosis were seen in some lesions. Degeneration of tubular epithelium in the kidney was considered to be a test article-related histopathology finding at 90 mg/kg/day. Kidney to body weight ratios were increased for all but one 90 mg/kg/day-dosed male animal compared with the highest male control value on Day 29. Mean kidney to brain weight ratios and kidney to body weight ratios were increased (statistically significant for males) for 60 mg/kg/day-dosed animals compared with the mean control group value on Day 29.

Abbreviations: – = no noteworthy findings; *=ANOVA with Dunnett's/Dunn's ($P \leq 0.05$); ANOVA=Analysis of Variance; AUC_{12h}=the area under the ARRY-432380 concentration versus time curve from time 0 to 12 hours using linear trapezoidal integration; C_{max}=the maximum observed concentration of ARRY-432380 measured after dosing; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; M=male; NA=not applicable; NS=no samples available for analysis

a All animals in Groups 1, 2, and 3, excluding 1 Group 3 female and all Group 4 animals, were dosed via nasal gavage (5 mL/kg/dose) twice daily (12 ± 1 hour apart) for 28 consecutive days. Three Group 4 males received doses on Days 1-7. Two males and 2 females from Group 4, and a Group 3 female all received doses on Days 1-9, and 3 Group 4 females received doses on Days 1-8.

b Doses were administered as twice daily (5 mL/kg/dose) doses of 0, 10, 30 or 45 mg/kg (12 ± 1 hour apart).

c Main Study and recovery animals were euthanized on Days 29 and 57, respectively, with the exception of one Group 3 female and all Group 4 animals that were euthanized prematurely between Days 8 and 15 (discussed elsewhere).

d No quantifiable concentrations of ARRY-432380 were found in samples from the vehicle control group. Three predose samples from Day 1 (2 Group 3 males, and 1 Group 4 female) were found to contain measurable concentrations of ARRY-432380. There were no statistically significant differences in exposure between female and male monkeys based on individual plasma concentrations or AUC_{12h} values.

e NS were available for analysis as monkeys were removed from the study prior to Day 28.

f All 90 mg/kg/day-dosed animals and one 60 mg/kg/day-dosed animal were euthanized prematurely (Days 8-15) due to dose-limiting adverse clinical signs (see clinical observations). The most notable gross necropsy finding found only in the 60 and 90 mg/kg/day animals euthanized due to adverse clinical signs was friable liver. Most of these animals had cytoplasmic rarefaction and hepatocyte swelling microscopically. The liver to body and liver to brain weight ratios were increased in these animals and in the survivors given 60 mg/kg/day compared to the control values on Day 29. However, the survivors at 60 mg/kg/day did not have gross or histopathological changes as did the one animal euthanized in this group and the 90 mg/kg/day animals.

g Number of animals with finding (number of incidences) during study (Days 1-57) is shown. Data includes early euthanasia animals (euthanized on Days 8-15), main study animals (euthanized on Day 29) and recovery animals (euthanized on Day 57).

h Percent change from prestudy (Week -1) for 2 unscheduled euthanasia animals are shown in brackets (1 female each at 60 and 90 mg/kg/day, euthanized on Day 15 and Day 13, respectively. There were no test article-related effect on body weight for all other animals, including the unscheduled euthanasia animals.

i Group mean percent difference from prestudy (Day -7) is shown.

j In addition to findings shown, alkaline phosphatase was increased in some animals at 60 and 90 mg/kg/day at unscheduled, Day 14 and Day 28 sampling times. Serum triglycerides were elevated in some animals at the unscheduled and Day 14 sampling times in the 90 mg/kg/day group.

k Data represents unscheduled/Day 14 collections.

l At the unscheduled or Day 14, lower albumin was associated with lower total protein and albumin:globulin ratios in the 90 mg/kg/day group (group mean was reduced by 25% and 15% from control and pretest values, respectively) and also in a few animals in the 60 mg/kg/dose group.

m Group means are shown except where data shown in brackets for individual noteworthy animals. For controls, data in brackets represents the highest value noted.

n For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown. Statistical significance is for group mean compared to control (not for the percent difference).

2.6.7.7.4 A 13-Week Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Cynomolgus Monkeys Followed by a 28-Day Recovery

Report Title: 13-Week GLP Twice Daily Oral Gavage Toxicity Study of Tucatinib in Cynomolgus Monkeys Followed by a 28-Day Recovery Period
Test Article: Tucatinib
Species/Strain: Monkeys/Cynomolgus
Duration of Dosing: 13 weeks
Study No.: 8369685
Initial Age: 27 to 42 months
Duration of Recovery: 28 days
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: Oral Gavage
Vehicle Control Article: 0.5% (w/v) Tween® 80 (Polysorbate 80, NF) in deionized water, pH 2.6 ± 0.1
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day.

