目次

目次 1
表一覧 1
略語及び略号一覧 3
2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1 ラットを用いた単回投与試験 10
2.6.6.2.2 イヌを用いた単回投与試験 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1 ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験 11
2.6.6.3.2 イヌを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験 13
2.6.6.3.3 ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 17
2.6.6.3.4 イヌを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 21
2.6.6.3.5 ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験 24
2.6.6.3.6 イヌを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験 28
2.6.6.4 遺伝毒性試験 30
2.6.6.4.1 *In vitro* 30
2.6.6.4.1.1 細菌復帰突然変異試験（Ames 試験） 30
2.6.6.4.1.2 染色体異常試験 31
2.6.6.4.2 *In vivo* 31
2.6.6.4.2.1 小核試験 31
2.6.6.5 がん原性試験 32
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 32
2.6.6.6.1 妊娠ラットを用いた胚・胎児毒性試験 32
2.6.6.7 局所刺激性試験 33
2.6.6.8 その他の毒性試験 33
2.6.6.8.1 CYH33 を用いた *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験 33
2.6.6.8.2 Sprague Dawley ラットを用いた強制経口投与による CYH33 の光毒性試験 34
2.6.6.8.3 Brown Norway ラットを用いた強制経口投与による CYH33 の光毒性試験 35
2.6.6.9 考察及び結論 36

表一覧

表 2.6.6-1. CYH33 を用いて実施した非臨床毒性試験の一覧 5

表 2.6.6-2. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（単回投与試験） 11
表 2.6.6-3. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（28 日間反復投与試験） 12
表 2.6.6-4. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（28 日間反復投与試験） 15
表 2.6.6-5. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（13 週間反復投与試験） 20
表 2.6.6-6. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（13 週間反復投与試験） 23
表 2.6.6-7. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及び I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（26 週間反復投与試験） 26
表 2.6.6-8. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及び I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（39 週間反復投与試験） 29
表 2.6.6-9. 胚・胎児毒性試験（n=5）における CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータ 33
表 2.6.6-10. 非臨床試験における全身曝露量と推奨用量におけるヒト曝露量との比較に基づく曝露量マージン 37

略語及び略号一覧

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
A/G	Albumin to Globulin Ratio	アルブミン／グロブリン比
ALT	Alanine Aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	Aspartate Aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}24h}$	Areas under the blood concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 から 24 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
BN rat	Brown Norway rat	ブラウンノルウェーラット
CHL	Chinese Hamster Lung Cells	チャイニーズハムスター肺細胞
CHOL	Cholesterol	コレステロール
CI	Chloride ion	塩化物イオン
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
CP	Cyclophosphamide Monohydrate	シクロホスファミド一水和物
D	Day	日
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ECG	Electrocardiogram	心電図
GD	Gestation Day	妊娠日齢
GI	Gastrointestinal	消化管
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
GLU	Glucose	グルコース
HBSS	Hank’s Balanced Salt Solution	ハンクス平衡塩溶液
HCT	Hematocrit	ヘマトクリット
HGB	Hemoglobin	ヘモグロビン
HNSTD	Highest Non-Severely Toxic Dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPMC	Hypromellose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
h/hr/hrs	Hour	時間
K	Potassium ion	カリウムイオン
MBP	Mean Arterial Blood Pressure	平均動脈圧
MNPCE	Micronucleated Polychromatic Erythrocytes	小核多染性赤血球
MONO	Monocytes	単球
MPE	Mean Photo Effect	平均光作用
MTD	Maximal Tolerated Dose	最大耐量
NA	Not Applicable	該当なし

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
Na	Sodium ion	ナトリウムイオン
NCE	Normochromatic Erythrocytes	正染性赤血球
NEUT	Neutrophils	好中球
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect-Level	無毒性量
OD_{540}	Optical Density of 540 nm	540 nm における光学密度
PCE	Polychromatic Erythrocytes	多染性赤血球
PIF	Photo Irritation Factor	光毒性係数
PO	Oral	経口
QD	Once a Day	1 日 1 回
RBC	Red Blood Cells	赤血球
RET	Reticulocytes	網状赤血球
S9	Metabolic Activation System	代謝活性化系
SBP	Systolic Blood Pressure	収縮期血圧
SD rat	Sprague-Dawley (rat strain)	Sprague-Dawley（ラット動物系統）
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
STD_{10}	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
TG	triglycerides	トリグリセリド
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
UGL	Urine Glucose Level	尿中グルコース濃度
WBC	white blood cells	白血球

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与（4 週間、13 週間、26 週間及び 39 週間）一般毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo*（マウス）遺伝毒性試験、妊娠ラットを用いた胚・胎児毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo*（アルビノラット及び有色ラット）光毒性試験において、CYH33（一般名：リソバリシブメシル酸塩水和物）の非臨床毒性を評価した。CYH33 を用いて実施した毒性試験の一覧をその医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合状況とともに表 2.6.6-1 に示す。

ラット及びイヌの反復投与一般毒性試験、胚・胎児毒性試験、並びに *in vivo* 光毒性試験において、トキシコキネティクス試験を実施した。バリデートされた高速液体クロマトグラフィ-タンデム質量分析（HPLC-MS/MS）法により、CYH33 及びその活性代謝物 I27 の血漿中濃度を測定した。

すべての GLP 毒性試験は CYH33 のロット番号[redacted]、[redacted]及び[redacted]を用いて実施した。これらのロットの不純物パターンを[M2.6.7.3]の表に報告している。すべての *in vivo* 毒性試験において CYH33 を 1% HPMC 溶液（溶媒）で調製して PO 製剤とした。

表 2.6.6-1. CYH33 を用いて実施した非臨床毒性試験の一覧

Study Type (GLP status)	Route	Species/ Strain	Dose Levels	Report No. (CTD No.)
Single Dose Toxicity Studies				
Single-dose (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	4/sex/group 0 (vehicle), 30, 150, and 600 mg/kg administered by oral gavage (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]004R (M4.2.3.1-1)
Single-dose (GLP)	PO	Dog/Beagle	1/sex/group 0 (vehicle), 10, 40, 120 mg/kg with a volume of 5 mL/kg, administered by oral gavage (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]006D (M4.2.3.1-2)
Repeat-Dose Toxicity Studies				
4-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 15/sex/group TK satellite study: 3/sex/group (total 144 rats) oral daily dose via gavage for 28 days at 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for females (dose	[redacted]005R (M4.2.3.2-1)

			levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	
4-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	5/sex/group 0 (vehicle), 0.3, 0.8, and 2.4 mg/kg once daily via oral gavage for 28 days (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate). Since severe toxicity noted, on D9, the dose levels were adjusted to 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 2.4 mg/kg.	[redacted]007D (M4.2.3.2-2)
13-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 15/sex/group TK satellite study: 4/sex/group (total 152 rats) oral daily dose via gavage for 13 weeks at 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]101R (M4.2.3.2-3)
13-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	5/sex/group 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 0.5 mg/kg once daily via oral gavage for 13 weeks (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]102D (M4.2.3.2-4)
26-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 20/sex/group TK satellite study: 4/sex/group (total 192 rats) oral daily dose via gavage for 26 weeks at 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for males and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]104R (M4.2.3.2-5)
39-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	7/sex/group 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 0.5 mg/kg once daily via oral gavage for 39 weeks (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]105D (M4.2.3.2-6)
Genotoxicity Studies				
Bacterial Reverse Mutation Assay (Ames Assay) (GLP)	*in vitro*	Bacterial/*S. typhimurium*	125-2000 µg/plate (calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]013B (M4.2.3.3.1-1)

Chromosomal Aberration Assay (GLP)	*in vitro*	Chinese Hamster Lung Cells	4h-treatment without S9: 10, 20, 50, and 75 µg/plate 24h-treatment without S9: 2, 4, 9, 12 µg/plate 4h-treatment with S9 20, 50, 100, and 120 µg/plate (calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]015C (M4.2.3.3.1-2)
Micronucleus Assay (GLP)	PO	ICR Mouse	6 male/group Single PO dose of positive control cyclophosphamide monohydrate at 80 mg/kg, CYH33 at 0 (negative vehicle), 5, 15, 50, 100, and 200 mg/kg for 2 days once daily by oral (PO) gavage (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	[redacted]017M (M4.2.3.3.2-1)
Reproductive and Developmental Toxicity				
Embryo-Fetal Toxicity (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	23 pregnant rats/main group, 5 pregnant rats/TK group 0 (vehicle), 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg from GD6 to GD15 (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	[redacted]009R (M4.2.3.5.2-1)
Phototoxicity				
In vitro 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity (GLP)	*In vitro*	Balb/c 3T3 cells	concentrations: 0.094, 0.202, 0.435, 0.936, 2.01, 4.33, 9.3, and 20 µg/mL	20213[redacted]03 (M4.2.3.7.7-1)
In vivo Phototoxicity (non-pigmented rats) (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 3/sex/group; TK satellite study: 3/sex/group Test article: Oral single dose via gavage at 0 (vehicle), 100, 300, and 600 mg/kg for males and 0 (vehicle), 3, 10, and 30 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate). Positive Control: 0.1% methoxsalen solution, 0.2 ml/site, single dose UVA irradiation (320–400 nm), 10 J/cm^2 for 54 min.	20213[redacted]04 (M4.2.3.7.7-2)
In vivo Phototoxicity (pigmented rats) (GLP)	PO	Rat/Brown Norway	Main study: 4/sex/group; TK satellite study: 3/sex/group	[redacted]23066[redacted]01 (M4.2.3.7.7-3)

			Test article: Oral daily dose via gavage for 3 days at 0 (vehicle), 100, 300, and 600 mg/kg for males and 0 (vehicle), 3, 10, and 30 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate). Positive control: 1 mg/mL 8-methoxypsoralen, 0.1 mL/site, for 3 days. UVA irradiation (320–400 nm), 10 J/cm^2 for 48 min.	

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; PO = oral; D: day; GD: Gestation Day

GLP 単回経口投与毒性試験において、CYH33 はラットでは 600 mg/kg まで、イヌでは 120 mg/kg まで良好な忍容性を示した（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）。したがって CYH33 の単回投与の最大耐量（MTD）はラットでは 600 mg/kg 以上、イヌでは 120 mg/kg 以上であった。

遺伝毒性試験として、ネズミチフス菌を用いた細菌復帰突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験及び *in vivo* マウス小核試験を実施した。CYH33 は評価したすべての遺伝毒性試験で陰性であった。

GLP 胚・胎児毒性試験では、SD ラットに CYH33（0.03、0.10、0.30 mg/kg、リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）を妊娠 6 日目（GD 6）から GD15 まで 1 日 1 回経口投与した。投与期間中、すべての投与群で用量依存的な体重増加の抑制が認められたが、その他に有意な臨床上の異常所見は認められなかった。0.3 mg/kg では生存胎児率の低下、着床後胚損失率の増加、死産および吸収胎児数の増加、胎盤及び胎児体重の減少、胎児の頭殿長及び尾長の減少、短尾／無尾、骨化遅延、骨格の奇形又は変異が認められ、AUC は 1090 ng·h/mL（臨床推奨用量 40 mg での AUC に基づいたヒト曝露量の 0.2 倍）であった。胚・胎児発生の無毒性量（NOAEL）は 0.1 mg/kg、AUC は 365 ng·h/mL（臨床推奨用量 40 mg での AUC に基づくヒト曝露量の 0.07 倍）であった。

ラット及びイヌを用いて一連の用量で連日経口投与による 28 日間 GLP 毒性試験を 2 試験実施し、その後 28 日間の回復期間を設けた。両試験でトキシコキネティクスパラメータを評価した。ラット及びイヌにおいて反復投与後に CYH33 の顕著な蓄積は認められなかった。これらの試験で特定された標的器官は、皮膚毛包、免疫・造血系、雌雄生殖器、消化管及び膵臓であった。所見はすべての用量において回復期間中に回復又は回復傾向を示した。イヌを用いた 28 日間 GLP 試験における重篤な毒性が発現しない最大用量（HNSTD）は 0.2 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）、NOAEL は 0.05 mg/kg であった。ラット試験における HNSTD は雄で 8 mg/kg、雌で 3 mg/kg であった（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）。同一用量では雌ラットは雄と比較して曝露量が多く毒性レベルが高かった。

ラットを用いた 13 週間 GLP 毒性試験において、SD ラットに CYH33 を様々な用量（雄：3、8 又は 24 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 1 日 1 回 13 週間連続強制経口投与した。24 mg/kg で雄ラットのみが不耐容であったが、他のすべての用量の忍容性は良好であった。HNSTD は雄で 8 mg/kg、雌で 3 mg/kg であった。毒性の主要標的器官は、大腿骨、造血・リンパ器官、生殖器（雌）、内分泌系器官（雌）、膵臓及び食道であった。4 週間の回復期間終了時において、雌の血液リンパ系器官及び生殖系の病理組織学的変化のみが完全には回復しなかったが、他の変化は完全に回復した。

イヌを用いた 13 週間 GLP 毒性試験において、ビーグル犬に CYH33 を 0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩換算用量）で 1 日 1 回 13 週間連続強制経口投与した。すべての動物が各用量で忍容性を示した。HNSTD は 0.5 mg/kg であった。毒性の主要標的器官は免疫系であり、主要な毒性は一過性の軟便及び血漿生化学検査値の変化であった。4 週間の回復期間後、すべての変化は完全に回復した。

ラットを用いた 26 週間 GLP 毒性試験において、SD ラットに CYH33 を様々な用量（雄：1、3 又は 8 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 26 週間連続強制経口投与した。8 mg/kg 群の雄では CYH33 に対する忍容性は認められず、死亡率は 1/20 であったが、3 mg/kg 群の雌では忍容性は良好であった。10%の動物で重篤な毒性が発現する投与量（STD_{10}）は雄で 8 mg/kg（この用量での Day 180 における CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 1080 ng·h/mL、I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 14.9 ng·h/mL）を上回り、HNSTD は雌では 3 mg/kg（この用量での Day 180 における CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 8950 ng·h/mL、I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 729 ng·h/mL）であった。毒性の主要標的器官は膵臓、骨、血液リンパ系器官及び雌の生殖器系であった。6 週間の回復期間後、雌の骨髄、膵臓、大腿骨及び卵巣の変化は回復傾向を示し、その他の変化は完全に回復した。

イヌを用いた 39 週間 GLP 毒性試験において、ビーグル犬に CYH33 を様々な用量（0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 39 週間連続強制経口投与した。雌雄ともにいずれの用量でも忍容性が認められた。HNSTD は 0.5 mg/kg（この用量での Day 273 における血漿中 CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は雌雄それぞれ 455 ng·h/mL 及び 470 ng·h/mL、雌雄の血漿中 I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値はそれぞれ 648 ng·h/mL 及び 429 ng·h/mL）であった。毒性の主要標的器官はリンパ器官／組織であった。6 週間の回復期間後、すべての変化は完全に回復した。

CYH33 は *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験において光毒性を示した。一方、SD ラット（アルビノラット）を用いた *in vivo* 光毒性試験においては CYH33 を雌では 30 mg/kg まで、雄では 600 mg/kg まで（リソバリシブメシル酸塩換算用量）単回投与した結果、光毒性は認められなかった。Brown Norway ラット（有色ラット）では、CYH33 を雌では 30 mg/kg、雄では 600 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩換算用量）までの用量で 3 日間連続投与しても光毒性は認められなかった。アルビノラット及び有色ラットにおける光毒性を発現しない最高用量での C_{max} は、臨床推奨用量 40 mg を投与したときの C_{max} の 3～10 倍であった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラットを用いた単回投与試験

Sprague Dawley（SD）ラット 32 匹（雌雄各 4 匹／群）に CYH33 投与 0（溶媒：1% HPMC 溶液）、30、150 及び 600 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）をランダムに割り付け、10 mL/kg の投与容量で単回強制経口投与した後、14 日間観察した（CTD 記載箇所：M4.2.3.1-1）。

本試験中に死亡は認められなかった。雌では CYH33 投与群で体重及び摂餌量の用量依存的減少が認められ、14 日間の観察期間終了時に回復した。本試験では一般状態観察所見及び肉眼所見に被験物質に関連した変化は認められなかった。

結論として、SD ラットに CYH33 を 600 mg/kg まで単回経口投与しても死亡又は瀕死を生じなかった。したがって MTD は 600 mg/kg 以上であり、また雌は雄に比較して CYH33 関連毒性に対する感受性が高かった。

2.6.6.2.2 イヌを用いた単回投与試験

本試験はビーグル犬に単回強制経口投与し、14 日間観察後に剖検のため安楽死処置した際の CYH33 の急性毒性を確認することを目的とした（CTD 記載箇所：M4.2.3.1-2）。雌雄各 1 匹／群のイヌ 8 匹に CYH33 の 0（溶媒：1% HPMC 溶液）、10、40 及び 120 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）をランダムに割り付け、投与容量 5 mL/kg で投与した。被験物質及びその代謝物の血漿中曝露レベルを評価するため、同時にトキシコキネティクス評価も実施した。一般状態観察所見、体重、摂餌量、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血漿生化学検査）及び剖検を実施した。

CYH33 及びその代謝物 I27 のトキシコキネティクスパラメータの要約を表 2.6.6-2 に示す。被験物質を投与したイヌにおける I27 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ CYH33 の 42.9%～83.3%及び 87.2%～117.4%であった。

表 2.6.6-2. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（単回投与試験）

Dose (mg/kg)	Gender	Animal ID	CYH33			I27		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
10	M	1201	1.0	680	3868.2	2.0	292	3598.2
	F	2201	2.0	337	4336.1	8.0	279	4714.5
40	M	1301	2.0	552	3708.1	4.0	294	3679.9
	F	2301	2.0	318	1985.6	2.0	151	1731.6
120	M	1401	1.0	1320	14795	8.0	1100	17371
	F	2401	2.0	711	5316.3	2.0	394	5760.8

本試験中に死亡は認められなかった。10 mg/kg 及び 40 mg/kg 群では、Day 2 の雌雄で様々な程度の WBC（主に NEUT）増加及び MONO のわずかな増加が認められたが、14 日間の観察期間終了時には回復した。

120 mg/kg 群の雌では、Day 1～8 に液状糞が認められ、Day 2～3 に摂餌量の顕著な減少が認められた。雌雄ともに Day 2 に WBC（主に NEUT）の増加及び MONO のわずかな増加が認められた。雄では Day 2 及び Day 7 に APTT に反映されるわずかな凝固遅延、及び Day 2 に GLU の増加が認められた。高用量群における血液学的検査値、血液生化学検査値及び凝固検査値の変化も観察期間終了時までに回復した。雄で胸腺皮質にリンパ球の軽度減少を伴う小胸腺が認められた。

全体としてイヌに CYH33 を 120 mg/kg までの用量で単回経口投与した際の忍容性は良好であった。MTD は 120 mg/kg 以上であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

GLP ピボタル反復投与毒性試験は、ラット及びイヌを用いて実施した。

2.6.6.3.1 ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験

この毒性試験の目的は SD ラットに 1 日 1 回 28 日間強制経口投与し、その後 28 日間の回復期間を置いて CYH33 の毒性を明らかにし、CYH33 毒性の可逆性、進行及び／又は遅延作用の可能性、並びに CYH33 及びその代謝物 I27 のトキシコキネティクス（TK）プロファイルを評価することであった（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-1）。