Sex	**Male**				**Female**			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**5 (Low)**	**20 (Mid)**	**40 (High)**	**0 (Control)**	**5 (Low)**	**20 (Mid)**	**40 (High)**
Number of Animals at Study Start	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Dosing Phase								
Toxicokinetics: Tucatinib								
Day 1								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	179	2650	6440	NC	111	1540	6180
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	95.6	851	1260	<1.00	44.9	597	1750
Day 91								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	264	1040	9220	NC	128	953	20,400
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	98.7	247	1760	<1.00	35.6	289	3780
Toxicokinetics: ONT-993								
Day 1								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	25.3	135	219	NC	9.14	129	243
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	10.1	36.7	44.6	<1.00	2.79	39.5	65.7
Day 91								
AUC_{12h} (ng·h/mL)	NC	15.8	31.1	89.6	NC	8.32	25.8	153
$C_{max\ (0\text{-}12h)}$ (ng/mL)	<1.00	5.78	5.61	12.4	<1.00	2.69	5.86	26.4
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	1[b]	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Feces, discolored, group observation, red	–	–	–	–	0	0	2	2
Feces, liquid, group observation	0	6	6	6	2	6	6	6
Feces, liquid, individual observation	0	0	0	2	1	0	0	2
Feces, mucoid, group observation	0	0	2	2	0	0	2	2
Feces, nonformed, group observation	6	6	6	6	6	6	6	6
Feces, nonformed, individual observation	0	0	1	0	0	0	1	0

Study No.: 8369685 (Continued)

Sex	Male				Female			
Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	**0 (Control)**	**5 (Low)**	**20 (Mid)**	**40 (High)**	**0 (Control)**	**5 (Low)**	**20 (Mid)**	**40 (High)**
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiographic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Physical Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Vital Signs								
Day 2								
Heart Rate (Beats/M)	129	170	173	169	–	–	–	–
Day 92								
Heart Rate (Beats/M)	121	149	147	141	–	–	–	–
Blood Pressures	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry								
Day 55								
Creatinine (mg/dL)	–	–	–	–	0.8	0.8	1.0	1.1*
Total Cholesterol (mg/dL)	152	153	163	215*	–	–	–	–
Day 93								
Creatinine (mg/dL)	–	–	–	–	0.9	0.9	1.1*	1.2*
Total Bilirubin (mg/dL)	0.3	0.4	0.5	0.5	0.3	0.4	0.5*	0.6*
Total Cholesterol (mg/dL)	–	–	–	–	128	152*	120	174*
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights								
Liver								
Absolute Organ Weight (%)[c]	49.360 g	+5.2	-3.6	+17.5*	52.294 g	+0.7	-3.9	+20.3
Organ to Body Weight (%)	1.8641	1.9695	1.8593	2.1922*	1.9857	2.0317	1.9476	2.2288
Organ to Brain Weight (%)	69.4052	70.6615	71.2789	82.3710	81.9422	78.6590	82.9930	96.0022
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Recovery Phase								
Number of Animals in Recovery	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy Findings	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: –=no noteworthy findings; *=statistically significant based on actual data (not on percent difference); AUC_{12h}=area under concentration-time curve from time 0 to 12 hours postdose; $C_{max\ (0\text{-}12h)}$=maximum (peak) observed drug concentration from 0 to 12 hours; GLP=Good Laboratory Practice; NC=not calculated

a Doses were administered twice daily, 12 hours (±30 minutes) apart, based on the first daily dose on each dosing day for the last animal dosed/group/sex.

b One male administered 20 mg/kg/day was sacrificed in a moribund condition on Day 36 of the dosing phase due to gavage-related stress. This death was not considered test article-related.

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

2.6.7.8 GENOTOXICITY: IN VITRO

2.6.7.8.1 Bacterial Reverse Mutation Assay (Ames Test) with Tucatinib

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay **Study Number:** [redacted] **Test Article:** ARRY-432380

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells **Number of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes

Strains: *S typhimurium* and *E coli* **Number of Replicate Cultures:** 2 (initial assay) and 3 (confirmatory assay)

Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9 **Number of Cells Analyzed/Cultured:** Approx. 10^9 cells/mL

Vehicles: for Test Article: DMSO **For Positive Controls:** DMSO, water

Treatment: Plate incorporation for approximately 48 to 72 hr. **Experimental Start Date:** [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: None

			Initial Toxicity-Mutation Assay Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**TA98**	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr*A**
Without Activation	ARRY-432380						
		Vehicle	16 ± 1	108 ± 9	23 ± 4	8 ± 6	14 ± 1
		1.5	19 ± 1	125 ± 14	23 ± 6	7 ± 6	16 ± 1
		5.0	14 ± 1	129 ± --	19 ± 4	9 ± 1	12 ± 3
		15	17 ± 6	162 ± 9	24 ± 6	10 ± 0	15 ± 1
		50	21 ± 4	175 ± 4	13 ± 6	5 ± 2	11 ± 3
		150	18 ± 1	164 ± 39	22 ± 8	10 ± 6	6 ± 4
		500	13 ± 1	127 ± 25	19 ± 7	8 ± 3	4 ± 0
		1500	15 ± 5	128 ± 8	18 ± 1	8 ± 0	5 ± 4
		5000	12 ± 2	130 ± 1	10 ± 2	4 ± 1	8 ± 1
		Positive	292 ± 29	375 ± 18	300 ± 24	47 ± 1	107 ± 23

Study No.: [redacted] (Continued)

			Initial Toxicity-Mutation Assay Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**TA98**	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvr*A**
With Activation	ARRY-432380						
		Vehicle	16 ± 0	140 ± 11	16 ± 3	10 ± 1	16 ± 2
		1.5	23 ± 1	149 ± 13	8 ± 1	9 ± 1	13 ± 2
		5.0	26 ± 8	189 ± 3	16 ± 9	12 ± 5	12 ± 1
		15	20 ± 4	138 ± 13	10 ± 1	6 ± 1	13 ± 1
		50	23 ± 8	167 ± 35	16 ± 6	6 ± 1	13 ± 2
		150	27 ± 8	141 ± 25	11 ± 1	11 ± 4	13 ± 4
		500	22 ± 3	139 ± 7	15 ± 1	6 ± 1	8 ± 1
		1500	19 ± 1	138 ± 16	20 ± 3	11 ± 1	9 ± 4
		5000	13 ± 2	142 ± 37	15 ± 2	5 ± 0	9 ± 3
		Positive	241 ± 57	492 ± 92	70 ± 3	55 ± 1	158 ± 1

Study No.: [redacted] (Continued)

			Confirmatory Mutagenicity Assay Revertant Colony Counts (Mean ± SD)				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**TA98**	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA***
Without Activation	ARRY-432380						
		Vehicle	16 ± 7	140 ± 13	24 ± 5	9 ± 4	14 ± 2
		50	24 ± 4	143 ± 19	26 ± 5	7 ± 1	12 ± 3
		150	21 ± 6	136 ± 9	21 ± 6	7 ± 2	12 ± 5
		500	18 ± 2	129 ± 13	19 ± 3	9 ± 3	12 ± 3
		1500	20 ± 6	126 ± 37	19 ± 5	8 ± 1	7 ± 1
		5000	12 ± 4	120 ± 3	17 ± 2	7 ± 2	9 ± 2
		Positive	166 ± 50	562 ± 16	501 ± 67	417 ± 34	87 ± 17
With Activation	ARRY-432380						
		Vehicle	24 ± 9	133 ± 14	16 ± 5	8 ± 4	22 ± 5
		50	32 ± 8	138 ± 3	16 ± 3	10 ± 3	17 ± 4
		150	28 ± 3	148 ± 9	15 ± 4	6 ± 3	15 ± 5
		500	23 ± 11	149 ± 10	13 ± 5	9 ± 5	11 ± 4
		1500	29 ± 8	133 ± 19	15 ± 5	7 ± 2	12 ± 3
		5000	15 ± 3	124 ± 11	9 ± 3	6 ± 2	6 ± 2
		Positive	315 ± 20	428 ± 21	81 ± 23	59 ± 16	116 ± 27

Abbreviations: DMSO=dimethyl sulfoxide; GLP=Good Laboratory Practice; hr=hour; Positive=positive control (50 µL plating aliquot, 2-aminoanthracene, 2-nitrofluorene, sodium azide, 9-aminoacridine, or methyl methanesulfonate); SD=standard deviation; TA98, TA100, TA1535, and TA1537=*Salmonella typhimurium* tester strains; Vehicle=vehicle control; WP2 *uvr*A=*Eschericia coli* tester strain WP2 *uvr*A

2.6.7.8.2 In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test

Report Title: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Assay)

Test Article: ARRY-432380
Study Number: [redacted]

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Number of Independent Assays: 2
GLP Compliance: Yes
Strains: L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells
Number of Replicate Cultures: 1 (preliminary assay) and 2 (mutagenesis assay)
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9
Number of Cells Analyzed/Cultured: $3x10^5$ cells/mL
Vehicles: for Test Article: DMSO
For Positive Controls: DMSO, water
Treatment: Continuous treatment for 4- or 24-hr with or without S9
Experimental Start Date: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic Effects: In the preliminary toxicity assay, substantial toxicity, i.e., suspension growth of ≤50% of the solvent control, was observed at ≥500 µg/mL without activation with a 4-hour exposure, ≥50 µg/mL with S9 activation with a 4-hour exposure, and 5.0 µg/mL without activation with a 24-hour exposure.