ラット 144 匹（主試験動物：雌雄各 15 匹／群、計 4 群。TK サテライト試験動物：雌雄各 3 匹／群、計 4 群）に CYH33 を 0（溶媒）、3、8 及び 24 mg/kg を 28 日間連日強制経口投与する群を割り付けた。雄は 0（溶媒）、3、8 及び 24 mg/kg、雌は 0（溶媒）、1、3 及び 8 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）とし、その後 28 日間の回復期間を設定した。28 日間の投与期間後に主試験のラット 80 匹（雌雄各 10 匹／群）を剖検し、28 日間の回復期間後に主試験の残りの 40 匹（雌雄各 5 匹／群）を剖検した。TK サテライト試験動物は、最終採血後に剖検せ

ずに安楽死処置した。一般状態観察所見、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査、持続血糖測定、インスリン測定、病理学的検査及び TK 評価を実施した。

TK（表 2.6.6-3）については、CYH33 及び I27 の T_{max} の平均値は近似しており雄の方が雌よりも早かった。曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24h}）は CYH33 及び I27 共に投与量の増加に伴い上昇した。I27 の C_{max} の平均値は雌で CYH33 の 2.8%～6.6%、雄で CYH33 の 1.5%～2.2%であった。I27 の AUC_{0-24h} の平均値は雌で CYH33 の 3%～5%、雄で CYH33 の 1.5%～2.3%であった。28 日間反復投与後の CYH33 及び I27 の蓄積比は、雌ではいずれの用量群においても 2 未満であり、雄では 24 mg/kg 用量群の CYH33 及びすべての用量群の I27 の蓄積比は 2 以上であった。

表 2.6.6-3. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（28 日間反復投与試験）

Gender	Dose (mg/kg)	Time	CYH33			I27		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
Female	1	Day 1	8.0±0.0	182±35.5	2852.5±634.5	8.0±0.0	9.10±3.4	140.3±45.4
		Day 28	4.7±2.9	237±29.7	3717.3±635.8	8.0±0.0	12.4±5.5	196.2±72.5
	3	Day 1	6.3±2.9	503±30.4	8075.3±1037.5	8.0±0.0	16.8±3.0	280.4±48.2
		Day 28	4.7±2.9	737±175.1	11545±2788.1	8.0±0.0	20.7±7.3	345.9±116.2
	8	Day 1	6.3±2.9	1070±142.9	18047±1986.8	8.0±0.0	70.1±61.4	999.6±713.2
		Day 28	4.7±2.9	1100±51.3	17268±1904.4	8.0±0.0	52.1±45.8	826.1±603.1
Male	3	Day 1	2.3±1.2	38.8±19.0	255.77±120.1	3.0±0.0	0.761±0.8	4.66±5.6
		Day 28	2.3±1.2	104±37.3	423.89±132.6	2.3±1.2	2.24±1.2	8.84±5.2
	8	Day 1	2.3±1.2	68.7±29.1	533.52±270.1	3.0±0.0	1.03±0.8	8.22±7.3
		Day 28	3.0±0.0	106±54.4	762.00±564.6	3.0±0.0	1.70±1.1	13.5±12.8
	24	Day 1	3.0±0.0	175±79.2	1506.4±592.4	3.0±0.0	3.58±3.6	31.0±28.7
		Day 28	3.0±0.0	558±126.7	5746.0±2433.3	4.7±2.9	11.0±5.8	130±84.4

TK 動物では異常は認められなかった。すべての CYH33 投与動物で、用量に比例して顕著な体重減少（最終体重を含む）が認められた。すべての被験物質投与群で摂餌量の減少も認められ、回復期間終了までに完全には回復しなかった。

高用量群（♂ 24 mg/kg、♀ 8 mg/kg）：

雌 1 匹で Day 24～Day 28 に被毛状態の異常、屈曲姿勢及びるい痩が認められた。雌では、Day 4～Day 21 に失禁が認められた。回復期間の終了時には、上記の所見は認められなかった。

投与期間の終了時に、雌雄で RET の減少、GLU、AST 及び CHOL の増加、A/G 及びイオン（Na、K、Cl）の減少が認められた。UGL はすべての雌で陽性であり、雄では 1/5 で陽性であった。持続的なグルコースの増加が、雌では Day 1 投与後、Day 28 投与前及び投与後、雄では Day 28 投与後に認められた。雌雄とも Day 1 投与後、並びに Day 28 投与前及び投与後にインスリンの増加が認められた。回復期間の終了時には、上記の変化は認められなかった。

脾臓、胸腺、子宮及び卵巣重量の顕著な減少が認められた。雌 2 匹で小胸腺が認められた。腹腔内滲出液が雄 1 匹及び雌 6 匹に認められた。胸腺、リンパ節及びパイエル板におけるリンパ球枯渇が、1 匹から一部の雄及び一部からすべての雌で認められた。胸骨・大腿骨骨髄の細胞充実度の減少がすべての雌及び数匹の雄でみられた。脾臓の髄外造血細胞枯渇はすべての動物で認められた。膵島細胞の過形／変性及び／又は膵島の洞様毛細血管拡張が一部の雄及び一部からすべての雌で認められた。皮膚の毛包萎縮及び大腿骨の成長板肥厚が 1 匹の雄及びすべての雌に認められた。大部分の雌で黄体の出血が認められた。回復期間の終了時には上記の変化は認められなかった。投与及び回復期間中、雌の大部分は発情間期又は発情後期であった。

中用量群（♂ 8 mg/kg、♀ 3 mg/kg）：

投与期間終了時、雌 1 匹で RET のわずかな減少が認められた。UGL は雌 1 匹及び雄 1 匹で陽性であった。雌では Day 1 及び Day 28 投与後に持続的グルコースの増加が認められた。インスリンの増加が、雌では Day 1 投与後並びに Day 28 投与前及び投与後、雄では Day 1 及び Day 28 投与後に認められた。肉眼的及び顕微鏡的病理学的変化の種類及び特性は高用量群と類似していたが、大部分は雌で発生し、発現率は低かった。雌のほとんどが発情休止期又は発情後期であったことを除き、回復期間終了時に上記の変化は認められなかった。

低用量群（♂ 3 mg/kg、♀ 1 mg/kg）：

インスリンの増加が、雌では Day 1 投与後並びに Day 28 投与前及び投与後、雄では Day 1 及び Day 28 投与後に認められた。脾臓（雌）、胸腺、子宮及び卵巣の重量減少が認められたが、上記の変化は回復期間終了時には認められなかった。

結論として、SD ラットに CYH33 を 28 日間連日経口投与したときの忍容性は良好であった。標的器官は毛包、免疫造血系、雌の生殖系及び膵臓であった。HNSTD は雄で 8 mg/kg、雌で 3 mg/kg であった。同一用量では、雌の方が曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）が高く、毒性反応が重度である傾向がみられた。代謝物 I27 の曝露量は、すべての CYH33 投与群において親化合物 CYH33 よりも有意に低かった（CYH33 の 7%以下）。

2.6.6.3.2 イヌを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験

この毒性試験の目的は、ビーグル犬に 1 日 1 回 28 日間強制経口投与し、その後 28 日間の回復期間を置いて CYH33 の毒性を明らかにし、CYH33 毒性の可逆性、進行及び／又は遅延作用の可能性、並びに CYH33 及びその代謝物 I27 のトキシコキネティクス（TK）プロファイルを評価することであった（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-2）。

イヌ 40 匹（雌雄各 5 匹／群）に CYH33 投与を 0（溶媒）、0.3、0.8 及び 2.4 mg/kg でランダムに割り付け 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。重度の毒性が認められたため、Day 9 に用量レベルを 0（溶媒）、0.05、0.2 及び 2.4 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）に調整した。さらに 2.4 mg/kg 群では Day 15 以降に雄 2 匹の投与を中止し、雄 1 匹は（中止日に安楽死処置）及び Day 20 以降に雌 1 匹の投与を中止し、Day 24 に別の雌 1 匹の投与を中止して Day 27 に安楽死処置した。一般状態観察所見、摂餌量、体重変化、眼科学的検査、体温、ECG、血圧、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血漿生化学検査及び尿検査）、持続血糖測定、インスリン測定、病理学的検査及び TK 指数をモニタリングして評価した。

すべての対照サンプル及び CYH33 投与群の投与前サンプルにおいて、CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかった。反復経口投与後、CYH33 及び I27 の平均曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、評価した用量範囲において、ほぼ用量比例的に、又はそれを下回る増加を示した。I27 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ CYH33 の約 40%～93%及び 90.9%～180%であった。2.4 mg/kg の CYH33 投与時、CYH33 及び I27 の蓄積比は雄で>2（Day 9:Day 1）、雌で<2（Day 9/28:Day 1）であった。低用量群では、CYH33 及び I27 の蓄積比は<2 であった（Day 28:Day 9）。曝露量に性差は認められなかった。TK パラメータを表 2.6.6-4 に要約する。

表 2.6.6-4. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（28 日間反復投与試験）

Day	Dose Level (mg/kg)	Sex	CYH33			I27		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)
Day 1	0.3	M	1.6±0.5	39.8 ±7.6	283±42.4	4.0±2.4	16.9±3.6	307±76.0
		F	1.6±0.5	42.5±15.8	320±97.0	9.6±8.3	19.9±5.0	361±95.2
	0.8	M	1.8±0.4	110±55.2	893±401.2	10.4±7.8	46.5±9.6	900±212.6
		F	1.0±0.0	90.6±24.7	658±241.4	8.0±9.3	39.1±11.5	715±260.7
	2.4	M	1.2±0.4	127±13.8	879±106.9	4.8±1.8	57.3±16.9	1061±386.8
		F	1.4±0.5	210±59.5	1660±462.6	9.2±8.7	84.3±39.5	1502±603.2
Day 9	0.05	M	1.2±0.4	8.20±1.0	62±9.8	0.7±0.3	17.5±8.5	227±123.2
		F	1.2±0.4	7.63±1.5	57±10.7	0.5±0.0	23.3±7.0	271±98.7
	0.2	M	1.3±0.7	33.4±12.8	288±150.5	0.4±0.2	64.0±13.7	794±158.1
		F	1.2±0.4	36.8±12.2	267±89.9	0.6±0.9	45.6±20.1	609±249.4
	2.4	M	2.2±1.1	286±198.3	2870±2038.1	5.2±2.7	266±197.9	5154±3911.6
		F	2.7±1.8	232±95.7	2558±1438.1	9.6±8.3	124±47.7	2509±947.3
Day 28	0.05	M	1.6±0.5	6.23±1.9	49±9.8	2.0±1.2	3.65±1.2	70±30.8
		F	1.6±0.5	8.62±1.8	58±6.4	3.6±0.9	5.08±1.0	94±25.0
	0.2	M	1.8±0.4	30.0±13.4	235±93.7	3.6±0.9	17.3±6.0	341±101.0
		F	1.2±0.4	25.5±12.9	191±81.9	7.2±9.4	14.2±4.9	266±107.3
	2.4	M	3.0±1.4	213±205.8	2515±2410.4	6.0±2.8	177±159	3562±3074.9
		F	1.7±0.6	212±57.4	1682±244.1	3.3±1.2	109±14.0	1983±413.6

Note: Due to toxicity effects, dose of CYH33 was discontinued in some dogs in 2.4 mg/kg group during the study and the sample sizes of male and female used for the mean parameter calculation on Day 28 were 2 and 3, respectively.

不定期剖検を実施した動物：

高用量群（2.4 mg/kg）：重度の毒性作用のため、雄 1 匹及び雌 1 匹をそれぞれ Day 20 及び Day 27 に安楽死させた。体重及び摂餌量の減少が認められた。るい痩、自発運動低下、体位変化、口腔粘膜病変、跛行、流涎、鼻口部腫脹、便変化、眼／口腔内分泌物などが認められた。RET、A/G、Cl の有意な減少及び WBC、NEUT、ALP、TG、CHOL の増加が認められた。雄では RBC、HGB、HCT の増加及び Na の減少も認められた。小胸腺及び皮膚潰瘍が認められた。雄イヌでは、消化管（GI）に液体及び黒い内容物が認められた。顕微鏡所見として、膵臓における軽度又は中等度の腺房細胞変性／萎縮並びに胸腺、リンパ節（腸間膜及び下顎）、パイエル板及び脾臓における様々な重症度のリンパ球枯渇が認められ、また、下顎リンパ節における急性炎症、消化管における粘膜びらん／潰瘍形成、腺上皮空胞化及び腺拡張、並びに皮膚における炎症を伴う潰瘍形成が認められた。

予定剖検を実施した動物：

高用量群

投与期間中、顕著な体重及び摂餌量の減少が認められた。一部又は大部分の動物で軟便／液状便／粘液便、自発運動低下、口腔粘膜病変、体位変化、流涎、るい痩、皮膚張力変化、振戦／震え、跛行、眼、口腔及び鼻孔からの分泌が認められ、一部のイヌでは鼻口部の腫脹が生じ、一部の臨床徴候は回復期間まで継続した。Day 13 の雄及び Day 20 の雌で軽度の体温上昇が認められた。Day 28 に雄で SBP 及び MBP の低下が認められた。上記の変化は回復期間終了時に消失したが雄 1 匹の角膜表面にわずかな混濁点が認められ、これは眼周囲の分泌物増加に関連すると考えられた。

RET、A/G の有意な減少、WBC、NEUT、CHOL の増加、APTT の延長、Na、K 及び Cl（雄のみ）の減少などの投与期間中の臨床病理学的変化が認められた。持続的なグルコースの増加が、個々の動物で Day 1 及び Day 9 の投与後に認められた。インスリン値の上昇が、個々の動物で Day 1 及び Day 28 の投与後に認められた。回復期間の終了時には上記の変化は認められなかった。

投与期間終了時に、小胸腺（雄の 2/3 及びすべての雌）、皮膚及び／又は口腔内の潰瘍（雄 2/3 匹）などの剖検所見が認められた。胸腺重量の絶対的及び相対的（体重及び脳重量に対する）減少が認められた。顕微鏡所見は以下のとおりであった。雄 1/3 匹に軽度又は中等度の腺房細胞変性／萎縮が認められた。一部の動物では、胸腺／リンパ節／パイエル板に軽度から中等度のリンパ球枯渇が認められた。骨髄中の骨髄細胞の軽度増加が雄の 2/3 匹に認められた。雄 1/3 匹に胃の腺粘膜拡張（慢性炎症を伴う）及び大腸の粘膜腺拡張が認められた。雄 2/3 匹では精巣に軽度又は中等度の精細管変性／萎縮が認められ、うち 1 匹では精巣上体の精子減少症を伴っていた。雄 2/3 匹では口腔内及び／又は皮膚潰瘍とそれに伴う慢性活動性炎症が認められた。胸腺の軽度のリンパ球枯渇並びに精巣及び精巣上体の変化が雄 1 匹になお認められたことを除き、上記の変化はすべて回復期間終了時に回復した。これらの変化は 2.4 mg/kg 群の剖検を予定された個体と不定期剖検した個体とで同様であった。

中用量群

投与期間中、軟便／液状便、自発運動の低下及び嘔吐が時折認められた。個々の動物に顕著な摂餌量減少が認められた。インスリン値のわずかな上昇が、個々の動物で Day 1 及び Day 28 の投与後に認められた。雄では Day 8 に RET の減少並びに WBC 及び NEUT の増加が認められ（一部は顕著）、雄 1 匹では Day 8 に APTT の延長、Na、Cl 及び A/G のわずかな減少が認められた。上記の変化は用量レベル調整により回復又は回復傾向を示した。

投与期間終了時に雄 1/3 匹及び雌 2/3 匹に小胸腺を含む剖検所見が認められた。投与期間終了時に、軽度又は中等度の腺房細胞の変性／萎縮（雄 2/3 匹）、並びに胸腺における軽微～中等度のリンパ球枯渇（すべての雄、雌 2/3 匹）などの顕微鏡的所見が認められた。回復期間終了時、雌 1/2 匹で小胸腺が維持され、被験物質に起因するほかの顕微鏡的変化は認められなかった。

低用量群

個々の動物にインスリン値のわずかな上昇が認められたことを除き、試験期間中、被験物質に関連したそのほかの所見及びパラメータの変化は認められなかった。

結論として、イヌに 2.4 mg/kg の CYH33 を 28 日間反復投与したとき、忍容性は認められず、主な標的器官は皮膚／粘膜、免疫／造血系、消化管、膵臓及び雄の生殖器系であり、CYH33 の毒性は用量依存的であった。いずれの変化も 28 日間の回復期間後に回復又は回復傾向を示した。HNSTD は 0.2 mg/kg、NOAEL は 0.05 mg/kg であった。イヌにおける I27 の血漿中曝露量は CYH33 と同程度であった。イヌにおける毒性作用及び血漿中曝露量に性差は認められなかった。

2.6.6.3.3 ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験

SD ラット 13 週間毒性試験（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-3）において、SD ラット 152 匹（主試験群：雌雄各 15 匹／群、計 4 群。TK サテライト群：雌雄各 4 匹／群、計 4 群）に CYH33 を様々な用量（雄：3、8 又は 24 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で、又は溶媒（1% HPMC 溶液）を投与容量 5 mL/kg で、1 日 1 回 13 週間連続投与し、その後 28 日間の回復期間を設けた。主試験群の動物は、投与期間終了時（Day 92）又は回復期間終了時（Day 120）に安楽死させ、剖検に供した。TK サテライト群の動物は最終採血後に安楽死処置したが、剖検は実施しなかった。試験中に以下のパラメータ、すなわち一般状態観察所見、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血漿生化学検査及び尿検査）、病理学的検査（肉眼的検査、器官重量及び病理組織学的検査）を評価し、また同時にトキシコキネティクス評価を行った。

主な結果を以下に示す。

TK：すべての投与群の初回投与前血漿サンプル中及び溶媒対照群の血漿サンプル中に、CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかった。CYH33 及び I27 はいずれも、各投与群の投与後にすべての動物で検出された。最高濃度到達時間：血漿中 CYH33 及び I27 の T_{max} の平均値は雌雄とも Day 1 で 3.0～8.0 h であった。Day 91 の雌の血漿における CYH33 の平均 T_{max} は 3.0～6.8 h、I27 の平均 T_{max} は 8.0 h であった。雄の血漿における CYH33 の平均 T_{max} は 3.0 h、I27 の平均 T_{max} は 3.0～5.5 h であった。雌雄の血漿中では、CYH33 及び I27 の平均 T_{max} に用量依存性は認められなかった。曝露量：Day 1（0.3～1 mg/kg 投与時）及び Day 91（0.3～3 mg/kg 投与時）の雌における平均曝露量（平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ により評価）は、用量の増加に伴い、おおむね、用量比を上回るか、ほぼ用量比例的に増加した。雄における平均曝露量（平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ により評価）は、用量の増加に伴い、Day 1（8～24 mg/kg 投与時）では用量比をわずかに下回るか、用量比例的に増加し、Day 91（3～24 mg/kg 投与時）では用量比を上回って増加した。I27 の C_{max} の平均値は CYH33 の 1.3%～7.9%、$AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は CYH33 の 0.5%～8.6%であった。蓄積比：13 週間連続投与後、24 mg/kg 投与の雄の CYH33 及び I27 の蓄積比の平均値のみがそれぞれ 8.0 及び 56.8 に達し（個体 M1802 の AUC が高かったため参考値扱い）、そのほかの用量での蓄積比は 1.3～2.1 であった。詳細は表 2.6.6-5 を参照。