Genotoxic Effects: Negative

Initial Assay (4-hour exposure)

Metabolic Activation	Test Article Concentration (µg/mL)		Cell Concentration (X 10^6)[a] Day 1	Cell Concentration (X 10^6)[a] Day 2	Susp Growth Total[b]	Susp Growth %Cntl[c]	Cloning Growth Avg VC	Cloning Growth %Cntl[d]	% Total Growth[e]
Without Activation									
	Solvent 1		1.343	1.367	20.4		194		
	Solvent 2		1.364	1.398	21.2		193		
	10	A	1.181	1.243	16.3	78	223	115	90
	10	B	0.962	1.173	12.5	60	224	116	70
	25	A	0.960	1.143	12.2	59	246	127	74
	25	B	0.941	1.224	12.8	62	203	105	65
	40	A	0.887	1.129	11.1	53	193	100	53
	40	B	0.821	1.123	10.2	49	183	94	46
	+50	A	0.739	1.257	10.3	50	198	102	51
	+50	B	0.732	1.053	8.6	41	190	98	40
Positive Control - Methyl Methanesulfonate (µg/mL)									
	15		0.980	0.802	8.7	42	75	39	16
	20		0.936	0.830	8.6	41	48	25	10

Study Number: [redacted]
Initial Assay (4-hour exposure)

Metabolic Activation	Test Article Concentration (µg/mL)		Cell Concentration (X 10^6)[a]		Susp Growth		Cloning Growth		% Total Growth[e]
			Day 1	Day 2	Total[b]	%Cntl[c]	Avg VC	%Cntl[d]	
With Activation									
	Solvent 1		1.146	1.217	15.5		208		
	Solvent 2		1.163	1.277	16.5		184		
	10	A	1.102	1.336	16.4	102	208	106	109
	10	B	1.080	0.719	8.6	54	201	103	55
	25	A	0.774	1.262	10.9	68	210	107	73
	25	B	0.784	1.204	10.5	66	210	107	70
	40	A	0.577	1.211	7.8	49	215	110	53
	40	B	0.459	1.284	6.5	41	193	99	40
	+50	A	0.346	1.212	4.7	29	184	94	27
	+50	B	0.251	0.875	2.9	18	172	88	16
Positive Control - 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene (µg/mL)									
	0.75		0.728	1.198	9.7	61	164	84	51
	1		0.504	1.049	5.9	37	146	74	27

Avg VC=average viable count; Cntl=control; DMSO=dimethyl sulfoxide; GLP=Good Laboratory Practice; Solvent=DMSO
A and B or 1 and 2 are duplicate cultures.

a Cultures containing <0.3x10^6 cells/mL on Days 1 and 2 are considered to have 0% total suspension growth.

b Total suspension growth = $\frac{Day\ 1\ cell\ conc.}{0.3x10\text{^}6} x \frac{Day\ 2\ cell\ conc.}{Day\ 1\ adjusted\ cell\ conc.}$

c % of control suspension growth = $\frac{\text{total treatment suspension growth}}{\text{average solvent control total suspension growth}} x\ 100$

d % control cloning growth = $\frac{\text{average VC of treated culture}}{\text{average VC of solvent control}} x\ 100$

e % total growth = $\frac{(\%\ \text{suspension growth})(\%\ \text{cloning growth})}{100}$

Study Number: [redacted]

Extended Treatment Assay (24-hour exposure)

Metabolic Activation	Test Article Concentration (µg/mL)		Cell Concentration (X 10^6)[a]			Susp Growth		Cloning Growth		% Total Growth[e]
			Day 0	Day 1	Day 2	Total[b]	%Cntl[c]	Avg VC	%Cntl[d]	
Without Activation										
	Solvent 1		0.953	0.819	1.579	45.6	100	188	100	100
	Solvent 2		0.932	0.877	1.433	43.4	100	222	100	100
	0.5	A	0.888	0.790	1.475	38.3	86	173	84	72
	0.5	B	0.935	0.818	1.418	40.1	90	154	75	68
	2	A	0.661	0.687	1.604	27.0	61	204	99	60
	2	B	0.649	0.629	1.286	19.5	44	179	87	38
	3	A	0.547	0.491	1.216	12.1	27	181	88	24
	3	B	0.552	0.462	1.226	11.6	26	161	78	20
	4	A	0.489	0.423	1.030	7.9	18	151	74	13
	4	B	0.484	0.439	0.996	7.8	18	158	77	14
	5	A	0.442	0.399	1.094	7.2	16	154	75	12
	5	B	0.459	0.385	1.012	6.6	15	153	75	11
	10	A	0.238	0.270	0.466	1.6	3	**	**	**
	10	B	0.249	0.289	0.841	2.8	6	**	**	**
Positive Control - MethylMethaneSulfonate (MMS, µg/mL)										
	7.5		0.713	0.608	1.007	16.2	36	215	105	38
	5		0.782	0.652	1.260	23.8	53	183	89	48

Avg VC=average viable count; Cntl=control; Solvent=DMSO
A and B or 1 and 2 are duplicate cultures.
**=Too toxic to clone

a Cultures containing <0.3x10^6 cells/mL on Days 0, 1, and 2 are considered to have 0% total suspension growth.