予定外剖検を実施した動物：

24 mg/kg 投与の主試験群の雄 15 匹中 3 匹（M1404、M1408 及び M1409）は、それぞれ Day 76、Day 53 及び Day 77 に死亡を認めたか又は福祉のために安楽死処置した。そのほか、同用量の TK サテライト群の雄 2/4 匹（M1801 及び M1804）でそれぞれ Day 77 及び Day 82 に死亡が認められた。雄 1 匹（M1408）で、Day 46 から腹部膨満、被毛の汚れ及び耳の蒼白化が認められた。体重は約 10%有意に減少し、摂餌量は顕著に減少した。この動物は福祉のため Day 53 に安楽死処置した。主試験群のほかの 2 匹では、Day 57 以降に歯肉の口腔粘膜病変、腹部膨満、被毛の汚れ、屈曲姿勢及びるい痩が認められた。雄 1 匹（M1404）は Day 76 に死亡が認められ、ほかの雄 1 匹（M1409）は Day 77 に福祉のため安楽死処置した。上記のラットから病理学的検査用に血液サンプルを採取し、検査した。主な変化は、HGB、HCT、RET、PLT、WBC（主に LYMP）、ALB、CL の減少、FIB の増加、ALT、AST、GGT、TBIL、UREA、GLU、CHOL の増加などであった。被験物質に関連した異常として、胸腺、脾臓、前立腺及び精嚢の小型化、胸腺、膵臓及び大腿二頭筋のゼリー状変化、並びに胸腔及び腹腔内の滲出液などが肉眼的病理検査で観察された。病理組織学的検査における被験物質関連の変化は、大腿骨（成長板の物理的異形成）、血液リンパ系器官（脾臓の萎縮／色素沈着／アミロイドーシス、そのほかの器官の細胞充実性低下）、膵臓（島細胞の過形成及び変性、膵島の類洞の拡張、間質性浮腫及び色素性マクロファージの増加）、複数の器官の萎縮（食道、皮膚、角膜、前立腺、精嚢、気管、唾液腺-顎下腺及びハーダー腺の上皮萎縮、下垂体及び甲状腺の萎縮）、精巣（精母細胞の変性／壊死）、精巣上体（細胞残屑及び上皮の単細胞壊死）、副腎（束状帯の肥大及びうっ血／出血）、心臓（心筋変性／壊死）及び肺（出血及び肺胞マクロファージの増加）に認められた。そのほかのラットは計画剖検時まで生存した。

予定剖検を行った動物：

高用量群（♂ 24 mg/kg、♀ 3 mg/kg）：

一般状態観察所見：Day 58 より雄 1 匹のみに、歯肉の口腔粘膜病変、腹部膨満、るい痩、被毛の汚れ、屈曲姿勢、耳の蒼白化及び自発運動の低下が認められた。投与中止後、上記症状は回復せず、続いて両側精巣の小型化、下口唇の口腔粘膜病変が相次いでみられ、ときに流涎増加がみられた。

体重及び摂餌量：雌雄とも体重及び摂餌量が顕著に減少した。投与中止後、雄の体重及び摂餌量は回復しなかったが、体重は回復傾向を示した。雌の体重は回復傾向を示し、基本的に摂餌量は回復した。上述の変化は、雄よりも雌でわずかに顕著であった。

病理学的検査：投与期間終了時に雌雄で最終体重及び脾臓重量の減少が認められた。雌では胸腺、副腎及び子宮の重量減少も認められた。大腿骨における成長板の骨端軟骨異形成、血液リンパ系器官における細胞充実性の低下（髄外造血の減少及び脾臓における色素沈着）、食道における上皮萎縮、膵臓における島細胞の過形成及び間質浮腫が雌雄で観察された。そのほか、雌では卵巣及び子宮の萎縮並びに膣粘膜の萎縮、黄体の出血及び色素沈着、並びに内分泌器官（下垂体、甲状腺及び副腎）の萎縮が認められた。上述したすべての変化の発現率及び程度は、雄より

も雌で高かった。回復期間終了時には、雄の最終体重のみが減少し、回復しなかったが、回復傾向を示した。雌の最終体重の変化並びに卵巣及び胸骨骨髄の病理組織学的変化は未回復であったが、回復傾向を示した。そのほかの病理組織学的変化は完全に回復した。

中用量群（♂ 8 mg/kg、♀ 1 mg/kg）：

体重及び摂餌量：雌雄とも体重及び摂餌量は用量依存的に減少したが、その程度は高用量群よりも軽度であった。

病理学的検査：投与期間終了時の器官重量の変化は、雌雄とも高用量群と同様であったが、高用量群よりも軽度であった。血液リンパ系器官の細胞充実性低下（雌の脾臓における髄外造血の減少及び脾臓における色素沈着）が雌雄ともに認められた。そのほか、雌では内分泌器官（下垂体及び副腎）及び食道上皮の萎縮が認められた。上記の病理組織学的変化の発現率及び重症度は、いずれも高用量群よりも低かった。回復期間終了時には、すべての雄で上述の変化は回復し、雌では依然として胸骨骨髄の造血細胞における細胞充実性の低下が認められた。

低用量群（♂ 3 mg/kg、♀ 0.3 mg/kg）：

病理学的検査：投与期間終了時の器官重量の変化は、雌雄とも中用量群と同様であったが、中用量群よりも軽度であった。脾臓における髄外造血の減少のみが雄で認められた。雌では、血液リンパ系器官の細胞充実性低下及び内分泌系器官（下垂体及び副腎）の萎縮が認められた。上記の病理組織学的変化の発現率及び重症度は、いずれも中用量群よりも低かった。上記の雌雄の変化は回復期間終了時に完全に回復した。

試験期間中、いずれのラットにも、眼科学的検査、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学検査、尿検査及び肉眼的病理検査において、被験物質に関連した有意な変化は認められなかった。

結論として、本試験の条件下で SD ラットに様々な用量（雄：3、8 又は 24 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg）の CYH33 を 13 週間連続で強制経口投与したところ、24 mg/kg を投与した雄では CYH33 に対する忍容性は認められなかったが、ほかの用量を投与したラットでは忍容性は良好であった。HNSTD は雄で 8 mg/kg、雌で 3 mg/kg であった。該当用量の Day 91 における CYH33 及びその代謝物 I27 の平均 $AUC_{0\text{-}t}$ は、雄でそれぞれ 915 ng·h/mL 及び 14.2 ng·h/mL、雌でそれぞれ 8250 ng·h/mL 及び 407 ng·h/mL であった。毒性の主要標的器官は、大腿骨、造血・リンパ器官、生殖器（雌）、内分泌系器官（雌）、膵臓及び食道であった。雌の血液リンパ系器官及び生殖器系の病理組織学的変化のみが完全には回復しなかった。

表 2.6.6-5. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（13 週間反復投与試験）

CYH33

Gender	Dose level (mg/kg)		Day 1 Gender (h)	Day 1 Dose level (mg/kg)	Day 1 AUC_{0-t} (ng·h/mL)	Day 91 Gender (h)	Day 91 Dose level (mg/kg)	Day 91 AUC_{0-t} (ng·h/mL)
F	0.3	Mean	8.0	36.3	558	6.8	55.3	915
		SD	0	3.61	57.7	2.5	12.9	209
		N	4	4	4	4	4	4
	1	Mean	8.0	156	2360	3.0	240	3050
		SD	0	54.8	787	0	30.9	345
		N	4	4	4	4	4	4
	3	Mean	5.5	58.1	862	4.3	529	8250
		SD	2.9	4.69	138	2.5	75.5	1730
		N	4	4	4	4	4	4
M	3	Mean	3.0	3.26	7.01	3.0	38.4	183
		SD	0	0.694	1.91	0	19.8	79.7
		N	4	4	4	4	4	4
	8	Mean	3.0	95.2	572	3.0	169	915
		SD	0	21.2	121	0	38	227
		N	4	4	4	4	4	4
	24	Mean	3.0	202	1950	3.0	967	*15600
		SD	0	106	1140	0	1050	18700
		N	4	4	4	2	2	2

Note: The TK parameters of the animals at 3 mg/kg (both males and females) on Day 1 were abnormally low, it cannot rule out the abnormal data of TK caused by the insufficient mixing of the formulation before dosing and the upper side of the dosing formulation extraction. Therefore, the individual concentration and TK parameters of Day 1 at 3 mg/kg were just presented as reference only, but they were not involved into the TK evaluation.
*Because the AUC of 1802M individual is high, this mean value is only for reference.

（表の続き）I27

Gender	Dose level (mg/kg)		Day 1 T_{max} (h)	Day 1 C_{max} (ng/mL)	Day 1 AUC_{0-t} (ng·h/mL)	Day 91 T_{max} (h)	Day 91 C_{max} (ng/mL)	Day 91 AUC_{0-t} (ng·h/mL)
F	0.3	Mean	8.0	0.975	14.4	8.0	1.75	28.8
		SD	0	0.284	4.7	0	0.411	6.10
		N	4	4	4	4	4	4
	1	Mean	8.0	8.79	132	8.0	11.6	188
		SD	0	5.31	80.3	0.0	6.94	111
		N	4	4	4	4	4	4
	3	Mean	8.0	2.67	40.0	8.0	25.4	407
		SD	0.0	1.84	26.6	0	15.3	231
		N	4	4	4	4	4	4
M	3	Mean	-	0	0	3.0	0.680	0.981
		SD	-	0	0	0	0.375	0.523
		N	0	4	4	4	4	4
	8	Mean	3.0	1.34	6.88	3.0	2.84	14.2
		SD	0	0.746	4.02	0	2.02	10.7
		N	4	4	4	4	4	4
	24	Mean	3.0	2.69	23.6	5.5	76.8	*1340
		SD	0	2.28	28.8	3.5	106	1890
		N	4	4	4	2	2	2

Note: The TK parameters of the animals at 3 mg/kg on Day 1 were presented as reference only.
-, the concentrations in the samples were lower than LLOQ and not available for calculation.
*, Because the AUC of 1802M individual is high, this mean value is only for reference.

2.6.6.3.4 イヌを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験

ビーグル犬 13 週間毒性試験（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-4）において、ビーグル犬 40 匹（雌雄各 20 匹、雌雄各 5 匹／群、計 4 群）に CYH33 を様々な用量で（0.05、0.2 及び 0.5 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）又は溶媒（1% HPMC 溶液、0 mg/kg）を投与容量 0.5 mL/kg で、1 日 1 回 13 週間連続投与し、その後 27 日間の回復期間を設けた。投与期間終了時（Day 92）に 24 匹（雌雄各 3 匹／群）を剖検し、回復期間終了時（Day 119）に残りの 16 匹（雌雄各 2 匹／群）を剖検した。次のパラメータ、すなわち一般状態観察所見、眼科学的検査、体重、摂餌量、体温（直腸温）、ECG、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査及びトキシコキネティクスを評価した。結果は以下のとおりである。

TK：すべての投与群の初回投与前血漿サンプル中及び溶媒対照群の血漿サンプル中に、CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかった。CYH33 及び I27 はいずれも各投与群の投与後のすべての個体で検出された。Day 1 及び Day 91 における血漿中 CYH33 の最高濃度到達時間（T_{max}）の平均値は、0.05 mg/kg 投与群の雌雄で 1.4～3.0 h、0.5 mg/kg 投与群の雄で 1.8～3.0 h であり、雌雄ともに用量の増加に伴う T_{max} の平均値の有意な変化は認められなかった。血漿中の I27 の平均 T_{max} は、雌で 3.0～10 h、雄で 3.0～7.2 h であり、雌雄とも平均 T_{max} に用量依存性は認められなかった。雌雄ともに CYH33 及び I27 の血漿中曝露量（平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-t}）は用量の増加に伴い増加した。雄における CYH33 及び I27 の血漿中曝露量は、Day 1 には用量比をわ

ずかに上回る増加を示し、ほかの測定日ではほぼ用量比例的に、又はそれを下回る増加を示した。Day 1 及び Day 91 には、I27 の C_{max} 平均値は CYH33 の 42.7%～70.7%、AUC_{0-t} 平均値は CYH33 の 93.7%～159.7%であった。I27 の蓄積比（Day 91/Day 1）の平均値は 0.05 mg/kg 投与の雌、雄及び 0.5 mg/kg 投与の雌でそれぞれ 2.2、2.1 及び 2.2 であり、そのほかの条件では有意な蓄積は認められなかった。雌雄各用量における CYH33 及び I27 の C_{max} 比及び AUC_{0-t} 比（雌／雄）の平均値は 0.9～1.4 であり、有意な性差は認められなかった。詳細は表 2.6.6-6 を参照。

試験期間中、いずれの動物にも予定外の死亡は認められなかった。

0.5 mg/kg：一部の個体でのみ、投与期間中に一過性の軟便又は時折餌を含む吐物が認められた。雄では A/G のわずかな減少（主に GLOB のわずかな増加）が認められた。一部の雌で ALT の上昇が認められた。病理組織学的検査では、雌雄ともに腸間膜リンパ節及び腸管関連リンパ組織におけるリンパ球の細胞充実性の軽微な低下が示された。上記の変化は回復期間終了時には認められなかった。

0.2 mg/kg 及び 0.05 mg/kg：試験期間中、雌雄いずれの測定パラメータにも、被験物質と関連のある変化は認められなかった。

試験期間中、いずれの動物にも、体重、摂餌量、眼科学的検査、体温（直腸温）、ECG、血液学的検査、凝固検査、尿検査、肉眼的病理検査又は器官重量において、被験物質に関連した有意な変化は認められなかった。

結論として、本試験の条件下で、ビーグル犬に 0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg の CYH33 を 13 週間連続して強制経口投与した後、投与量はすべての動物で忍容性が認められた。HNSTD は 0.5 mg/kg であった。この用量で Day 91 における CYH33 の平均 AUC_{0-t} は、雌及び雄でそれぞれ 509 ng·h/mL 及び 471 ng·h/mL、その代謝物 I27 の平均 AUC_{0-t} はそれぞれ 813 ng·h/mL 及び 624 ng·h/mL であった。毒性の主要標的器官は免疫系であり、主要な毒性は一過性の軟便及び血漿生化学検査値の変化であった。

表 2.6.6-6. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（13 週間反復投与試験）

CYH33

Dose level (mg/kg)	Gender		Day 1 T_{max} (h)	Day 1 C_{max} (ng/mL)	Day 1 AUC_{0-t} (ng·h/mL)	Day 91 T_{max} (h)	Day 91 C_{max} (ng/mL)	Day 91 AUC_{0-t} (ng·h/mL)
0.05	M	Mean	2.2	4.38	31.1	2.6	7.52	49.3
		SD	1.1	1.49	17.1	0.89	1.56	20.9
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	3.0	4.86	43.5	2.6	8.02	69.0
		SD	0.0	1.82	11.0	0.89	2.64	20.3
		N	5	5	5	5	5	5
0.2	M	Mean	2.2	22.4	191	2.6	25.2	206
		SD	1.1	1.72	25.5	0.89	6.19	40.1
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	1.4	22.3	189	2.6	26.2	230
		SD	0.89	2.40	20.3	0.89	6.32	59.6
		N	5	5	5	5	5	5
0.5	M	Mean	1.8	48.5	396	3.0	51.2	471
		SD	1.1	15.9	127	0.0	15.5	153
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	1.8	41.9	379	2.2	57.7	509
		SD	1.1	15.0	89.1	1.1	22.7	210
		N	5	5	5	5	5	5

I27

Group (mg/kg)	Gender		Day 1 T_{max} (h)	Day 1 C_{max} (ng/mL)	Day 1 AUC_{0-t} (ng·h/mL)	Day 91 T_{max} (h)	Day 91 C_{max} (ng/mL)	Day 91 AUC_{0-t} (ng·h/mL)
0.05	M	Mean	7.2	1.90	33.3	3.0	4.11	69.6
		SD	9.4	0.547	9.99	0.0	0.811	20.2
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	10	2.31	45.8	3.0	5.52	99.7
		SD	8.0	0.616	13.7	0.0	1.57	34.5
		N	5	5	5	5	5	5
0.2	M	Mean	6.0	10.4	196	7.2	16.3	293
		SD	2.7	1.59	39.7	9.4	3.73	96.2
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	5.0	9.80	177	3.0	15.9	277
		SD	2.7	1.30	21.6	0.0	5.42	120
		N	5	5	5	5	5	5
0.5	M	Mean	6.0	20.7	392	7.2	35.4	624
		SD	2.7	9.27	189	9.4	18.5	360
		N	5	5	5	5	5	5
	F	Mean	10	18.4	371	6.0	40.8	813
		SD	8.0	4.07	88.8	2.7	19.6	480
		N	5	5	5	5	5	5

2.6.6.3.5 ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験

SD ラット 26 週間毒性試験（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-5）において、SD ラット 192 匹（主試験群：雌雄各 20 匹／群、計 4 群。TK サテライト群：雌雄各 4 匹／群、計 4 群）に CYH33 を様々な用量（雄：1、3 又は 8 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で、又は溶媒（1% HPMC 溶液、0 mg/kg）を投与容量 5 mL/kg で、強制経口投与により 1 日 1 回 26 週間連続投与し、その後 6 週間の回復期間を設けた。主試験群の動物は、投与期間終了時（Day 181）又は回復期間終了時（Day 224）に剖検に供した。TK サテライト群の動物は最終採血後に安楽死させたが、剖検は実施しなかった。試験期間中、一般状態観察所見、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、凝固検査、血漿生化学的検査、尿検査、肉眼的病理検査、器官重量、顕微鏡的病理検査及びトキシコキネティクスなどのパラメータを評価した。主な結果を以下に示す。

トキシコキネティクス：

溶媒対照群の血漿サンプル中にも、いずれの投与群の初回投与前の血漿サンプルにも CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかった。CYH33 は各投与群の投与後のすべての動物で検出され、I27 は Day 1 の低用量群の一部の雄を除いて投与後のすべての動物で検出された。最高濃度到達時間（T_{max}）：Day 1、Day 91 及び Day 180 において、各投与群の雄の血漿中の CYH33 及び I27 の T_{max} の平均値はそれぞれ 2.5～3.0 h 及び 2.5～3.0 h、雌の血漿中の CYH33 及び I27 の T_{max} の平均値はそれぞれ 3.0～5.5 h 及び 4.3～8.0 h であった。CYH33 及び I27 の平均 T_{max} の変化は、用量の増加に伴って顕著ではなかった。曝露量（平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-t}）：Day 1、Day 91 及び Day 180 の血漿中 CYH33 及び I27 の平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-t} は、雌雄とも用量の増加に伴って増加した。CYH33 はほぼ用量比例的に増加し、I27 はおおむね用量比例的に、又はそれを上回る増加を示した。各投与群において、I27 の C_{max} の平均値は CYH33 の 0.9%～12.7%、AUC_{0-t} の平均値は CYH33 の 0.2%～11.9%であり、I27 の曝露量は CYH33 と比較して明らかに低かった。蓄積比：反復投与後、いずれの投与群の雌雄においても CYH33 の明らかな蓄積は認められず、I27 の明らかな蓄積は、雌ではいずれの投与群においても認められず、雄では 3 及び 8 mg/kg 群において認められなかった。Day 91/Day 1 及び Day 180/Day 1 の平均 I27 蓄積比は、1 mg/kg 投与群の雄でそれぞれ 3.1 及び 3.0 であった（この群の Day 1 の平均 AUC は、この用量群の 2 匹で I27 が検出されなかったため、低値であった）。性差：同一用量において、雄の CYH33 及び I27 の曝露量は雌に比べて明らかに低かった。TK パラメータの関連データの詳細を表 2.6.6-7 に示す。

予定外に死亡した動物

8 mg/kg 群の雄 1 匹が Day 163 に死亡した。Day 147 より耳の蒼白化、るい痩、被毛の汚れ、歯肉粘膜の病変、切歯の破損、屈曲姿勢、軽度の流涎、左眼の赤み、頬及び後脚／足の腫脹、四肢の蒼白／皮膚温低下の症状がみられた。体重及び摂餌量は Day 43 以降継続して減少した。肉眼的所見として胸腔に黄色透明の滲出液が認められた。顕微鏡的所見として、大腿骨の骨端軟骨の著明な異形成、胸骨骨髄における造血細胞の細胞充実性の顕著な低下、脾臓における色素沈着の