b Total suspension growth = $\frac{Day\ 0\ cell\ conc.}{0.3x10\text{^}6} x \frac{Day\ 1\ cell\ conc.}{Day\ 0\ adjusted\ cell\ conc.} x \frac{Day\ 2\ cell\ conc.}{Day\ 1\ adjusted\ cell\ conc.}$

c % of control suspension growth = $\frac{\text{total treatment suspension growth}}{\text{average solvent control total suspension growth}} x\ 100$

d % control cloning growth = $\frac{\text{average VC of treated culture}}{\text{average VC of solvent control}} x\ 100$

e % total growth = $\frac{(\%\ \text{suspension growth})(\%\ \text{cloning growth})}{100}$

2.6.7.9 GENOTOXICITY: IN VIVO

2.6.7.9.1 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

Report Title: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test		**Test Article:** ARRY-432380
Test for Induction of: Micronucleated Polychromatic Erythrocytes	**Treatment Schedule:** Single Dose	**Study No.:** [redacted]
Species/Strain: Mice/Institute of Cancer Research (ICR)	**Sampling Time:** 24 hr, 48 hr	**GLP Compliance:** Yes
Age: 6 to 8 weeks	**Method of Administration:** Oral Gavage	
Cells Evaluated: Bone marrow cells [polychromatic erythrocytes (PCEs)]	**Vehicle/Formulation:** 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC), sodium salt (medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in water (0.5% CMC and 0.1% Poloxamer 188 in water)	
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000 PCEs		**Date of Initial Dose:** [redacted] 20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: No clinical signs observed in any dose group in the definitive test. In the preliminary study, piloerection was observed in all males at 2000 mg/kg and 1/2 males at 10 and 1000 mg/kg.		
Genotoxic Effects: Negative		
Evidence of Exposure: There were non-dose dependent reductions of 2%-15% in the ratio of PCE to total erythrocytes at all test-article treated groups		

Treatment (20 mL/kg)	Sex	Time (hr)	Number of Animals	PCE/Total Erythrocytes (Mean ± SD)	Change From Control (%)	Number of MPCE/1000 PCE (Mean ± SD)	Number of MPCE/PCE Scored
Vehicle**	M	24	5	0.518 ± 0.09	–	0.0 ± 0.00	0/10,000
	F	24	5	0.547 ± 0.06	–	0.3 ± 0.27	3/10,000
ARRY-432380							
500 mg/kg	M	24	5	0.533 ± 0.05	3	0.1 ± 0.22	1/10,000
	F	24	5	0.535 ± 0.10	-2	0.2 ± 0.27	2/10,000
1000 mg/kg	M	24	5	0.583 ± 0.08	13	0.1 ± 0.22	1/10,000
	F	24	5	0.475 ± 0.07	-13	0.2 ± 0.27	2/10,000
2000 mg/kg	M	24	5	0.454 ± 0.04	-12	0.0 ± 0.00	0/10,000
	F	24	5	0.524 ± 0.06	-4	0.3 ± 0.27	3/10,000

Study Number: [redacted] (Continued)

Treatment (20 mL/kg)	Sex	Time (hr)	Number of Animals	PCE/Total Erythrocytes (Mean ± SD)	Change From Control (%)	Number of MPCE/1000 PCE (Mean ± SD)	Number of MPCE/PCE Scored
Cyclophosphamide							
50 mg/kg	M	24	5	0.416 ± 0.07	-20	8.4 ± 1.67	*84/10,000
	F	24	5	0.357 ± 0.07	-35	9.2 ± 1.35	*92/10,000
Vehicle**	M	48	5	0.512 ± 0.03	–	0.1 ± 0.22	1/10,000
	F	48	5	0.578 ± 0.07	–	0.1 ± 0.22	1/10,000
ARRY-432380							
2000 mg/kg	M	48	5	0.433 ± 0.08	-15	0.0 ± 0.00	0/10,000
	F	48	5	0.559 ± 0.05	-3	0.1 ± 0.22	1/10,000

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; hr=hour; MPCE= micronucleated polychromatic erythrocytes; SD=standard deviation
*Statistically significant, P≤0.05 (Kastenbaum-Bowman Tables).
**Vehicle = 0.5% CMC and 0.1% Poloxamer 188 in water.

2.6.7.10 CARCINOGENICITY

Not Applicable.

2.6.7.11 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: NON-PIVOTAL STUDIES

Not Applicable.

2.6.7.12 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION

Not Applicable.

2.6.7.13 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT

2.6.7.13.1 An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rats

Report Title: An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rats

Test Article: Tucatinib (also known as ONT-380)

Design similar to ICH 4.1.3?: Yes

Duration of Dosing: GD 7 through 17

Study No.: 20160869

Species/Strain: Rats/Crl:CD (SD)

Initial Age: 61 to 68 days at receipt

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Day of Mating: GD 0

Special Features: None

Day of C-Section: GD 18 (TK animals)/GD 21 (for fetal evaluations)

No Observed Adverse Effect Level:

Method of Administration: Oral gavage

F_0 Females: Not determined

Control/Formulation: 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC; sodium salt, medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in deionized water, pH 7 ± 0.1

F_1 Litters: 90 mg/kg/day

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]		**0 (Control)**	**90**	**120**	**150**
Dams/Does:	Toxicokinetics: AUC_{12h} (ng·h/mL)				
	tucatinib				
	GD 7	NC	12,900	33,700	35,700
	GD 17	NC	16,400	31,600	60,600
	ONT-993				
	GD 7	NC	181	245	258
	GD 17	NC	156	153	219
	Toxicokinetics: AUC_{24h} (ng·h/mL)				
	tucatinib				
	GD 7	NC	38,900	82,100	117,000
	GD 17	NC	50,000	57,900	136,000
	ONT-993				
	GD 7	NC	334	438	535
	GD 17	NC	342	292	480
	No. Pregnant	6	6	6	6
	No. Died or Sacrificed Moribund	1	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0

Study No.: 20160869 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0 (Control)	90	120	150
Clinical Observations				
Fur loss	0	0	1	2
Thin fur	0	0	2	1
Necropsy Observations	–	–	–	–
Body Weight GD 18 (%)[b]	314.2 g	-5.9	-9.4	-15.0
Food Consumption GD 7-21 (%)[b]	23.2 g/animal/day	-4.3	-14.6	-26.9
Mean No. Corpora Lutea	14.4	13.7	12.7	14.6
Mean No. Implantations	13.6	12.0	11.8	11.3
Mean % Preimplantation Loss	5.29	11.14	5.35	18.89

Abbreviations: –=no noteworthy findings; AUC_{12h}=area under concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC_{24h}=area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Conference on Harmonisation

a Twice daily dosing 12 hours (± 30 minutes) apart, by group.

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

Study No.: 20160869 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]		0 (Control)	90	120	150
Litters:	No. Litters Evaluated	6	6	6	6
	Mean No. Live Fetuses	13.6	11.2	11.7	10.7
	Mean No. Resorptions	0.0	0.8	0.2	0.7
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	0.00	7.47	1.28	6.13
	Mean Fetal Body Weight (g)[b]	5.91	-2.83	-11.02	-19.33
	Fetal Sex Ratios (% males)	45.19	59.70	52.74	51.37
	Fetal Abnormalities:				
	Gross External	–	–	–	–
	Visceral Abnormalities	–	–	–	–
	Skeletal Abnormalities				
	Incomplete ossified parietal (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.38)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Ossified sternebra bipartite (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Fused cervical arch (Malformation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Misshapen cervical arch (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Unossified thoracic centrum (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Nodulated rib (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)
	Incomplete ossified squamosal (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (3.33)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)

Study No.: 20160869(Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]		0 (Control)	90	120	150
Litters	Skeletal Abnormalities (Continued)				
	Incomplete ossified zygomatic arch (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (3.33)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)
	Full cervical supernumerary rib (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (6.67)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)
	Short cervical supernumerary rib (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (3.33)	3 (10.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
	Ossified thoracic centrum bipartite (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (2.78)	2 (6.11)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
	Incomplete ossified sternebra (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	4 (13.33)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	1 (16.7)
	Short rib (Variation)				
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	1 (2.78)	0 (0.00)	1 (3.33)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	0 (0.0)	1 (16.7)
	Total Affected Fetuses (Litters)				
	Skeletal Variation	0 (0)	3 (3)	3 (3)	11 (3)
	Skeletal Malformation	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	Fetal Ossification Sites [b]				
	Hindlimb tarsals (reduced)	0.05	-48.15	-100.0	-100.0
	Hindlimb phalanges (reduced)	6.71	8.10	-6.92	-23.24
	Forelimb phalanges (delayed)	8.37	-1.76	-1.02	-6.91
	Metatarsals (delayed)	4.98	-0.70	-2.82	-11.34

Abbreviation: –=no noteworthy findings

a Twice daily dosing 12 hours (± 30 minutes) apart, by group.

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

2.6.7.13.2 An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rabbits

Report Title: An Oral (Gavage) Dose Range-Finding Embryo-Fetal Development Study of Tucatinib in Rabbits

Test Article: Tucatinib (also known as ONT-380)

Design similar to ICH 4.1.3?: Yes

Duration of Dosing: GD 7 through 19

Study No.: 20144956

Species/Strain: Rabbits/New Zealand White [Crl:KBL (NZW)]

Initial Age: approximately 5 months

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Day of Mating: GD 0

Special Features: None

Day of C-Section: GD 29

No Observed Adverse Effect Level:

Method of Administration: Oral gavage

F_0 Females: 90 mg/kg/day

F_1 Litters: 60 mg/kg/day

Control/Formulation: 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC; sodium salt, medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in deionized water, pH 7 ± 0.1