軽度増強を伴う顕著な萎縮、腸間膜リンパ節における軽度の色素沈着を伴うリンパ球の顕著な減少、腸管関連リンパ組織におけるリンパ球の顕著な減少などが認められた。上記の顕微鏡的所見に加え、この動物の複数の器官に炎症性／非炎症性の増殖性細菌が認められ、したがって、死因は被験物質に関連した免疫機能障害による敗血症と考えられた。

3 mg/kg を投与した雄 1 匹は Day 59 に瀕死となり安楽死された。当該動物は Day 46 から腹部膨張、軽度の運動活動低下、耳と四肢の蒼白、口吻部と前肢の赤染、毛繕い不足、不安定な歩行、猫背の姿勢などの症状が観察された。体重は Day 47 から徐々に増加、又は減少した。当該動物は Day 59 に安楽死された。臨床病理学的検査では、RBC、HGB、HCT、MCHC、TP、ALB、Na、Cl の減少、APTT の短縮、RDW、RET、PLT、WBC、NEUT、ALT、AST、ALP、GGT、CK、TBIL、GLU、UREA、CREA、K の増加が認められた。肉眼的所見では、右腎臓に腫瘤、肝臓の硬組織化かつ暗赤色への変色、胸腺と脾臓の縮小、副腎の腫大かつ右副腎の蒼白化、網の多発性白色結節かつ暗赤色への変色が認められた。顕微鏡検査では、腫瘤は悪性腎間葉系腫瘍と診断され、右腎を置換し、隣接組織の圧迫及び梗塞を引き起こした。当該動物の死因は被験物質との関連ではなく、自然発生性の腫瘍によるものと判断された。

計画剖検を行った動物：

一般状態観察所見：Day 43 以降、中及び高用量群の雌で耳の蒼白化、雄個体で腹部膨満が認められた。Day 45 以降、高用量群の少数の雌で口腔粘膜の病変、雄個体で耳の腫脹が認められた。これらの変化はおおむね用量依存的であった。投与中止後、上記症状は回復傾向を示し、回復期間終了時にはいずれの動物にも異常はみられなかった。

体重・摂餌量：投与期間中、中及び高用量群の雄並びに各用量群の雌の体重は用量依存的に緩徐に増加又はわずかに減少し、これに伴って摂餌量は用量依存的にわずかに減少した。回復期間中には、各群の雌雄とも体重増加量は正常又は対照群より高値に回復し、摂餌量も正常に回復した。

血液学的検査・血漿生化学的検査：投与期間終了時に高用量群の雌で RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、WBC 及び LYMP の減少並びに RDW、UREA 及び CHOL の増加がみられた。中用量群では HGB、HCT、MCV 及び MCH のわずかな減少並びに CHOL の増加が認められた。これらの変化はおおむね用量依存的であった。回復期間終了時の各群の血液学的検査値及び血漿化学的検査値に異常は認められなかった。

臓器重量：投与期間終了時に高用量群の雄で最終体重の減少、中及び高用量群の雄で絶対的及び相対的脾臓重量の減少が認められた。すべての投与群の雌で最終体重の減少並びに絶対的及び相対的脾臓重量、副腎重量及び子宮重量の減少が認められた。回復期間終了時には、すべての投与群の雌雄で最終体重の減少が持続していた。

顕微鏡的病理検査：投与期間終了時に CYH33 を投与したすべての雄の膵臓に顕微鏡的所見（膵島細胞過形成及び線維症）が認められた。膵臓（膵島細胞過形成）、大腿骨（骨端軟骨異形成）、血液リンパ系器官（胸骨骨髄、脾臓、胸腺及び腸間膜リンパ節の細胞充実性低下、脾臓及

び腸間膜リンパ節での色素沈着の増強）、生殖器官（卵巣における萎縮、卵胞嚢胞及び出血、子宮／子宮頸部の萎縮）の顕微鏡的所見が高用量群の雌に認められた。上記の顕微鏡所見は、中用量群の雌の膵臓、血液リンパ系器官及び生殖器官、並びに低用量群の雌の膵臓、血液リンパ系器官及び卵巣にも認められた。しかし、発現率及び重症度は用量依存的に低下した。さらに、すべての CYH33 投与群の雌の一部で膵外分泌腺／顎下唾液腺の分泌枯渇及び食道粘膜／皮膚（乳腺部）／膣粘膜の萎縮が認められた。これらの変化は終末期の体重減少に続発したものと考えられたが、被験物質に直接関連したものではなかった。回復期間終了時、主試験動物で認められた顕微鏡的変化は、中用量群及び高用量群の雌の胸骨骨髄、並びに高用量群の雌の膵臓、大腿骨及び卵巣に残存し、その程度は低く、回復傾向であることを示した。投与期間中に被験物質との関連ありと判断された、その他の顕微鏡的所見はすべておおむね回復した。

いずれの群の雌雄にも、眼科学的検査、凝固検査、尿検査又は肉眼的病理検査において、被験物質に関連した変化は認められなかった。

結論として、本試験の条件下で SD ラットに様々な用量（雄：1、3、又は 8 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg）の CYH33 を 26 週間連続で強制経口投与したところ、8 mg/kg 群の雄では CYH33 に対する忍容性は認められず、死亡率は 1/20 であったが、3 mg/kg 群の雌では忍容性は良好であった。STD_{10} は雄で 8 mg/kg を上回り（この用量では、Day 180 の CYH33 の AUC_{0-t} の平均値は 1080 ng·h/mL、I27 の AUC_{0-t} の平均値は 14.9 ng·h/mL）、HNSTD は雌では 3 mg/kg（この用量では、Day 180 の CYH33 の AUC_{0-t} の平均値は 8950 ng·h/mL、I27 の AUC_{0-t} の平均値は 729 ng·h/mL）であった。毒性の主要標的器官は、膵臓、骨、血液リンパ系器官及び雌の生殖器系であった。

表 2.6.6-7. SD ラットにおける血漿中 CYH33 及び I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（26 週間反復投与試験）

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of CYH33								
			Day 1			Day 91			Day 180		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
1	M	Mean	3.0	16.8	84.0	2.5	18.4	93.7	3.0	23.6	112
		SD	0.0	3.86	20.8	1.0	7.28	36.9	0.0	8.33	37.8
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
0.3	F	Mean	4.3	51.5	696	3.0	77.5	959	3.0	83.4	999
		SD	2.5	12.4	147	0.0	14.8	168	0.0	23.5	275
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	M	Mean	3.0	67.4	344	3.0	94.7	605	3.0	70.1	345
		SD	0.0	12.6	71.8	0.0	40.1	328	0.0	22.1	104
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1	F	Mean	4.3	154	2120	3.0	222	3000	4.3	214	2700

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of CYH33								
			Day 1			Day 91			Day 180		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
		SD	2.5	48.3	502	0.0	56.8	921	2.5	69.1	830
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	3.0	145	797	2.5	202	1170	3.0	163	1080
8	M	SD	0.0	36.3	195	1.0	67.6	432	0.0	31.6	199
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	5.5	434	6450	3.0	732	9590	3.0	736	8950
3	F	SD	2.9	74.2	929	0.0	102	1410	0.0	85.5	1170
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4

（表の続き）

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of I27								
			Day 1			Day 91			Day 180		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
		Mean	3.0	0.158	0.158	3.0	0.340	0.490	3.0	0.408	0.474
1	M	SD	0.0	0.197	0.197	0.0	0.175	0.473	0.0	0.158	0.283
		N	2*	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	8.0	1.89	27.2	4.3	3.24	53.0	4.3	3.32	58.7
0.3	F	SD	0.0	1.21	21.2	2.5	2.66	41.9	2.5	2.25	36.8
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	3.0	0.926	4.22	3.0	1.49	6.70	2.5	1.09	5.22
3	M	SD	0.0	0.379	2.59	0.0	0.465	3.25	1.0	0.332	2.48
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	8.0	9.95	143	6.8	13.5	219	6.8	13.8	224
1	F	SD	0.0	5.84	77.9	2.5	4.97	71.8	2.5	7.02	98.7
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	3.0	2.46	13.8	3.0	3.14	20.2	3.0	2.71	14.9
8	M	SD	0.0	1.50	8.65	0.0	1.91	15.8	0.0	1.43	7.31
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Mean	8.0	55.3	770	6.8	51.8	830	6.8	45.6	729
3	F	SD	0.0	26.4	356	2.5	24.5	329	2.5	19.9	304
		N	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Note: *, Since I27 was not detected in the Day 1 samples of animals M1601 and M1602, N=2.

2.6.6.3.6 イヌを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験

ビーグル犬 39 週間毒性試験（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-6）において、ビーグル犬 56 匹を 4 群（雌雄各 7 匹／群）にランダムに割り付け、CYH33（0.05、0.2 及び 0.5 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）又は溶媒（1% HPMC 溶液、0 mg/kg）を投与容量 0.5 mL/kg で、1 日 1 回 39 週間連続投与した。投与期間終了時（Day 274）及び回復期間終了時（Day 316）に動物を剖検に供した。試験中に、以下のパラメータ、すなわち一般状態観察所見、眼科学的検査、体重、摂餌量、体温（直腸温）、血圧、ECG、臨床病理検査（血液学的検査、凝固検査、血漿生化学検査及び尿検査）、病理学的検査（肉眼的病理検査、器官重量及び病理組織学的検査）を評価し、また同時にトキシコキネティクス評価を行った。主な結果を以下に示す。

トキシコキネティクス：

溶媒対照群の血漿サンプル中にも、いずれの投与群の初回投与前の血漿サンプル中にも、CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかった。CYH33 及び I27 はいずれも各投与群の投与後にすべての動物で検出された。最高濃度到達時間（T_{max}）：Day 1、Day 91 及び Day 273 において、雌雄の血漿中 CYH33 の T_{max} の平均値は 1.0～2.1 h、雌雄の血漿中 I27 の T_{max} の平均値は 2.4～6.0 h であった。CYH33 と比較して雌雄の I27 の平均 T_{max} はわずかに遅延した。曝露量（平均 C_{max} 及び AUC_{0-t}）：Day 1、Day 91 及び Day 273 の血漿中 CYH33 の平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} は、雌雄ともに用量の増加に伴い、用量比を下回るか、ほぼ用量比例的に増加した。血漿中 I27 の平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} は雌雄とも用量の増加に伴い増加し、雄では用量比を下回るか、又はほぼ用量比例的に、雌では用量比を上回るか、又はほぼ用量比例的に増加した。I27 の C_{max} の平均値は CYH33 の 39.9%～72.7%、I27 の AUC_{0-t} の平均値は CYH33 の 88.9%～160.7%であった。蓄積比：反復投与後、いずれの投与群において雌雄ともに CYH33 及び I27 の明らかな蓄積は認められなかった。性差：各投与群の単回及び反復投与後、CYH33 及び I27 の平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-t} に明らかな性差は認められなかった。TK パラメータの関連データの詳細を表 2.6.6-8 に示す。

いずれの動物も計画剖検時まで生存した。

一般状態観察所見：投与後、各用量群で間欠性の水様便／軟便、口腔粘膜の病変及び一過性の嘔吐が認められた。0.2 mg/kg 超を投与した動物では口腔粘膜の蒼白も認められ、0.5 mg/kg を投与した動物では一過性の粘液便及び赤色物質を含む便が認められた。また、0.2 mg/kg 群の少数例で頭部／前肢／後肢の隆起部も認められた。以上の変化は投与中止後により徐々に回復したが、回復期間中に 0.2 mg/kg 超の一部の動物で被毛の淡色化が認められた。

体重／摂餌量：投与期間中、0.5 mg/kg の雄及びすべての CYH33 投与群の雌で用量依存的に緩徐な体重増加が認められ、0.5 mg/kg の雄及び雌で摂餌量のわずかな減少を伴った。回復期間中の体重及び摂餌量は、いずれの群においても雌雄共に異常はみられなかった。

凝固・血漿生化学的検査：投与期間中、0.5 mg/kg 群の雌雄で FIB の増加が認められたが、回復期間終了時には異常は認められなかった。また、ALP 及び CK の高値が 0.5 mg/kg 群の雄 1 匹のみで投与期間及び回復期間終了時にみられた。

病理学的検査：投与期間終了時に 0.5 mg/kg の雌雄で最終体重及び脾臓絶対重量の減少が認められた。0.5 mg/kg 群では雌雄共に腸管関連リンパ組織（GALT）、腸間膜リンパ節及び脾臓に、0.2 mg/kg 群で雌雄共に腸間膜リンパ節及び雌の GALT に、被験物質に関連した顕微鏡的所見（リンパ球減少）が認められた。回復期間終了時、上記の変化は完全に回復した。

いずれの群の雌雄にも、眼科学的検査、体温（直腸温）、血圧、ECG、血液学的検査、尿検査及び肉眼的病理検査において、被験物質に関連した明らかな変化は認められなかった。

結論として、本試験の条件下で、ビーグル犬に様々な用量（0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg）での CYH33 の 39 週間連続強制経口投与はすべての雌雄で忍容性が認められた。HNSTD は 0.5 mg/kg であった（この用量での Day 273 の血漿中 CYH33 の AUC_{0-t} の平均値は雌雄それぞれ 455 ng·h/mL 及び 470 ng·h/mL であり、雌雄の血漿中 I27 の AUC_{0-t} の平均値はそれぞれ 648 ng·h/mL 及び 429 ng·h/mL であった）。毒性の主要標的器官はリンパ器官／組織であった。

表 2.6.6-8. ビーグル犬における血漿中 CYH33 及び I27 の TK パラメータの要約（用量群別）（39 週間反復投与試験）

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of CYH33								
			Day 1			Day 91			Day 273		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
0.05	M	Mean	1.6	7.37	45.5	1.0	8.64	72.1	1.9	8.30	55.1
		SD	0.98	1.48	20.7	0.0	2.30	12.6	1.1	1.75	20.1
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	1.9	6.42	41.4	1.6	7.73	63.8	1.6	8.56	54.0
		SD	1.1	1.48	18.6	0.98	1.74	26.5	0.98	2.05	13.7
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0.2	M	Mean	1.3	27.1	208	1.9	28.9	276	1.9	25.0	199
		SD	0.76	7.24	39.0	1.1	7.23	79.6	1.1	6.64	46.8
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	1.5	29.6	216	1.6	35.2	286	1.9	29.5	223
		SD	1.0	8.54	50.7	0.98	3.17	54.2	1.1	10.8	73.0
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0.5	M	Mean	2.1	61.3	479	1.9	61.2	564	1.9	59.2	470
		SD	1.1	23.2	145	1.1	18.2	143	1.1	24.3	197
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	1.0	57.2	428	1.6	62.7	557	1.6	65.8	455
		SD	0.0	27.3	182	0.98	26.3	267	0.98	20.9	154
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7

（表の続き）

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of I27								
			Day 1			Day 91			Day 273		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
0.05	M	Mean	4.4	3.40	57.6	3.1	4.88	96.5	3.0	4.57	76.1
		SD	2.4	0.610	13.7	2.3	1.64	38.8	0.0	1.72	36.6
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	3.0	2.56	37.2	3.4	3.51	65.2	3.0	3.56	50.9

Dose level (mg/kg)	Gender		TK Parameters of I27								
			Day 1			Day 91			Day 273		
			T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
		SD	0.0	0.451	13.9	2.1	1.14	25.1	0.0	1.68	29.0
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0.2	M	Mean	3.0	13.2	220	5.5	21.0	401	2.7	15.2	237
		SD	0.0	2.87	28.1	3.2	4.24	66.5	0.76	3.70	53.5
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	3.7	12.9	216	3.7	18.4	353	2.4	15.7	238
		SD	1.9	3.36	67.8	1.9	3.62	94.1	0.98	4.82	85.2
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
0.5	M	Mean	6.0	25.3	426	4.0	36.5	713	2.7	27.8	429
		SD	7.9	8.23	126	2.9	8.77	220	0.76	9.32	182
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	F	Mean	4.4	27.7	516	4.8	44.6	895	2.7	42.6	648
		SD	2.4	11.6	222	3.1	23.8	534	0.76	14.4	252
		N	7	7	7	7	7	7	7	7	7

2.6.6.4 遺伝毒性試験

CYH33 の遺伝毒性は *in vitro*（細菌を用いる復帰突然変異試験［Ames 試験］及びチャイニーズハムスター肺細胞［CHL］を用いた染色体異常試験）及び *in vivo*（マウス骨髄を用いる小核試験）試験で評価した。

2.6.6.4.1 *In vitro*

2.6.6.4.1.1 細菌復帰突然変異試験（Ames 試験）

ネズミチフス菌の 5 菌株（TA97、TA98、TA100、TA102 及び TA1535）を用い代謝活性化（S9）の非存在下及び存在下で CYH33 の突然変異誘発能を評価した（CTD 記載箇所：M4.2.3.3.1-1）。

非代謝活性化系（−S9）はプレート法、代謝活性化系（+S9）はプレインキュベーション法を用いた。DMSO を溶媒対照とした。評価した用量レベルは、125、250、500、1000 及び 2000 μg／プレート（リソバリシブメシル酸塩水和物換算）であった。同時に陰性対照群及び陽性対照群を設けた。試験は 2 回繰り返して行った。被験物質の沈殿、背景細菌の生育及び復帰変異体数を評価した。

その結果、調製中に沈殿は認められなかったが、プレート取り込み中は 250 μg／プレート以上、培養終了時は 1000 μg／プレート以上で認められた。いずれの条件下でも、各トレインの陰性対照中の復帰突然変異体数は関連する過去の範囲内であった。陽性対照群では、プレートあたりの復帰突然変異体数が有意に増加した。各菌株について試験した各用量レベルでの復帰突然変異体数は、代謝活性化の有無にかかわらず陰性対照群と同等であり、結果は再現可能であった。したがって、Ames 試験では CYH33 は陰性であった。

2.6.6.4.1.2 染色体異常試験

チャイニーズハムスター肺細胞（CHL）を用い、代謝活性化の存在下及び非存在下の両方でCYH33の染色体異常誘発性を評価した（CTD記載箇所：M4.2.3.3.1-2）。試験は代謝活性化系の非存在下（−S9）で4時間及び24時間、並びに代謝活性化系の存在下（+S9）で4時間の処理により実施した。4時間処理（-S9/+S9）ではCYH33とともに4時間処理した後、新鮮培養液を入れ替え、さらに約20時間培養した後に細胞を回収した。24時間処理（-S9）では、CYH33とともに24時間インキュベートした直後に細胞を回収した。S9非存在下の4h処理では、用量レベル（リソバリシブメシル酸塩水和物換算）10、20、50及び75 μg/mLに、S9非存在下の24h処理では、2、4、9及び12 μg/mLに、S9存在下の4h処理では20、50、100及び120 μg/mLに設定した。各条件下の陰性対照と陽性対照を同時に設定した。

調製中及び処理開始時に被験物質の沈殿は認められず、処理終了時の顕微鏡観察において、S9非存在下の4h処理の75 μg/mL、S9存在下の4h処理の100及び120 μg/mLで沈殿が認められた。細胞毒性の結果は、S9非存在下の4h処理では、10、20、50及び75 μg/mLでそれぞれ14%、25%、49%及び54%であり、S9非存在下の24h処理では、2、4、9及び12 μg/mLでそれぞれ13%、30%、49%及び58%であり、S9存在下の4h処理では、20、50、100及び120 μg/mLでそれぞれ13%、30%、57%及び68%であった。