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]		**0 (Control)**	**60**	**90**	**120**	**150**
Does:	Toxicokinetics: AUC (ng·h/mL)					
	GD 7 AUC_{12h}	NC	845	1720	3030	3190
	GD 7 AUC_{24h}	NC	1950	3860	6600	6760
	GD 19 AUC_{12h}	NC	1640	6100	23,200	25,900
	GD 19 AUC_{24h}	NC	3110	12,400	44,100	48,500
	No. Pregnant	5	6	5	6	6
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[c]	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	1	0
	Clinical Observations	–	–	–	–	–
	Body Weight GD 20 (%)[b]	3830.30 g	-2.71	-5.33	-7.22	-3.85
	Food Consumption GD 7-20 (%)[b]	113.71 g/animal/day	-19.02	-38.24	-50.99	-19.46
	Necropsy Observations	–	–	–	–	–
	Mean No. Corpora Lutea	12.0	12.5	10.4	11.6	12.0
	Mean No. Implantations	10.4	11.7	9.2	10.8	10.7
	Mean % Preimplantation Loss	12.24	6.62	13.11	7.64	11.52

Study No.: 20144956 (Continued)

Twice Daily Dose (mg/kg/day)[a]		0 (Control)	60	90	120	150
Litters:	No. Litters Evaluated	5	6	5	6	6
	Mean No. Live Fetuses	10.0	11.2	7.2	8.2	9.7
	Mean No. Resorptions	0.4	0.5	1.8	2.6	1.0
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	1	1	0
	Mean % Postimplantation Loss	3.08	4.29	19.77	20.96	11.28
	Mean Fetal Body Weight (g)	39.52	39.07	40.68	40.84	38.32
	Fetal Sex Ratios (% males)	51.62	49.39	34.81	35.50	37.10
	Fetal Anomalies:					
	Gross External					
	Head – Domed - Malformation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (15.00)	5 (20.00)	1 (2.08)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (16.7)
	Total Affected Fetuses (Litters)	0 (0)	0 (0)	4 (2)	5 (1)	1 (1)
	Visceral Anomalies					
	Brain – Lateral Ventricle, Dilated (Severe) - Malformation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (15.00)	5 (20.00)	1 (2.08)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (16.7)
	Brain – Third Ventricle, Dilated (Severe) - Malformation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (15.00)	5 (20.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
	Total Affected Fetuses (Litters)	0 (0)	0 (0)	5 (2)	5 (1)	2 (2)
	Skeletal Anomalies					
	Frontal – Incomplete Ossification - Variation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (15.00)	5 (20.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
	Parietal – Incomplete Ossification - Variation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	5 (20.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
	Parietal – Hole - Variation					
	No. Fetuses (%)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (10.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Total Affected Fetuses (Litters)	4 (3)	6 (4)	5 (2)	7 (2)	1 (1)

Abbreviations: –=no noteworthy findings; AUC_{12h}=area under concentration-time curve from time 0 to 12 hours; AUC_{24h}=area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; Crl:KBL(NZW)=New Zealand White rabbits from Charles River Laboratories, Inc.; ICH=International Conference on Harmonisation

a Twice daily dosing 12 hours (± 30 minutes) apart, by group

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

c One rabbit was euthanized due to delivery before scheduled termination.

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

Not Applicable.

2.6.7.15 STUDIES IN JUVENILE ANIMALS

Not Applicable.

2.6.7.16 LOCAL TOLERANCE

Gastric irritation study reported in CTD 2.6.2.4.7 and CTD 2.6.3.4.

2.6.7.17 OTHER TOXICITY STUDIES

Test Article: Tucatinib, ONT-993, [redacted], [redacted]

Species/ Strain	Test Article	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)	Number/ Sex/ Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rats/ Crl:CD (SD)	[redacted]	Oral gavage	28 days	0, 0.620, 1.860 or 6.2	10M/10F	No test article-related findings	1451-008
Rats/ Crl:CD (SD)	[redacted]	Oral gavage	28 days	0, 0.186, 0.558, or 1.86	10M/10F	No test article-related findings	1019-066
BALB/c 3T3 cells	Tucatinib and ONT-993	In vitro	N/A	Tucatinib: 0, 2.15-147 µg/mL, ONT-993: 0, 6.81-464 µg/mL	N/A	Tucatinib and ONT-993 had Photo-Irritant Factor values of 7.3 and 8.4, respectively, and thus have phototoxic potential.	MB [redacted]-24471.30
Rats/ Crl:LE (Long-Evans)	Tucatinib	Oral gavage	6 consecutive doses (beginning on the evening of DS 1 and ending on the morning of DS 4)	0, 6, 20, or 60	5F	Tucatinib elicited no cutaneous or ocular reactions indicative of phototoxicity.	20129137

Abbreviations: DS=day of study; F=female; M=male; N/A=not applicable

2.6.7.17.1 [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats

Report Title: [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats

Test Article: [redacted] (also known as ONT-380 [redacted] and [redacted])

Species/Strain: Rats/Crl:CD (SD)
Duration of Dosing: Twice daily for 28 days
Study Number: 1451-008
Initial Age: 8 weeks
Duration of Postdose: NA
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
GLP Compliance: Yes
Vehicle: 0.5% HPMC E3 LV and 0.1% Poloxamer 188 in water pH 6 (±0.1 using an appropriate strength of NaOH or HCl)
Special Features: None
No Observed Effect Level: 6.2 mg/kg/day