陰性対照の染色体構造異常（ギャップを除く）の発現率は、臨床検査値の基準値範囲内であり、陽性対照の結果は有意な染色体異常を示した。CYH33処理細胞では、S9非存在下の4h処理において、10、20及び50 μg/mLの用量レベルで染色体構造異常（ギャップを除く）の発現率がそれぞれ2%、1.7%及び1.3%であった。S9非存在下の24h処理では、2、4及び9 μg/mLの用量レベルでそれぞれ2%、1.7%及び2%であった。S9存在下の4h処理では、20、50及び100 μg/mLでそれぞれ2%、2.7%及び1.7%であった。

結論として、この実験は有効であり、本試験の条件下で、CYH33はCHL細胞における染色体の構造異常及び数的異常の誘発について陰性と判定された。

2.6.6.4.2 *In vivo*

2.6.6.4.2.1 小核試験

CYH33のICRマウス骨髄多染性赤血球における小核誘発能を評価した（CTD記載箇所：M4.2.3.3.2-1）。雄マウス48匹（6／群）を溶媒又はCYH33 5、15、50、100、200 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）を1日1回2日間投与する群と、陽性対照のシクロホスファミド一水和物（CP）80 mg/kgを単回経口投与する群に割り付けた。最終投与の18～24時間後に動物を安楽死させ、骨髄塗抹標本を作製した。試験期間中、一般状態観察所見、体重、全赤血球に対する多染性赤血球（PCE）の割合（PCE/［PCE+NCE］）及び小核PCEの発現率（MNPCE/PCE）をモニターした。

死亡は認められず、被験物質に関連した臨床徴候も認められなかった。50 mg/kg以上のCYH33で体重減少が認められた。溶媒対照と比較して、50 mg/kg以上で平均PCE/（PCE+NCE）

の用量依存的な減少が認められた。平均 MNPCE/PCE について、溶媒対照の小核 PCE の平均発現率は 0.7‰であり、臨床検査値の基準値範囲 0‰～2.12‰に該当した。陽性対照の小核 PCE の発現率は 45.9‰であり、統計的に有意であった。CYH33 投与群における小核 PCE の発現率は 0.4‰～0.8‰であり、これも分布範囲内であった。

結論として、実験は有効であり、本試験の条件下で、マウスにおける小核骨髄多染性赤血球の増加の誘発に関して CYH33 は陰性であった。

2.6.6.5 がん原性試験

CYH33 のがん原性試験は実施していない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 妊娠ラットを用いた胚・胎児毒性試験

本試験の目的は、器官形成期に妊娠 SD ラットに強制経口投与した場合、CYH33 が母体、胚及び胎児に及ぼす可能性のある毒性をトキシコキネティクスプロファイルと共に評価することであった（CTD 記載箇所：M4.2.3.5.2-1）。本試験では SD ラット（主試験：23 匹／群、TK 試験：5 匹／群）を、CYH33 を 0（溶媒）、0.03、0.10、0.30 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩水和物換算用量）で妊娠日齢（GD）6 から GD15 まで 1 日 1 回経口投与する群にランダムに割り付けた。精子の腟スメア及び／又は膣栓が認められた日を妊娠日と定義した。GD20 に主動物を安楽死させ、帝王切開を行った。評価項目は、生存胎児の外表、内臓及び骨格検査であった。GD6 及び GD15 に TK ラットの TK 解析を実施した。

その結果、対照群及び投与前群では CYH33 及び I27 は検出されず、CYH33 投与群では検出されたが、0.03 mg/kg 群のラット 1 例の血漿では CYH33 のみが検出され、I27 は検出されなかった。妊娠ラットにおける CYH33 及び I27 の平均 T_{max} に、投与量の増加及び曝露時間の蓄積に伴う明らかな変化は認められなかった。CYH33 及び I27 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の平均値は、ほぼ用量比例的に増加し、又はそれをわずかに上回って増加した。本試験では、CYH33 及び I27 の明らかな蓄積は認められなかった。妊娠ラットを用いた実験における詳細な TK プロファイルを表 2.6.6-9 に示す。

投与期間中、用量依存的に緩徐な体重増加が認められた以外、重大な一般状態の異常は認められなかった。0.03 及び 0.1 mg/kg では、明らかな胚・胎児発生異常、外表、内臓及び骨格の変化は認められなかった。0.3 mg/kg では、生存胎児率の減少、着床後死亡率の増加、死産及び胎児吸収数の増加、胎盤及び胎児体重の減少、頭殿長及び胎児尾長の減少、短尾／無尾が認められた。胎児骨格検査でも、骨化遅延、奇形又は変異が認められた。対照群（0（溶媒））と比較して、仙椎又は尾椎及び胸骨の骨化点の減少が認められた。0.3 mg/kg では、上後頭骨、ダンベル状胸椎及び胸骨の骨化遅延の発生割合の増加が認められた。0.03 mg/kg 及び 0.1 mg/kg では、明らかな骨化遅延、奇形又は変異は認められなかった。

結論として CYH33 は評価した用量レベルで妊娠ラットの体重増加を遅らせた。0.3 mg/kg では生存胎児率、胎児体重、胎児の頭殿長及び尾長の減少、短尾／無尾、骨化遅延、胎児骨格の奇形又は変異が認められた。本試験の妊娠 SD ラットにおける胚・胎児発生 NOAEL は 0.1 mg/kg であった。

表 2.6.6-9. 胚・胎児毒性試験（n=5）における CYH33 及びその代謝物 I27 の TK パラメータ

Dose level (mg/kg)	Day	CYH33			I27		
		T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)
0.03*	GD6	4.3±2.5	5.42±1.6	67.7±17.4	8.0±0.0	0.310±0.1	4,1±2.1
	GD15	6.8±2.5	5.76±0.9	79.9±14.5	8.0±0.0	0.280±0.1	3.5±1.1
0.1	GD6	5.0±2.7	17.9±2.7	273.7±65.2	8.0±0.0	1.12±0.7	17.4±9.5
	GD15	5.0±2.7	23.1±4.7	365.1±88.0	8.0±0.0	1.33±0.6	21.4±9.2
0.3	GD6	3.0±0.0	64.6±8.2	949.7±152.9	8.0±0.0	5.60±3.4	78.6±41.5
	GD15	4.0±2.2	76.1±17.2	1090.3±281.7	8.0±0.0	4.42±2.1	69.1±30.1

2.6.6.7 局所刺激性試験

CYH33 を用いた局所刺激性試験は実施されていない。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 CYH33 を用いた *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験

本試験の目的は、*in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験を使用し、UVA 照射下（+UV）及び UVA 非照射下（-UV）の Balb/C 3T3 細胞におけるニュートラルレッド取り込みに対する被験物質の阻害作用を比較することで、被験物質 CYH33 の光毒性を評価することであった（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-1）。

試験委託者からの推奨及び溶解性の情報に基づき、+UV 及び−UV 条件下で、本試験における被験物質 CYH33 の最終濃度を 0.094、0.202、0.435、0.936、2.01、4.33、9.3 及び 20 µg/mL と設定した。試験に陰性対照群及び陽性対照群を設定した。また、溶解性を高めるため、最終系における被験物質 CYH33 の溶媒としては、陰性光毒性を示す 0.0004% SDS を選択した。Balb/c 3T3 細胞を 96 ウェルマイクロタイタープレートに播種した。約 24 時間インキュベートした後、細胞を様々な濃度の被験物質、陽性対照物質又は陰性対照物質の最終容量の 1%を含む HBSS で処理した。被験物質及び陽性対照物質は、それぞれ照射（+UV）及び非照射（−UV）とラベルした培養プレート 2 枚ずつに投与した。約 1 時間インキュベートした後、+UV プレートは UVA 光（+UV）1.7 mw/cm^2 に照射線量が 5.0 J/cm^2 になるまで曝露し、同時に-UV プレートは室温、遮光下に保った。照射後、培地を新鮮培地に交換し、培養を継続した。予定培養終了の約 3 時間前に、培地をニュートラルレッド含有の無血清培地に交換した。培養終了時に、ニュートラルレッド脱着液を加えた。プレートをボルテックスミキサーで撹拌し、540 nm における光学密度

（OD_{540}）を測定した。Phototox ソフトウェアを用いて、光毒性係数（PIF）及び／又は平均光作用（MPE）を算出した。

本試験では、+UV 及び−UV 条件下で処理の開始時及び終了時に、試験したいずれの濃度でも被験物質／対照物質の沈殿は認められなかった。

本試験では、陰性対照の平均 OD_{540} 値は 0.4 を上回った。光感受性は、それぞれ 103.87%（CYH33）及び 98.02%（CPZ）で、80%を超えた。陽性対照の $IC_{50\ (+UV)}$ は 0.947 µg/mL であり、これは 0.1～2.0 µg/mL の範囲内であった。陽性対照の $IC_{50\ (-UV)}$ は 34.428 µg/mL であり、これは 7.0～90.0 µg/mL の範囲内であった。その PIF は 36.369 であり、6.0 を上回った。したがって、本試験におけるこの試験系は妥当であると判断した。

本試験では、+UV 及び−UV 条件下で、CYH33 の $IC_{50\ (+UV)}$ は 1.020 µg/mL、$IC_{50\ (-UV)}$ は 16.488 µg/mL、MPE は 0.328 で 0.15 を上回り、PIF は 16.190 で 5.0 を上回り、光毒性の基準を満たした。

以上の結果より、本試験条件下において CYH33 は *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験において光毒性を示した。

2.6.6.8.2 Sprague Dawley ラットを用いた強制経口投与による CYH33 の光毒性試験

本試験の目的は、SD ラットにおける CYH33 の単回経口投与の光毒性の可能性とトキシコキネティクスプロファイルを評価することであった（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-2）。

計 54 匹の SD ラットを 8 群にランダムに割り付けた。主試験群では、溶媒群及び陽性対照群は雌雄各 3 匹／群、CYH33 投与群は雌雄各 3 匹／群とした。なお、TK 群（陽性対照群を除く）には主試験の各群と同数の動物を用いた。8 群は、溶媒対照群（1% HPMC、0 mg/kg）、陽性対照群（0.1% メトキサレン溶液、0.2 mL／処理区域）、CYH33 を 3、10 及び 30 mg/kg 投与した雌の低用量群、中用量群及び高用量群、CYH33 を 100、300 及び 600 mg/kg 投与した雄の低用量群、中用量群及び高用量群（リソバリシブメシル酸塩換算用量）であった。投与容量は、溶媒対照群並びに雌雄の低、中及び高用量群では 10 mL/kg、陽性対照群では 0.2 mL/処置部位とした。

UVA 照射（波長 320～400 nm）：陽性対照動物は処置の約 30 分後に照射した。溶媒対照群並びに CYH33 の低、中及び高用量群の雌には、投与約 8 時間後に放射線を照射した。溶媒対照群、CYH33 の低用量群、中用量群及び高用量群の雄には投与約 3 時間後に放射線を照射した。主試験の全動物に照射線量 10 J/cm^2 で 54 分間照射し照射後 1、24、48 及び 72 時間に皮膚反応を観察した。

溶媒対照動物の非照射及び照射部位並びに陽性対照動物の非照射部位では、紅斑及び浮腫は認められなかった。処置後、陽性対照動物の非照射部位及び照射部位では照射後 1 時間に皮膚反応は認められなかった。紅斑及び浮腫の皮膚反応が、照射後 24、48 及び 72 時間に陽性対照動物の 6/6 に認められた。陽性対照群の皮膚反応（紅斑及び浮腫）の合計スコアは 2～5 であり、試験系が妥当であることが示された。CYH33 の低用量群、中用量群及び高用量群の雌雄では、非照射部位及び照射部位に照射後 1、24、48 及び 72 時間に紅斑及び浮腫は認められなかった。

溶媒対照群の SD ラットの血漿及び CYH33 投与群の初回投与前の血漿サンプルには CYH33 及びその代謝物 I27 は認められなかった。被験物質を投与した動物では、投与後に CYH33 及び I27 が検出された。雌の血漿中では、CYH33 及び I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の平均値は用量の増加に伴い増加し、用量比を下回るか、ほぼ用量比例的に増加した。雄の血漿中では、CYH33 の平均 C_{max} は用量の増加に伴って増加したが、用量比を下回った。CYH33 の平均 AUC_{0-t} は用量の増加に伴って増加し、100～300 mg/kg では用量比を上回って増加し、300～600 mg/kg では用量比をわずかに下回った。I27 の平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} は用量の増加に伴い増加し、用量比を上回った。

結論として、本試験の条件下で SD ラットに CYH33 を雌には 3、10 又は 30 mg/kg、雄には 100, 300 又は 600 mg/kg の用量で単回強制経口投与したところ、被験物質群の非照射部位及び照射部位に皮膚反応及び光毒性は認められなかった。30 mg/kg 投与群の雌における CYH33 及び I27 の C_{max} はそれぞれ 1330 ng/mL 及び 146 ng/mL、AUC_{0-t} はそれぞれ 17800 ng·h/mL 及び 2550 ng·h/mL であった。600 mg/kg 投与群の雄における CYH33 及び I27 の C_{max} はそれぞれ 942 ng/mL 及び 380 ng/mL、AUC_{0-t} はそれぞれ 7560 ng·h/mL 及び 920 ng·h/mL であった。

2.6.6.8.3 Brown Norway ラットを用いた強制経口投与による CYH33 の光毒性試験

本試験は、Brown Norway（BN）ラットを用いて、経口投与後の CYH33 の光毒性の可能性及びトキシコキネティクス（TK）プロファイルを評価するために実施した（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-3）。

被験物質 CYH33 を用いた *in vitro* 3T3 細胞のニュートラルレッド取り込み光毒性試験、Sprague Dawley（SD）ラットを用いた CYH33 の強制経口投与による光毒性試験、及び試験施設で実施した、BN ラットを用いた強制経口投与による CYH33 のトキシコキネティクス試験の結果に基づき、主試験群として 1 群あたり 4 匹の雌又は雄を用い、被験物質の低、中及び高用量レベルをそれぞれ雌で 3、10 及び 30 mg/kg、雄で 100、300 及び 600 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩換算用量）とした。一方、溶媒対照（1% HPMC）群及び陽性対照（8-メトキシソラレン）群を、主試験動物 4 匹／群として設定した。また、陽性対照群を除き、雌雄各 3 匹／群を TK 解析に含めた。溶媒対照又は各用量レベルの被験物質を投与容量 10 mL/kg で、陽性対照を投与容量 0.1 mL／部位で、1 日 1 回 3 日間連続投与した。

主試験動物の両側背部除毛した皮膚に、波長 320～400 nm の紫外線 A（UVA）を用い、左側には非照射、右側には照射した。照射開始時間は主試験群の溶媒対照群及び各被験物質投与群は投与後 3 時間（±5 分）、陽性対照群は投与後 30 分（±10 分）とし、照射線量は 10 J/cm^2、48 分とした。すべての動物において、照射終了後 1、24、48 及び 72 時間に皮膚反応が観察された。

照射中に、溶媒対照群の 1/8 匹、雌（F）-低用量群の 1/4 匹、F-中用量群の 2/4 匹、雄（M）-低用量群の 1/4 匹が死亡した状態で発見され、最終体重は 132 g、127 g、111 g、120 g、219 g であった。死亡前に上記動物の一部にかすかな呼吸が認められた。考えられる死因は、麻酔不耐性及び被験物質と麻酔薬との相互作用により誘発された毒性の増強であった。これらの死亡と被験物質との関連性は否定できなかった。照射終了後 72 時間で、F-高用量群の 2/4 例が死亡した状態

で発見された。これらの動物では死亡前に痩せ、屈曲姿勢及び立毛が認められ、最終体重は 84 g 及び 88 g であった。これらの死亡は被験物質に関連していると考えられた。

溶媒対照群と比較して、雌の体重において用量依存的な減少が認められた。一定の用量依存性を伴う絶対体重増加量の減少が雌雄ともに認められた（雌では明らか）。適応期間中に異常な臨床徴候は認められなかった。

陽性対照群では、8-メトキシソラレン投与により、照射終了 1 時間後に非照射部位及び照射部位の皮膚反応は認められなかった。一方、紅斑及び浮腫は照射終了後 24 時間、48 時間及び 72 時間に認められ、合計スコアが 2 以上（2～3 の範囲）となった動物の割合はそれぞれ 1/8、7/8 及び 7/8 であった。これらの結果は試験体系が妥当であることを示した。

主試験の溶媒対照群、低用量群、中用量群及び高用量群では、非照射部位及び照射部位に紅斑及び浮腫は認められず、各例の皮膚反応（紅斑及び浮腫）の総スコアは 0 であった。

溶媒対照群の血漿サンプル中には CYH33 も I27 も検出されなかった。D3 の投与後、雌における CYH33 及び I27 の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24\ hr}$）の増加は用量比例的で、雄における CYH33 及び I27 の全身曝露量の増加はそれぞれ用量比を下回り、用量比例性は認められなかった。

結論として、CYH33 を 3（低用量）、10（中用量）又は 30（高用量）mg/kg の用量で雌に、100（低用量）、300（中用量）又は 600（高用量）mg/kg の用量で雄に経口投与した後、被験物質を投与した雌雄のいずれにおいても、非照射部位及び照射部位に紅斑や浮腫は観察されなかった。光毒性は認められず、CYH33 の光毒性試験の結果は陰性であった。30 mg/kg 投与群の雌における CYH33 及び I27 の C_{max} はそれぞれ 3120 ng/mL 及び 661 ng/mL、CYH33 及び I27 の $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 62500 ng·h/mL 及び 14700 ng·h/mL であった。600 mg/kg 投与群の雄における CYH33 及び I27 の C_{max} はそれぞれ 1240 ng/mL 及び 92.5 ng/mL、CYH33 及び I27 の $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 15000 ng·h/mL 及び 1370 ng·h/mL であった。

2.6.6.9 考察及び結論

CYH33 の毒性プロファイルを一般毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験及び光毒性試験で評価した。

CYH33 の遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であった。*In vitro* 試験では、CYH33 は光毒性の可能性をある程度有するが、非有色及び有色動物の最大無光毒性用量レベル（雄：600 mg/kg、雌：30 mg/kg）での C_{max} は、推奨臨床用量である 40 mg QD 投与時の C_{max} の 3～10 倍であった。妊娠ラットの器官形成期に CYH33 を経口投与したところ、臨床推奨用量である 40 mg QD 投与時の曲線下面積（AUC）に基づくヒト曝露量より低い曝露量で奇形が認められた。動物試験で得られた所見とその作用機序に基づくと、妊婦に投与した場合には、CYH33 が胎児に害を及ぼす可能性がある。

SD ラットでは、同じ用量での曝露量は雄よりも雌の方が高かった。ラットにおける主要標的器官は、皮膚、毛包、大腿骨、血液リンパ系器官、生殖器系（雌）、内分泌系器官（雌）、膵臓及び食道であった。ビーグル犬では、毒性作用及び曝露量に性差は認められず、主要標的器官は

皮膚／粘膜、免疫／造血系、GI 管、膵臓、雄性生殖器系であった。ラット及びイヌにおけるすべての所見は、回復期間内に部分的又は完全に回復した。

CYH33 の推奨用量である 40 mg QD 投与時のヒト曝露量との比較に基づく曝露量マージンを表 2.6.6-10 に示す。CYH33 は一般的に安全域が狭いが、げっ歯類及び非げっ歯類における毒性プロファイル及び標的器官毒性の可逆性に基づき、進行癌患者に対する CYH33 の長期連日投与は適切であることが非臨床データから確認されている。

表 2.6.6-10. 非臨床試験における全身曝露量と推奨用量におけるヒト曝露量との比較に基づく曝露量マージン

Species	Dose duration	Dose (mg/kg/day)			CYH33		I27	
					Mean AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	MoE	Mean AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	MoE
Human		40 mg/day			5279#	-	2439#	-
Rat	4 weeks	HNSTD	Male	8	762	0.14	13.5	0.01
			Female	3	11545	2.19	346	0.14
Rat	13 weeks	HNSTD	Male	8	915	0.17	14.2	0.01
			Female	3	8250	1.56	407	0.17
Rat	26 weeks	STD10	Male	8	1080	0.20	14.9	0.01
		HNSTD	Female	3	8950	1.70	729	0.30
Dog	4 weeks	HNSTD	Male	0.2	235	0.04	341	0.14
			Female	0.2	191	0.04	266	0.11
Dog	13 weeks	HNSTD	Male	0.5	471	0.09	624	0.26
			Female	0.5	509	0.10	813	0.33
Dog	39 weeks	HNSTD	Male	0.5	470	0.09	429	0.18
			Female	0.5	455	0.09	648	0.27
Rat	embryo and fetal toxicity	NOAEL	Female	0.1	365	0.07	21.4	0.01

MoE: animal exposure/ human exposure at the recommended dose.
NOAEL: The Non-Observed-Adverse-Effect-Level
HNSTD: The Highest Non-Severely Toxic Dose
STD_{10}: Severely Toxic Dose in 10% of the animals
#: Intense PK samples have been collected from 11 solid tumor patients following Risovalisib treatment at 40 mg QD, including 7 patients from CYH33-101 study phase Ia and 4 patients from CYH33-G201 study. An integrated PK analysis has been conducted for those patients ([M2.7.2] Clinical Pharmacology), the mean C_{max} and AUC_{0-24} after multiple doses were 297 ng/mL and 5279 ng·h/mL, respectively, the mean C_{max} and AUC_{0-24} of I27 after multiple doses were 114 ng/mL and 2439 ng·h/mL, respectively.

目次

略語及び略号一覧 2
2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験の一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の概要 6
2.6.7.2.1 定常状態におけるトキシコキネティクス試験の評価項目の概要 7
2.6.7.2.2 イヌを用いた単回経口投与毒性試験 11
2.6.7.2.3 ラットを用いた28日間反復投与毒性試験 12
2.6.7.2.4 イヌを用いた28日間反復投与毒性試験 13
2.6.7.2.5 ラットを用いた13週間反復投与毒性試験 15
2.6.7.2.6 イヌを用いた13週間反復投与毒性試験 16
2.6.7.2.7 ラットを用いた26週間反復投与毒性試験 17
2.6.7.2.8 イヌを用いた39週間反復投与毒性試験 19
2.6.7.2.9 ラットを用いた胚・胎児毒性試験 21
2.6.7.3 毒性試験：原薬 22
2.6.7.4 単回投与毒性試験 24
2.6.7.5 ピボタル反復投与毒性試験 25
2.6.7.5.1 ラットを用いた28日間反復投与毒性試験 25
2.6.7.5.2 イヌを用いた28日間反復投与毒性試験 32
2.6.7.5.3 ラットを用いた13週間反復投与毒性試験 45
2.6.7.5.4 イヌを用いた13週間反復投与毒性試験 53
2.6.7.5.5 ラットを用いた26週間反復投与毒性試験 55
2.6.7.5.6 イヌを用いた39週間反復投与毒性試験 66
2.6.7.6 遺伝毒性試験： 69
2.6.7.6.1 *In Vitro* 細菌復帰突然変異試験 69
2.6.7.6.2 *In Vitro*染色体異常試験 71
2.6.7.6.3 *In Vivo*小核試験 72
2.6.7.7 生殖発生毒性試験 73
2.6.7.7.1 ラットを用いた胚・胎児毒性試験 73
2.6.7.8 光毒性試験 80

略語及び略号一覧

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 から 24 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to the time t	0 から t 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
BN rat	Brown Norway rat	ブラウンノルウェーラット
[redacted]	[redacted]	[redacted]
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
CP	Cyclophosphamide Monohydrate	シクロホスファミド一水和物
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
GD	Gestational Day	妊娠日齢
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
HNSTD	Highest Non-Severely Toxic Dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPMC	Hypromellose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
MMC	Mitomycin C	マイトマイシン C
MNPCE	Micronucleated Polychromatic Erythrocytes	小核多染性赤血球
NCE	Normochromatic Erythrocyte	正染性赤血球
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PCE	Polychromatic Erythrocyte	多染性赤血球
PO	Oral	経口
S9	Metabolic Activation System	代謝活性化系
SD rat	Sprague Dawley rat	Sprague Dawley（ラット動物系統）
[redacted]	[redacted]	[redacted]
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験の一覧表

Test Article: CYH33

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses	Testing Facility	GLP Compliance	Report No.	Location in eCTD
Single-dose Toxicity	Rat/Sprague Dawley	PO	Single dose	0, 30, 150, and 600 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]004R	M4.2.3.1-1
	Dog/Beagle	PO	Single dose	0, 10, 40, 120 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]006D	M4.2.3.1-2
Repeat-dose Toxicity	Rat/Sprague Dawley	PO	28-day QD	0, 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0, 1, 3, and 8 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]005R	M4.2.3.2-1
	Dog/Beagle	PO	28-day QD	0, 0.3, 0.8, and 2.4 mg/kg Since severe toxicity noted, on Day 9, the dose level adjusted to 0, 0.05, 0.2, and 2.4 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]007D	M4.2.3.2-2
	Rat/Sprague Dawley	PO	13-week QD	Male: 3, 8 and 24 mg/kg/day; Female: 0.3, 1 and 3 mg/kg/day (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	[redacted]	Yes	[redacted]101R	M4.2.3.2-3
	Dog/Beagle	PO	13-week QD	0.05, 0.2 and 0.5 mg/kg/day (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	[redacted]	Yes	[redacted]102D	M4.2.3.2-4
	Rat/Sprague Dawley	PO	26-week QD	Male: 1, 3 and 8 mg/kg/day; Female: 0.3, 1 and 3 mg/kg/day (dose levels were	[redacted]	Yes	[redacted]104R	M4.2.3.2-5

				calculated as Risovalisib Mesilate)				
	Dog/Beagle	PO	39-week QD	0.05, 0.2 and 0.5 mg/kg/day (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	[redacted]	Yes	[redacted]105D	M4.2.3.2-6
Genotoxicity								
Bacterial Reverse Mutation Assay	Bacterial/ *S. typhimurium*	*In vitro*	-	125-2000 µg/plate	[redacted]	Yes	[redacted]013B	M4.2.3.3.1-1
Chromosomal Aberration Assay	Chinese Hamster Lung Cell	*In vitro*	-	4h-treatment without S9: 10, 20, 50, and 75 µg/plate 24h-treatment without S9: 2, 4, 9, 12 µg/plate 4h-treatment with S9 20, 50, 100, and 120 µg/plate	[redacted]	Yes	[redacted]015C	M4.2.3.3.1-2
Micronucleus Assay	ICR Mouse	PO	2-day QD	Positive control PO single dose cyclophosphamide monohydrate at 80 mg/kg CYH33: 0, 5, 15, 50, 100, and 200 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]017M	M4.2.3.3.2-1
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-Fetal Toxicity	Rat/Sprague Dawley	PO	PO Daily from GD6 to GD15	CYH33 at 0 (vehicle), 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]	Yes	[redacted]009R	M4.2.3.5.2-1
Phototoxicity								
3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test	Balb/c 3T3 Cell	*In vitro*	-	CYH33: 0.094, 0.202, 0.435, 0.936, 2.01, 4.33, 9.3 and 20 µg/mL, negative control (DMSO), positive control (CPZ)	[redacted]	Yes	20213[redacted]03	M4.2.3.7.7-1
SD rats phototoxicity	Rat/Sprague Dawley	PO	Single dose	Female: 3, 10, 30 mg/kg Male: 100, 300, 600 mg/kg	[redacted]	Yes	20213[redacted]04	M4.2.3.7.7-2

				(dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)				
BN rats phototoxicity	Rat/Brown Norway	PO	3 days QD	Female: 3, 10, 30 mg/kg Male: 100, 300, 600 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	[redacted]	Yes	[redacted]23066[redacted] 01	M4.2.3.7.7-3

GLP = Good Laboratory Practice; "-": not applicable, QD: once daily, GD: gestation day

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の概要

Test Article: CYH33

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Report Number	Location in eCTD
Single-dose toxicity study	Dog	Oral gavage	0, 10, 40, 120 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	Yes	[redacted]006D	M4.2.3.1-2
28-day toxicity study	Rat	Oral gavage	0, 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0, 1, 3, and 8 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	Yes	[redacted]005R	M4.2.3.2-1
28-day toxicity study	Dog	Oral gavage	0, 0.3, 0.8, and 2.4 mg/kg, since severe toxicity, on Day 9, the dose level adjusted to 0, 0.05, 0.2, and 2.4 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	Yes	[redacted]007D	M4.2.3.2-2
13-week toxicity study	Rat	Oral gavage	Male: 0, 3, 8, 24 mg/kg Female: 0, 0.3, 1, 3 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	Yes	[redacted]101R	M4.2.3.2-3
13-week toxicity study	Dog	Oral gavage	0, 0.05, 0.2, 0.5 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	Yes	[redacted]102D	M4.2.3.2-4
26-week toxicity study	Rat	Oral gavage	Male: 1, 3 and 8 mg/kg/day; Female: 0.3, 1 and 3 mg/kg/day (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	Yes	[redacted]104R	M4.2.3.2-5
39-week toxicity study	Dog	Oral gavage	0.05, 0.2 and 0.5 mg/kg/day (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate)	Yes	[redacted]105D	M4.2.3.2-6
Embryo-Fetal Toxicity	Rat	Oral gavage	0 (vehicle), 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	Yes	[redacted]009R	M4.2.3.5.2-1

GLP = Good Laboratory Practice

2.6.7.2.1 定常状態におけるトキシコキネティクス試験の評価項目の概要

Test Article ： CYH33

Average $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)							
Dose (mg/kg/day)	TK sample collection day	Rat		Dog		Report No.	Location in eCTD
		Male	Female	Male	Female		
0.03	GD6		67.7			009R	M4.2.3.5.2-1
0.03	GD15		79.9			009R	M4.2.3.5.2-1
0.05	Day 9			62	57	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 28			49	58	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 91			49.3	69.0	102D	M4.2.3.2-4
0.05	Day 91			72.1	63.8	105D	M4.2.3.2-6
0.05	Day 273			55.1	54.0	105D	M4.2.3.2-6
0.1	GD6		273.7			009R	M4.2.3.5.2-1
0.1	GD15		365.1			009R	M4.2.3.5.2-1
0.2	Day 9			288	267	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 28			235	191	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 91			206	230	102D	M4.2.3.2-4
0.2	Day 91			276	286	105D	M4.2.3.2-6
0.2	Day 273			199	223	105D	M4.2.3.2-6
0.3	Day 91		915			101R	M4.2.3.2-3
0.3	Day 91		959			104R	M4.2.3.2-5
0.3	Day 180		999			104R	M4.2.3.2-5
0.3	GD6		949.7			009R	M4.2.3.5.2-1
0.3	GD15		1090.3			009R	M4.2.3.5.2-1
0.5	Day 91			471	509	102D	M4.2.3.2-4
0.5	Day 91			564	557	105D	M4.2.3.2-6
0.5	Day 273			470	455	105D	M4.2.3.2-6
1	Day 28		3717.3			005R	M4.2.3.2-1
1	Day 91		3050			101R	M4.2.3.2-3
1	Day 91	93.7	3000			104R	M4.2.3.2-5
1	Day 180	112	2700			104R	M4.2.3.2-5
2.4	Day 9			2870	2558	007D	M4.2.3.2-2
2.4	Day 28			2515	1682	007D	M4.2.3.2-2
3	Day 28	423.89	11545			005R	M4.2.3.2-1
3	Day 91	183	8250			101R	M4.2.3.2-3
3	Day 91	605	9590			104R	M4.2.3.2-5
3	Day 180	345	8950			104R	M4.2.3.2-5
8	Day 28	762	17268			005R	M4.2.3.2-1
8	Day 91	915				101R	M4.2.3.2-3
8	Day 91	1170				104R	M4.2.3.2-5
8	Day 180	1080				104R	M4.2.3.2-5
24	Day 28	5746.0				005R	M4.2.3.2-1
24	Day 91	156000				101R	M4.2.3.2-3

Test Article ： CYH33

Average C_{max} (ng/mL)

Dose (mg/kg/day)	TK sample collection day	Rat		Dog		Report No.	Location in eCTD
		Male	Female	Male	Female		
0.03	GD6		5.42			009R	M4.2.3.5.2-1
0.03	GD15		5.76			009R	M4.2.3.5.2-1
0.05	Day 9			8.20	7.63	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 28			6.23	8.62	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 91			7.52	8.02	102D	M4.2.3.2-4
0.05	Day 91			8.64	7.73	105D	M4.2.3.2-6
0.05	Day 273			8.30	8.56	105D	M4.2.3.2-6
0.1	GD6		17.9			009R	M4.2.3.5.2-1
0.1	GD15		23.1			009R	M4.2.3.5.2-1
0.2	Day 9			33.4	36.8	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 28			30.0	25.5	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 91			25.2	26.2	102D	M4.2.3.2-4
0.2	Day 91			28.9	35.2	105D	M4.2.3.2-6
0.2	Day 273			25.0	29.5	105D	M4.2.3.2-6
0.3	Day 91		55.3			101R	M4.2.3.2-3
0.3	Day 91		77.5			104R	M4.2.3.2-5
0.3	Day 180		83.4			104R	M4.2.3.2-5
0.3	GD6		64.6			009R	M4.2.3.5.2-1
0.3	GD15		76.1			009R	M4.2.3.5.2-1
0.5	Day 91			51.2	57.7	102D	M4.2.3.2-4
0.5	Day 91			61.2	62.7	105D	M4.2.3.2-6
0.5	Day 273			59.2	65.8	105D	M4.2.3.2-6
1	Day 28		237			005R	M4.2.3.2-1
1	Day 91		240			101R	M4.2.3.2-3
1	Day 91	18.4	222			104R	M4.2.3.2-5
1	Day 180	23.6	214			104R	M4.2.3.2-5
2.4	Day 9			286	232	007D	M4.2.3.2-2
2.4	Day 28			213	212	007D	M4.2.3.2-2
3	Day 28	104	737			005R	M4.2.3.2-1
3	Day 91	38.4	529			101R	M4.2.3.2-3
3	Day 91	94.7	732			104R	M4.2.3.2-5
3	Day 180	70.1	736			104R	M4.2.3.2-5
8	Day 28	106	1100			005R	M4.2.3.2-1
8	Day 91	169				101R	M4.2.3.2-3
8	Day 91	202				104R	M4.2.3.2-5
8	Day 180	163				104R	M4.2.3.2-5
24	Day 28	558				005R	M4.2.3.2-1
24	Day 91	967				101R	M4.2.3.2-3

Test Article ： I27

Average $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)

Dose (mg/kg/day)	TK sample collection day	Rat		Dog		Report No.	Location in eCTD
		Male	Female	Male	Female		
0.03	GD6		4.1			009R	M4.2.3.5.2-1
0.03	GD15		3.5			009R	M4.2.3.5.2-1
0.05	Day 9			227	271	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 28			70	94	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 91			69.6	99.7	102D	M4.2.3.2-4
0.05	Day 91			96.5	65.2	105D	M4.2.3.2-6
0.05	Day 273			76.1	50.9	105D	M4.2.3.2-6
0.1	GD6		17.4			009R	M4.2.3.5.2-1
0.1	GD15		21.4			009R	M4.2.3.5.2-1
0.2	Day 9			794	609	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 28			341	266	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 91			293	277	102D	M4.2.3.2-4
0.2	Day 91			401	353	105D	M4.2.3.2-6
0.2	Day 273			237	238	105D	M4.2.3.2-6
0.3	Day 91		28.8			101R	M4.2.3.2-3
0.3	Day 91		53.0			104R	M4.2.3.2-5
0.3	Day 180		58.7			104R	M4.2.3.2-5
0.3	GD6		78.6			009R	M4.2.3.5.2-1
0.3	GD15		69.1			009R	M4.2.3.5.2-1
0.5	Day 91			624	813	102D	M4.2.3.2-4
0.5	Day 91			713	895	105D	M4.2.3.2-6
0.5	Day 273			429	648	105D	M4.2.3.2-6
1	Day 28		196.2			005R	M4.2.3.2-1
1	Day 91		188			101R	M4.2.3.2-3
1	Day 91	0.490	219			104R	M4.2.3.2-5
1	Day 180	0.474	224			104R	M4.2.3.2-5
2.4	Day 9			5154	2509	007D	M4.2.3.2-2
2.4	Day 28			3562	1983	007D	M4.2.3.2-2
3	Day 28	8.84	345.9			005R	M4.2.3.2-1
3	Day 91	0.981	407			101R	M4.2.3.2-3
3	Day 91	6.70	830			104R	M4.2.3.2-5
3	Day 180	5.22	729			104R	M4.2.3.2-5
8	Day 28	13.5	826.1			005R	M4.2.3.2-1
8	Day 91	14.2				101R	M4.2.3.2-3
8	Day 91	20.2				104R	M4.2.3.2-5
8	Day 180	14.9				104R	M4.2.3.2-5
24	Day 28	130				005R	M4.2.3.2-1
24	Day 91	1340				101R	M4.2.3.2-3

Test Article ： I27

Average C_{max} (ng/mL)

Dose (mg/kg/day)	TK sample collection day	Rat		Dog		Report No.	Location in eCTD
		Male	Female	Male	Female		
0.03	GD6		0.310			009R	M4.2.3.5.2-1
0.03	GD15		0.280			009R	M4.2.3.5.2-1
0.05	Day 9			17.5	23.3	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 28			3.65	5.08	007D	M4.2.3.2-2
0.05	Day 91			4.11	5.52	102D	M4.2.3.2-4
0.05	Day 91			4.88	3.51	105D	M4.2.3.2-6
0.05	Day 273			4.57	3.56	105D	M4.2.3.2-6
0.1	GD6		1.12			009R	M4.2.3.5.2-1
0.1	GD15		1.33			009R	M4.2.3.5.2-1
0.2	Day 9			64.0	45.6	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 28			17.3	14.2	007D	M4.2.3.2-2
0.2	Day 91			16.3	15.9	102D	M4.2.3.2-4
0.2	Day 91			21.0	18.4	105D	M4.2.3.2-6
0.2	Day 273			15.2	15.7	105D	M4.2.3.2-6
0.3	Day 91		1.75			101R	M4.2.3.2-3
0.3	Day 91		3.24			104R	M4.2.3.2-5
0.3	Day 180		3.32			104R	M4.2.3.2-5
0.3	GD6		5.60			009R	M4.2.3.5.2-1
0.3	GD15		4.42			009R	M4.2.3.5.2-1
0.5	Day 91			35.4	40.8	102D	M4.2.3.2-4
0.5	Day 91			36.5	44.6	105D	M4.2.3.2-6
0.5	Day 273			27.8	42.6	105D	M4.2.3.2-6
1	Day 28		12.4			005R	M4.2.3.2-1
1	Day 91		11.6			101R	M4.2.3.2-3
1	Day 91	0.340	13.5			104R	M4.2.3.2-5
1	Day 180	0.408	13.8			104R	M4.2.3.2-5
2.4	Day 9			266	124	007D	M4.2.3.2-2
2.4	Day 28			177	109	007D	M4.2.3.2-2
3	Day 28	2.24	20.7			005R	M4.2.3.2-1
3	Day 91	0.680	25.4			101R	M4.2.3.2-3
3	Day 91	1.49	51.8			104R	M4.2.3.2-5
3	Day 180	1.09	45.6			104R	M4.2.3.2-5
8	Day 28	1.70	52.1			005R	M4.2.3.2-1
8	Day 91	2.84				101R	M4.2.3.2-3
8	Day 91	3.14				104R	M4.2.3.2-5
8	Day 180	2.71				104R	M4.2.3.2-5
24	Day 28	11.0				005R	M4.2.3.2-1
24	Day 91	76.8				101R	M4.2.3.2-3