Sex	**Male**				**Female**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0**	**0.620**	**1.860**	**6.2**	**0**	**0.620**	**1.860**	**6.2**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight Change	–	–	–	–	–	–	–	–
Caged Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; HCl=hydrochloric acid; HPMC=hydroxypropyl methylcellulose; NA=not applicable; NaOH=sodium hydroxide; SD=Sprague Dawley

2.6.7.17.2 [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats

Report Title: [redacted] ([redacted]): A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats **Test Article:** [redacted] (also known as ARM-0223, ONT-380 [redacted], [redacted])

Species/Strain: Rats/Crl:CD (SD) **Duration of Dosing:** Twice daily for up to 28 days **Study Number:** 1019-066

Initial Age: 7 weeks **Duration of Postdose:** NA

Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] **Method of Administration:** Oral gavage **GLP Compliance:** Yes

Vehicle: 0.475% HPMC E3 LV, 0.095% Poloxamer 188, and 5% Hydroxypropyl β Cyclodextrin (HPβCD) in water, pH 6 (±0.1 using an appropriate strength of NaOH or HCl)

Special Features: None

No Observed Effect Level: 1.86 mg/kg/day

Sex	**Male**				**Female**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0**	**0.186**	**0.558**	**1.86**	**0**	**0.186**	**0.558**	**1.86**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[a]	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight Change	–	–	–	–	–	–	–	–
Caged Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; HCl=hydrochloric acid; HPMC=hydroxypropyl methylcellulose; NA=not applicable; NaOH=sodium hydroxide; SD=Sprague Dawley

a There was no test article-related mortality during the study.

2.6.7.17.3 [redacted]: A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats

Report Title: [redacted]: A Twice Daily 28-Day Oral Toxicity Study in Rats
Test Article: [redacted]
Species/Strain: Rat/Crl:CD (SD)
Duration of Dosing: Twice daily for 28 days
Study Number: 1019-074
Initial Age: Approximately **7** weeks at the initiation of dosing
Duration of Postdose: NA
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
GLP Compliance: Yes
Vehicle: 5% v/v dimethyl sulfoxide, 45% v/v propylene glycol, 50% v/v deionized water, final pH of 4.0 ± 0.2
Special Features: None
No Observed Effect Level: 2.47 mg/kg/day

Gender	**Males**				**Females**			
Dose Level (mg/kg/day)	**0**	**0.247**	**0.741**	**2.47**	**0**	**0.247**	**0.741**	**2.47**
Number of Animals	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight Change	–	–	–	–	–	–	–	–
Caged Food Consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable; SD=Sprague Dawley

2.6.7.17.4 In Vitro Phototoxicity Study in Balb/c 3T3 Cells

Test Article: Tucatinib, ONT-993

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	Study Number
BALB/c 3T3 cells	In vitro	N/A	Tucatinib: 0, 2.15-147 µg/mL, ONT-993: 0, 6.81-464 µg/mL	N/A	Tucatinib and ONT-993 had Photo-Irritant Factor values of 7.3 and 8.4, respectively, and thus have phototoxic potential.	MB [redacted]-24471.30

Abbreviations: N/A=not applicable

2.6.7.17.5 In Vivo Phototoxicity Study of Tucatinib in Pigmented Rats

Test Article: Tucatinib

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (mg/kg/day)[b]	Number of Females per Group	Noteworthy Findings	Study No.
Rats/CRL:LE (Long-Evans)	Oral gavage	4 days[a]	0 (vehicle control[c])	5	No evidence of ocular or cutaneous phototoxicity.	20129137
			6	5		
			20	5	NOEL: 60 mg/kg/day (30 mg/kg/dose)[e]	
			60	5		
			60[d]	5		

Abbreviations: AUC_{12h}=area under concentration-time curve from time 0 to 12 hours; C_{max}=maximum (peak) observed drug concentration; NOEL=no-observed-effect level; UVR=ultraviolet radiation; UVA=ultraviolet A; UVB=ultraviolet B.

a Animals were dosed every 12 hours (±30 minutes) for 4 consecutive days starting the evening of DS 1 and ending the morning of DS 4, for a total of 6 doses. The 6th dose was followed 90 ± 15 minutes later by UVR exposure. A Solar Light™ detector was used to monitor the incident UVR, and a dose of approximately 10 J/cm^2 (10.05 or 10.29 J/cm^2 of UVA and 141 or 145 mJ/cm^2 of UVB) was delivered to each rat over a period of 42 minutes or 41 minutes, respectively.

b All groups were administered a dose volume of 5 mL/kg.

c Vehicle Control = 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC, sodium salt, medium viscosity) and 0.1% Poloxamer 188 in deionized water, pH 7 ± 0.1

d Sham exposure; rats were sedated and restrained, but not exposed to UVR.

e This corresponded with the C_{max} and AUC_{12h} values after the first and fifth dose of 5380 and 6300 ng/mL and 17,000 and 28,300 ng·h/mL, respectively.