2.6.7.2.2 イヌを用いた単回経口投与毒性試験

Report Title: CYH33: Single Oral (Gavage) Dose Toxicity in Beagle Dogs

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]006D
Location in eCTD: M4.2.3.1
GLP Compliance: Yes

Species/Strain: Dog/Beagle
Number of animals/Gender/Dose: 1/sex/group
Dosing Date: [redacted]-[redacted]-20[redacted]

Duration of Dosing: once
Feeding Condition: fast (all animals were fasted overnight before dosing and 2-3 hours after dosing)
Method of Administration: Oral gavage

Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Assay: LC-MS/MS

Sample: Plasma

Analytes: CYH33 and I27

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 10, 40, 120 mg/kg with a dose volume of 5 mL/kg.
- Batch No.: [redacted]
- TK samples collection: blood sample were collected from all animals on Day 1 at pre-dose and 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours post-dose
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin 6.3 through non-compartmental analysis (NCA)

Pharmacokinetic parameters

Dose level (mg/kg/)	**10**		**40**		**120**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
CYH33						
T_{max} (h)	1	2	2	2	1	2
C_{max} (ng/mL)	680	337	552	318	1320	711
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	3868.2	4336.1	3708.1	1985.6	14795	5316.3
I27						
T_{max} (h)	2	8	4	2	8	2
C_{max} (ng/mL)	292	279	294	151	1100	394
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	3598.2	4714.5	3679.9	1731.6	17371	5760.8

2.6.7.2.3 ラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: 28-Day Oral (Gavage) Repeated Dose Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Sprague Dawley Rats
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]005R
Location in eCTD: M4.2.3.2
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley
Duration of Dosing: once daily 28-day
GLP Compliance: Yes
Duration of Postdose: 28 days
Number of animals/Gender/Dose: 15/sex/group for the main study 3/sex/group for the TK study
Dosing Date: 1st dose date: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for females
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

Pharmacokinetic parameters

Gender	**M**								**F**			
Dose Level (mg/kg)	**3**		**8**		**24**		**1**		**3**		**8**	
Day	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**
CYH33												
T_{max} (h)	2.3±1.2	2.3±1.2	2.3±1.2	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	8.0±0.0	4.7±2.9	6.3±2.9	4.7±2.9	6.3±2.9	4.7±2.9
C_{max} (ng/mL)	38.8±19.0	104±37.3	68.7±29.1	106±54.4	175±79.2	558±126.7	182±35.5	237±29.7	503±30.4	737±175.1	1070±142.9	1100±51.3
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	255.77±120.1	423.89±132.6	533.52±270.1	762±546.4	1506.4±592.4	5746.0±2433.3	2852.5±634.5	3717.3±635.8	8075.3±1037.5	11545±2788.1	18047±1986.8	17268±1904.4
I27												
T_{max} (h)	3.0±0.0	2.3±1.2	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	4.7±2.9	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.761±0.8	2.24±1.2	1.03±0.8	1.70±1.1	3.58±3.6	11.0±5.8	9.10±3.4	12.4±5.5	16.8±3.0	20.7±7.3	70.1±61.4	52.1±45.8
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	4.66±5.6	8.84±5.2	8.22±7.3	13.5±12.8	31.0±28.7	130±84.4	140.3±45.4	196.2±72.5	280.4±48.2	345.9±116.2	999.6±713.2	826.1±603.1

M: male; F: female

2.6.7.2.4 イヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験

	Report Title: 28-Day Oral (Gavage) Repeated Dose Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Beagle Dogs	**Test Article: CYH33** **Report No.:** [redacted]007D **Location in eCTD:** M4.2.3.2
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 28 days	**GLP Compliance:** Yes
Number of animals/Gender/Dose: 5/sex/group	**Duration of Postdose:** 28 days	
Dosing Date: first dosing date: [redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** 1% HPMC
Sample: Plasma	**Analytes:** CYH33 and I27	**Assay:** LC-MS/MS

Special Features: CYH33 Dose (PO): originally 0, 0.3, 0.8, and 2.4 mg/kg since adverse toxicity found on D9, adjusted dose to 0, 0.05, 0.2 and 2.4 mg/kg
Batch No.: [redacted]
PK Sample Collection time points: pre-dose, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24h on Day 1, Day 9 and Day 28
Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using the WinNonlin 6.3

Pharmacokinetic parameters

Dose Level (mg/kg)	**0.3**		**0.8**		**2.4**		**0.05**		**0.2**		**2.4**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
CYH33												
T_{max} (h)												
Day 1	1.6±0.5	1.6±0.5	1.8±0.4	1.0±0.0	1.2±0.4	1.4±0.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	1.2±0.4	1.2±0.4	1.3±0.7	1.2±0.4	2.2±1.1	2.7±1.8
Day 28	-	-	-	-	-	-	1.6±0.5	1.6±0.5	1.8±0.4	1.2±0.4	3.0±1.4	1.7±0.6
C_{max} (ng/mL)												
Day 1	39.8 ±7.6	42.5±15.8	110±55.2	90.6±24.7	127±13.8	210±59.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	8.20±1.0	7.63±1.5	33.4±12.8	36.8±12.2	286±198.3	232±95.7
Day 28	-	-	-	-	-	-	6.23±1.9	8.62±1.8	30.0±13.4	25.5±12.9	213±205.8	212±57.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)												
Day 1	283±42.4	320±97.0	893±401.2	658±241.4	879±106.9	1660±462.6	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	62±9.8	57±10.7	288±150.5	267±89.9	2870±2038.1	2558±1438.1
Day 28	-	-	-	-	-	-	49±9.8	58±6.4	235±93.7	191±81.9	2515±2410.4	1682±244.1
I27												
T_{max} (h)												
Day 1	4.0±2.4	9.6±8.3	10.4±7.8	8.0±9.3	4.8±1.8	9.2±8.7	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	0.7±0.3	0.5±0.0	0.4±0.2	0.6±0.9	5.2±2.7	9.6±8.3

Day 28	-	-	-	-	-	-	2.0±1.2	3.6±0.9	3.6±0.9	7.2±9.4	6.0±2.8	3.3±1.2
C_{max} (ng/mL)												
Day 1	16.9±3.6	19.9±5.0	46.5±9.6	39.1±11.5	57.3±16.9	84.3±39.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	17.5±8.5	23.3±7.0	64.0±13.7	45.6±20.1	266±197.9	124±47.7
Day 28	-	-	-	-	-	-	3.65±1.2	5.08±1.0	17.3±6.0	14.2±4.9	177±159	109±14.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)												
Day 1	307±76.0	361±95.2	900±212.6	715±260.7	1061±386.8	1502±603.2	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	227±123.2	271±98.7	794±158.1	609±249.4	5154±3911.6	2509±947.3
Day 28	-	-	-	-	-	-	70±30.8	94±25.0	341±101.0	266±107.3	3562±3074.9	1983±413.6

M: male, F: female; “-”: not applicable

2.6.7.2.5 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Sprague-Dawley Rats
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]101R
Location in eCTD: M4.2.3.2
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley
Duration of Dosing: once daily 13-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose:
15/sex/group for the main study
3/sex/group for the TK study
Initial Age: 6-8 weeks
Duration of Postdose: 28 days
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

Gender	**M**						**F**					
Dose Level (mg/kg)	**3**		**8**		**24**		**0.3**		**1**		**3**	
Day	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**
Pharmacokinetic parameters												
CYH33												
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	8.0±0.0	6.8±2.5	8.0±0.0	3.0±0.0	5.5±2.9	4.3±2.5
C_{max} (ng/mL)	3.26±0.694	38.4±19.8	95.2±21.2	169±38	202±106	967±1050	36.3±3.61	55.3±12.9	156±54.8	240±30.9	58.1±4.69	529±75.5
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	7.01±1.91	183±79.7	572±121	915±227	1950±1140	15600±18700	558±57.7	915±209	2360±787	3050±345	862±138	8250±1730
I27												
T_{max} (h)	-	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	5.5±3.5	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0	0.680±0.375	1.34±0.746	2.84±2.02	2.69±2.28	76.8±106	0.975±0.284	1.75±0.411	8.79±5.31	11.6±6.94	2.67±1.84	25.4±15.3
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	0	0.981±0.523	6.88±4.02	14.2±10.7	23.6±28.8	1340±1890	14.4±4.7	28.8±6.10	132±80.3	188±111	40.0±26.6	407±231

2.6.7.2.6 イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 27-Day Assessment of Recovery in Beagle Dogs
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]102D
Location in eCTD: M4.2.3.2
Species/Strain: Dog/Beagle
Duration of Dosing: once daily 13-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose: 5/sex/group
Initial Age: 6.8-7.6 months
Duration of Postdose: 27 days
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 0.05, 0.2, 0.5 mg/kg
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

Gender	**M**						**F**					
Dose Level (mg/kg)	**0.05**		**0.2**		**0.5**		**0.05**		**0.2**		**0.5**	
Day	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**
Pharmacokinetic parameters												
CYH33												
T_{max} (h)	2.2±1.1	2.6±0.89	2.2±1.1	2.6±0.89	1.8±1.1	3.0±0.0	3.0±0.0	2.6±0.89	1.4±0.89	2.6±0.89	1.8±1.1	2.2±1.1
C_{max} (ng/mL)	4.38±1.49	7.52±1.56	22.4±1.72	25.2±6.19	48.5±15.9	51.2±15.5	4.86±1.82	8.02±2.64	22.3±2.40	26.2±6.32	41.9±15.0	57.7±22.7
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	31.1±17.1	49.3±20.9	191±25.5	206±40.1	396±127	471±153	43.5±11.0	69.0±20.3	189±20.3	230±59.6	379±89.1	509±210
I27												
T_{max} (h)	7.2±9.4	3.0±0.0	6.0±2.7	7.2±9.4	6.0±2.7	7.2±9.4	10±8.0	3.0±0.0	5.0±2.7	3.0±0.0	10±8.0	6.0±2.7
C_{max} (ng/mL)	1.90±0.547	4.11±0.811	10.4±1.59	16.3±3.73	20.7±9.27	35.4±18.5	2.31±0.616	5.52±1.57	9.80±1.30	15.9±5.42	18.4±4.07	40.8±19.6
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	33.3±9.99	69.6±20.2	196±39.7	293±96.2	392±189	624±360	45.8±13.7	99.7±34.5	177±21.6	277±120	371±88.8	813±480

2.6.7.2.7 ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験

	Report Title: CYH33: A 26-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 6-Week Assessment of Recovery in Sprague-Dawley Rats	**Test Article: CYH33** **Report No.:** [redacted]104R **Location in eCTD:** M4.2.3.2
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley **Number of animals/Gender/Dose:** 20/sex/group for the main study 4/sex/group for the TK study	**Duration of Dosing:** once daily 26-week	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 6-8 weeks **Date of First Dose**: [redacted]-[redacted]-20[redacted] **Sample:** Plasma	**Duration of Postdose:** 6 weeks **Method of Administration:** Oral gavage **Analytes:** CYH33 and I27	**Vehicle/Formulation:** 1% HPMC solution **Assay:** LC-MS/MS

Special Features:

- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

Gender						**M**			
Dose Level (mg/kg)		**1**			**3**			**8**	
Day	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**
CYH33									
T_{max} (h)	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	16.8±3.86	18.4±7.28	23.6±8.33	67.4±12.6	94.7±40.1	70.1±22.1	145±36.3	202±67.6	163±31.6
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	84.0±20.8	93.7±36.9	112±37.8	344±71.8	605±328	345±104	797±195	1170±432	1080±199
I27									
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.158±0.197	0.340±0.175	0.408±0.158	0.926±0.379	1.49±0.465	1.09±0.332	2.46±1.45	3.14±1.91	2.71±1.43
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	0.158±0.197	0.490±0.473	0.474±0.283	4.22±2.59	6.70±3.25	5.22±2.48	13.8±8.65	20.2±15.8	14.9±7.31
Gender						**F**			
Dose Level (mg/kg)		**0.3**			**1**			**3**	
Day	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**
CYH33									
T_{max} (h)	4.3±2.5	3.0±0.0	3.0±0.0	4.3±2.5	3.0±0.0	4.3±2.5	5.5±2.9	3.0±0.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	51.5±12.4	77.5±14.8	83.4±23.5	154±48.3	222±56.8	214±69.1	434±74.2	732±102	736±85.5
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	696±147	959±168	999±275	2120±502	3000±921	2700±830	6450±929	9590±1410	8950±1170
I27									
T_{max} (h)	8.0±0.0	4.3±2.5	4.3±2.5	8.0±0.0	6.8±2.5	6.8±2.5	8.0±0.0	6.8±2.5	6.8±2.5
C_{max} (ng/mL)	1.89±1.21	3.24±2.66	3.32±2.25	9.95±5.84	13.5±4.97	13.8±7.02	55.3±26.4	51.8±24.5	45.6±19.9
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	27.2±21.2	53.0±41.9	58.7±36.8	143±77.9	219±71.8	224±98.7	770±356	830±329	729±304

2.6.7.2.8 イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 39-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 6-Week Assessment of Recovery in Beagle Dogs
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]105D
Location in eCTD: M4.2.3.2
Species/Strain: Dog/Beagle
Duration of Dosing: once daily 39-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose:7/sex/group
Initial Age: 6-12 months
Duration of Postdose: 6 weeks
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage
Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 0.05, 0.2, 0.5 mg/kg
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

Gender	**M**								
Dose Level (mg/kg)	**0.05**			**0.2**			**0.5**		
Day	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**
CYH33									
T_{max} (h)	1.6±0.98	1.0±0.0	1.9±1.1	1.3±0.76	1.9±1.1	1.9±1.1	2.1±1.1	1.9±1.1	1.9±1.1
C_{max} (ng/mL)	7.37±1.48	8.64±2.30	8.30±1.75	27.1±7.24	28.9±7.23	25.0±6.64	61.3±23.2	61.2±18.2	59.2±24.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	45.5±20.7	72.1±12.6	55.1±20.1	208±39.0	276±79.6	199±46.8	479±145	564±143	470±197
I27									
T_{max} (h)	4.4±2.4	3.1±2.3	3.0±0.0	3.0±0.0	5.5±3.2	2.7±0.76	6.0±7.9	4.0±2.9	2.7±0.76
C_{max} (ng/mL)	3.40±0.610	4.88±1.64	4.57±1.72	13.2±2.87	21.0±4.24	15.2±3.70	25.3±8.23	36.5±8.77	27.8±9.32
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	57.6±13.7	96.5±38.8	76.1±36.6	220±28.1	401±66.5	237±53.5	426±126	713±220	429±182
Gender	**F**								
Dose Level (mg/kg)	**0.05**			**0.2**			**0.5**		
Day	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**
CYH33									
T_{max} (h)	1.9±1.1	1.6±0.98	1.6±0.98	1.5±1.0	1.6±0.98	1.9±1.1	1.0±0.0	1.6±0.98	1.6±0.98
C_{max} (ng/mL)	6.42±1.48	7.73±1.74	8.56±2.05	29.6±8.54	35.2±3.17	29.5±10.8	57.2±27.3	62.7±26.3	65.8±20.9
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	41.4±18.6	63.8±26.5	54.0±13.7	216±50.7	286±54.2	223±73.0	428±182	557±267	455±154

I27									
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.4±2.1	3.0±0.0	3.7±1.9	3.7±1.9	2.4±0.98	4.4±2.4	4.8±3.1	2.7±0.76
C_{max} (ng/mL)	2.56±0.451	3.51±1.14	3.56±1.68	12.9±3.36	18.4±3.62	15.7±4.82	27.7±11.6	44.6±23.8	42.6±14.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	37.2±13.9	65.2±25.1	50.9±29.0	216±67.8	353±94.1	238±85.2	516±222	895±534	648±252

2.6.7.2.9 ラットを用いた胚・胎児毒性試験

Report Title: CYH33: Oral (Gavage) Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Sprague Dawley Rats

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]009R
Location in eCTD: M4.2.3.5

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
Number of animals/Gender/Dose: 5 pregnant rats/TK group
Dosing Date:

Duration of Dosing: 10 days (GD6-GD15)
Feeding Condition: not applicable
Method of Administration: Oral gavage

GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: 1% HPMC

Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
CYH33 Dose (PO): 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg
Batch No.: [redacted]
PK Sample Collection time points: on GD6 and GD15, CYH33-treated groups: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24 hours post-dose, control group: pre-dose (0h) and 3h post-dose
Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using the WinNonlin 6.3

Pharmacokinetic parameters

CYH33 Dose Level (n=5)	**0.03 mg/kg***		**0.1 mg/kg**		**0.3 mg/kg**	
	GD6	**GD15**	**GD6**	**GD15**	**GD6**	**GD15**
CYH33 TK Parameters						
T_{max} (h)	4.3±2.5	6.8±2.5	5.0±2.7	5.0±2.7	3.0±0.0	4.2±2.2
C_{max} (ng/mL)	5.42±1.6	5.76±0.9	17.9±2.7	23.1±4.7	64.6±8.2	76.1±17.2
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	67.7±17.4	79.9±14.5	273.7±65.2	365.1±88.0	949.7±152.9	1090.3±281.7
I27 TK Parameters						
T_{max} (h)	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.310±0.1	0.280±0.1	1.12±0.7	1.33±0.6	5.60±3.4	4.42±2.1
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	4.1±2.1	3.5±1.1	17.4±9.5	21.4±9.2	78.6±41.5	69.1±30.1

*n=4 for CYH33, n=3 for I27

2.6.7.3 毒性試験：原薬

Test Article: CYH33

Batch No.	**Assay (%)**	**Specified Impurities**			**Each Individual Unspecified**	**Report No.**	**Type of Study**
Proposed Specification:	98.0 ~ 102.0	Impurity Name	Acceptance Criteria	Result	Individual Impurity: ≤ 0.2%		
[redacted]	98.8% 99.8% (Including crystal water)	CY01 Impurity C Impurity D Impurity J	Each impurity 0.2%	ND 0.04% 0.11% ND	0.09%	[redacted]004R	Single-dose in rats
						[redacted]006D	Single-dose in dogs
						[redacted]005R	28-day toxicity study in rats
						[redacted]007D	28-day toxicity study in dogs
						[redacted]013B	Bacterial reverse mutation assay in *S. typhimurium*
						[redacted]015C	Chromosome aberration assay in CHL cells
						[redacted]017M	Micronucleus assay in ICR mice
						[redacted]009R	Embryo-fetal toxicity in rats
[redacted]	98.5% (on anhydrous basis)	CY01 Impurity C Impurity D Impurity J	Each impurity ≤ 0.5%	ND 0.33% ND 0.21%	Standard: Each impurity ≤ 0.35% RRT0.73 0.14%; RRT0.79 0.14%; RRT1.26 0.07%; RRT1.27 0.14%	[redacted]101R	13-week toxicity study in rats
						[redacted]102D	13-week toxicity study in dogs
						20213[redacted]03	3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test
[redacted]	97.2% (on anhydrous basis)	CY01 Impurity C Impurity D Impurity J	≤ 0.15%; ≤ 0.40%; ≤ 0.5%; ≤ 0.15%	< RL (RL 0.05%); 0.14%; 0.32%; < RL (RL 0.05%)	Standard: Each impurity ≤ 0.5% RRT0.34 0.05%; RRT0.76 0.11%; RRT1.16 0.05%; RRT1.26 0.28%; RRT1.30 0.05%; RRT1.31 0.05%; RRT1.34 0.22%; RRT1.46 0.09%; RRT1.58 0.05%; RRT1.60 0.22%	20213[redacted]04	SD rats phototoxicity Study
						[redacted]104R	26-week toxicity study in rats
						[redacted]105D	39-week toxicity study in dogs

26770003D21080301	99.9% (on anhydrous basis)	CY01 Impurity C Impurity D Impurity J	≤ 0.15%; ≤ 0.30%; ≤ 0.15%; ≤ 0.20%	ND; ND; ND; ND	Standard: Each impurity ≤ 0.10% < RL (RL 0.05%)	[redacted]23066[redacted]01	BN rats phototoxicity Study

Note: ND means Not Detected

2.6.7.4 単回投与毒性試験

Test Article: CYH33

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	MTD (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No.
Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage (1% HPMC solution)	0 (vehicle), 30, 150, and 600 mg/kg	4/sex/group	≥600 mg/kg	Well tolerated	[redacted]004R
Dog/Beagle	Oral Gavage (1% HPMC solution)	0 (vehicle), 10, 40, 120 mg/kg	1/sex/group	≥120 mg/kg	Well tolerated	[redacted]006D
MTD: Maximum Tolerated Dose;						

2.6.7.5 ピボタル反復投与毒性試験

2.6.7.5.1 ラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: 28-Day Oral (Gavage) Repeated Dose Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Sprague Dawley Rats
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]005R
Location in eCTD: M4.2.3.2-1
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
15/sex /group in main study, 3/sex/group in TK study
Duration of Dosing: Daily for 28-day
GLP Compliance: Yes
Initial Age: approximately 7 weeks
Duration of Post dose: 28-day
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: oral gavage (dose volume: 10 mL/kg)

Special Features: CYH33 via oral gavage for 28 days at 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for females
Batch No.: [redacted]
TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.

HNSTD: 8 mg/kg for males and 3 mg/kg for females

Gender	**M**						**F**					
Dose Level (mg/kg)	**3**		**8**		**24**		**1**		**3**		**8**	
Day	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**	**1**	**28**
Toxicokinetics Parameters Evaluated												
CYH33												
T_{max} (h)	2.3±1.2	2.3±1.2	2.3±1.2	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	8.0±0.0	4.7±2.9	6.3±2.9	4.7±2.9	6.3±2.9	4.7±2.9
C_{max} (ng/mL)	38.8±19.0	104±37.3	68.7±29.1	106±54.4	175±79.2	558±126.7	182±35.5	237±29.7	503±30.4	737±175.1	1070±142.9	1100±51.3
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	255.77±120.1	423.89±132.6	533.52±270.1	762±546.4	1506.4±592.4	5746.0±2433.3	2852.5±634.5	3717.3±635.8	8075.3±1037.5	11545±2788.1	18047±1986.8	17268±1904.4
I27												
T_{max} (h)	3.0±0.0	2.3±1.2	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	4.7±2.9	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.761±0.8	2.24±1.2	1.03±0.8	1.70±1.1	3.58±3.6	11.0±5.8	9.10±3.4	12.4±5.5	16.8±3.0	20.7±7.3	70.1±61.4	52.1±45.8
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	4.66±5.6	8.84±5.2	8.22±7.3	13.5±12.8	31.0±28.7	130±84.4	140.3±45.4	196.2±72.5	280.4±48.2	345.9±116.2	999.6±713.2	826.1±603.1

Study: [redacted]005R Continued

Dose Levels (mg/kg/day) **(Gender)**	**0**		**3 mg/kg (M)** **1 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M)** **3 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M)** **8 mg/kg (F)**	
Noteworthy Findings								
Mortality	0		0		0		0	
Clinical Observation	-		-		-		-	
(End of recovery)								
Gender (Number evaluated)	**M: 15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**
Body Weight (mean, g)	200.267	181.933	200.067	182.200	200.133	181.933	200.067	181.800
Day -4								
Day 1	234.667	197.267	233.600	196.733	233.267	197.200	233.600	197.667
Day 4	249.867	202.867	243.867	190.000 ***	239.000 **	175.733 ***	231.400 ***	168.600 ***
Day 8	280.800	215.667	269.200 **	194.667***	260.467 ***	176.600 ***	250.200 ***	167.000***
Day 11	299.800	223.733	285.600 **	198.000 ***	271.533 ***	179.200***	256.867 ***	169.800***
Day 15	326.733	235.267	306.933 ***	203.000***	287.267 ***	183.000***	266.267 ***	169.667***
Day 18	342.600	242.000	317.533 ***	205.267***	296.000 ***	181.600***	268.467 ***	169.733***
Day 22	363.200	250.867	334.000 ***	208.600***	308.733 ***	185.133***	271.933 ***	170.600***
Day 28	389.667	263.000	356.267 **	215.267***	327.733 ***	187.467***	276.067 ***	171.333***
Day 35	423.600	288.800	385.800*	234.400***	365.800 **	222.400***	290.400 ***	203.600***
Day 42	449.400.	298.000	411.200*	247.400***	394.600 **	238.800***	338.400 ***	220.800***
Day 49	469.400	305.400	431.600 *	257.200***	418.600 **	252.200***	370.200 ***	237.200***
Day 56	484.600	307.000	442.000*	258.200***	426.000 **	253.200***	392.200 ***	239.000***
Food Consumption								
(g/animal/day) (mean)								
Days relative to start date								
Day 1-8	22.82	16.43	22.39	14.55**	21.69**	14.52**	20.58***	15.72**
Day 8-15	24.72	17.18aa	23.56**	15.13	22.25***	16.33	21.64***	18.39*
Day 15-22	25.69	18.26a	24.56**	14.72	22.89***	16.25	21.23***	17.38
Day 22-28	25.98	18.06	24.44**	14.98*	23.23***	15.49*	20.34***	15.02*
Day 28-35	26.71	19.11	25.26	16.11***	24.57*	15.86***	21.74***	15.97***
Day 35-42	27.29	22.43	25.11***	16.14***	24.14***	15.86***	23.63***	14.91***
Day 42-49	27.09	18.66	25.77*	16.51***	25.06***	16.74***	24.37***	15.37***
Day 49-56	26.49	17.17	24.43***	15.66***	23.23***	15.66***	23.83***	15.37***

** – test: Williams 2 sided $p<0.01$; *** – test Williams 2 sided $p<0.001$, *-test Williams 2 sided $p<0.05$, aa group factor test analysis of variance $p<0.01$, a group factor test: analysis of variance $p<0.05$

Study No.: [redacted]005R (Continued)

Dose Levels (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**3 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M) 8 mg/kg (F)**	
Noteworthy Findings								
Ophthalmology	-		-		-		-	
Hematology (end of the recovery phase)	-		-		-		-	
Clinical Chemistry (at the end of recovery phase)	-		-		-		-	
Urinalysis (at the end of recovery phase)	-		-		-		-	
Coagulation	-		-		-		-	
Gender (Animal No. Evaluated)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)
Continuous Glucose Measurement (mmol/L)								
Day 1	-	-	-		-	12.30 at 24h	-	11.2 SS (8HPD) 24.07 (24HPD)
Day 28	-		-	-	-	10.8 S (30MPD) 11.17 SS (1HPD)	10.2 (3HPD) 10.23 (8HPD)	16.57 S (PrDs) 16.47 SS (30MPD) 20.63 SS (1HPD) 24.53 SS (3HPD)
Insulin (µg/L)								
Day 1 (PrDs)	1.2847	1.1563	1.5160	1.0173	1.6260	1.0120	1.8210	1.2663
Day 1 (3HPD)	0.9500[k]	1.2113[k]	3.0403	5.4380	3.3230	12.3670	8.0557	17.8480
Day 2 (24HPD)	1.6800	1.2253[k]	1.5600	3.2833	1.3827	10.0397	1.5340	10.5690

K – Group factor test: Kruskal-Wallis $P<0.05$, S-test: Shirley 2 sided $p<0.05$, SS-test Shirley 2 sided $p<0.01$, HPD: hour post-dose, 30MPD: 30 min post-dose, PrD: Pre-dose

Study No.: [redacted]005R (Continued)

Dose Levels (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**3 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M) 8 mg/kg (F)**	
Noteworthy Findings								
Gender (Animal No. Evaluated)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)
Insulin (µg/L)								
Day 28 (PrDs)	1.9203	0.9443[k]	1.17130	2.3923	1.9920	3.9790	3.3840	12.1827
Day 28 (3HPD)	1.8713[k]	1.3403[k]	4.9300	4.7993	7.3030	41.4717	53.2750	25.1233
Day 28 (24HPD)	1.1207	0.6093[k]	1.1690	2.5357	1.6863	3.7483	2.0933	9.6307
Gross Pathology	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)
Dose period								
Thymus - small	-	-	-	-	-	-	-	2
Abdominal Cavity – Effusion; a little	-	-	-	-	-	1	1	6
Recover period	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight (at the recovery phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)	M (10)	F (10)
During Main Study								
Pancreas								
Dilation; sinusoid; islet	0	0	0	0	1	4	2	9
Edema; mesenchymal	0	0	0	0	0	0	3	10
Hyperplasia/degeneration; diffuse, islet cell	0	0	0	0	4	8	9	10
Thymus								
Depletion; lymphocytes, cortex	0	0	0	0	0	0	2	5
Lymph node, mandibular								
Depletion; lymphocytes, follicle	0	0	0	0	0	2	3	9
Lymph node, mesenteric								
Depletion; lymphocytes, follicle	0	0	0	0	0	2	5	10
Peyer's Patch								
Depletion; lymphocytes, follicle	0	0	0	0	0	0	7	10
Skin (site of mammary)								

Atrophy; diffuse, hair follicle	0	0	0	0	0	2	2	10
Inflammation, chronic, focal, subcutaneous	1	0	0	0	0	0	0	0
Ovaries								
Hemorrhage, corpus luteum	-	0	-	0	-	7	-	9
Femur (left)								
Depletion; cellularity, marrow	0	0	0	0	1	10	7	10
Thickened; growth plate	0	0	0	0	0	10	1	10
Bone marrow, sternum								
Depletion, cellularity	0	0	0	0	0	6	4	10
Spleen								
Decreased extramedullary hemopoietic	0	0	0	0	0	1	10	10
Estrous cycle								
Diestrus	-	2	-	2	-	4	-	6
Estrus	-	2	-	3	-	1	-	0
Metestrus	-	1	-	2	-	3	-	3
Proestrus	-	5	-	3	-	2	-	1
	M (10)	F (10)	M (0)	F (0)	M (0)	F (0)	M (10)	F (10)
Liver								
Necrosis, multifocal	0	0	0	0	0	0	0	1
Tension lipidosis	0	1	0	0	0	0	0	0
Kidneys								
Degeneration/regeneration; tubule	1	0	0	0	0	0	0	0
Lung								
Inflammation; chronic-active, focal	2	0	0	0	0	0	2	1
Inflammation, chronic-active, multifocal	1	0	0	0	0	0	0	0
Increased alveolar macrophage	0	0	0	0	0	0	0	4
Stomach								

Cyst, submucosa, fore-glandular junction	0	0	0	0	0	0	0	1
Testes	M (10)	F	M (0)	F	M (1)	F	M (10)	F
Degeneration; right	0	-	0	-	1	-	0	-
Epididymides								
Oligospermia; right	0	-	0	-	1	-	0	-
Salivary glands, mandibular	M (10)	F (10)	M (0)	F (0)	M (0)	F (0)	M (10)	F (10)
Inflammation; chronic-active		1						
Harderian glands								
Inflammation, chronic-active								2
Mammary Gland	-	F (10)	-	F (())	-	F (0)	-	F (10)
immature		1						
Thyroid gland	M (10)	F (10)	M (0)	F (0)	M (0)	F (0)	M (10)	F (10)
Ectopic thymus	1	0	0	0	0	0	1	0
<u>Histopathology during recovery phase</u>								
Estrous cycle		F (5)		F (5)		F (5)		F (5)
Diesturs		0		2		1		2
Estrus		1		1		0		0
Metestrus		0		2		4		3
proestrus		4		0		0		0
Liver	M (5)	F (5)	-	-	-	-	M (5)	F (5)
Necrosis, multifocal, hepatocyte	1	0	-	-	-	-	0	0
Tension lipidosis	1	0	-	-	-	-	0	0
Kidneys								
Degeneration / regeneration; tubule	0	0	-	-	-	-	0	1
Prostate gland	M (5)	-	-	-	-	-	M (5)	-
Infiltration; mononuclear cells	2	-	-	-	-	-	0	-
Inflammation, chronic-active	0	-	-	-	-	-	1	-
Stomach	M (5)	F (5)	-	-	-	-	M (5)	F (5)
Cyst; submucosa, fore-glandular junction	0	0	-	-	-	-	1	0
Testes	M (5)	-	-	-	-	-	M (5)	-

Degeneration; unilateral	1	-	-	-	-	-	0	-
Seminal vesicles								
Inflammation; acute	0	-	-	-	-	-	1	-
Thyroid glands	M (5)	F (5)	-	-	-	-	M (5)	F (5)
Ectopic thymus	2	0	-	-	-	-	0	0

HPD: hour post-dose, 30MPD: 30 min post-dose, PrD: Pre-dose, k-group factor test: Kruskal-Wallis $p<0.05$, - not applicable

2.6.7.5.2 イヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: 28-Day Oral (Gavage) Repeated Dose Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Beagle Dogs

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]007D
Location in eCTD: M4.2.3.2-2
GLP Compliance: Yes

Species/Strain: Dog/Beagle, 10-12 months old, 5/sex/group (total 40 dogs)
Duration of Dosing: 28 days
Duration of Postdose: 28 days
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: oral gavage
Vehicle/Formulation: 1% HPMC

Special Features CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 0.3, 0.8 and 2.4 mg/kg since severe toxicity noted, the dose levels were adjusted to 0, 0.05, 0.2, and 2.4 mg/kg on Day 9
Batch No.: [redacted]
Toxicokinetic samples were collected on Day 1, 9 and 28 at pre-dose (0), 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours post-dose.

HNSTD: 0.2 mg/kg/day (C_{max}: 30 ng/mL in males, 25.5 ng/mL in females; $AUC_{0\text{-}24h}$: 235 ng·h/mL in males, 191 ng·h/mL in females on D28 of test article)

NOAEL: 0.05 mg/kg (C_{max}: 6.23 ng/mL in males, 8.62 ng/mL in females; $AUC_{0\text{-}24h}$: 49 ng·h/mL in males, 58 ng·h/mL in females on D28 of test article)

Report [redacted]007D continued
Toxicokinetics

Pharmacokinetic parameters

Dose Level (mg/kg)	**0.3**		**0.8**		**2.4**		**0.05**		**0.2**		**2.4**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
CYH33												
T_{max} (h)												
Day 1	1.6±0.5	1.6±0.5	1.8±0.4	1.0±0.0	1.2±0.4	1.4±0.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	1.2±0.4	1.2±0.4	1.3±0.7	1.2±0.4	2.2±1.1	2.7±1.8
Day 28	-	-	-	-	-	-	1.6±0.5	1.6±0.5	1.8±0.4	1.2±0.4	3.0±1.4	1.7±0.6
C_{max} (ng/mL)												
Day 1	39.8 ±7.6	42.5±15.8	110±55.2	90.6±24.7	127±13.8	210±59.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	8.20±1.0	7.63±1.5	33.4±12.8	36.8±12.2	286±198.3	232±95.7
Day 28	-	-	-	-	-	-	6.23±1.9	8.62±1.8	30.0±13.4	25.5±12.9	213±205.8	212±57.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)												
Day 1	283±42.4	320±97.0	893±401.2	658±241.4	879±106.9	1660±462.6	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	62±9.8	57±10.7	288±150.5	267±89.9	2870±2038.1	2558±1438.1
Day 28	-	-	-	-	-	-	49±9.8	58±6.4	235±93.7	191±81.9	2515±2410.4	1682±244.1
I27												
T_{max} (h)												
Day 1	4.0±2.4	9.6±8.3	10.4±7.8	8.0±9.3	4.8±1.8	9.2±8.7	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	0.7±0.3	0.5±0.0	0.4±0.2	0.6±0.9	5.2±2.7	9.6±8.3

Day 28	-	-	-	-	-	-	2.0±1.2	3.6±0.9	3.6±0.9	7.2±9.4	6.0±2.8	3.3±1.2
Report No. [redacted]007D continued												
C_{max} (ng/mL)												
Day 1	16.9±3.6	19.9±5.0	46.5±9.6	39.1±11.5	57.3±16.9	84.3±39.5	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	17.5±8.5	23.3±7.0	64.0±13.7	45.6±20.1	266±197.9	124±47.7
Day 28	-	-	-	-	-	-	3.65±1.2	5.08±1.0	17.3±6.0	14.2±4.9	177±159	109±14.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)												
Day 1	307±76.0	361±95.2	900±212.6	715±260.7	1061±386.8	1502±603.2	-	-	-	-	-	-
Day 9	-	-	-	-	-	-	227±123.2	271±98.7	794±158.1	609±249.4	5154±3911.6	2509±947.3
Day 28	-	-	-	-	-	-	70±30.8	94±25.0	341±101.0	266±107.3	3562±3074.9	1983±413.6

M: male, F: female; "-": not applicable

Day	**D 1-8**						**Dose Adjustment Since D9 to the end of experiment**					
Dose Levels (mg/kg)	**0.3**		**0.8**		**2.4**		**0.05**		**0.2**		**2.4**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Noteworthy Findings												
Unscheduled sacrifice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 on Day 20	1 on Day 27

Dose Levels	**0**		**0.3 mg/kg 0.05 mg/kg**		**0.8 mg/kg 0.2 mg/kg**		**2.4 mg/kg**	
Gender (No. evaluated)	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**
Body Weight (kg) (mean)								
Days (relative to start date)								
Day-9	7.626	6.758	7.374	6.646	7.384	6.618	7.352	6.474
Day -2	7.592	6.636	7.348	6.648	7.410	6.582	7.392	6.474
Day 6	7.624	6.652	7.322	6.518	7.214	6.480	6.848	6.276
Day 13	7.680	6.658	7.362	6.572	7.254	6.460	6.332 ($p \leq 0.05$)	6.072
Day 20	7.828	6.684	7.552	6.666	7.444	6.586	5.648 ($p \leq 0.01$)	5.654 ($p \leq 0.05$)
Day 27	8.022	6.776	7.626	6.714	7.534	6.490	5.755 ($p \leq 0.01$)	5.324 ($p \leq 0.05$)
Food consumption (at the end of recovery period)								
	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations during dosing phase								
Soft/fluid/ mucus feces	-		-		3/10		8/10	

Motor activity decreased	-		-		1/10		7/10	
Oral mucus membrane lesion	-		-		-		7/10	
Body posture altered					-		6/10	
Salivation	-		-		-		6/10	
Thin	-		-		-		5/10	
Dose Levels (No. evaluated)	**0 (M5, F5)**		**0.3 mg/kg 0.05 mg/kg (M5, F5)**		**0.8 mg/kg 0.2 mg/kg (M5, F5)**		**2.4 mg/kg (M5, F5)**	
Skin tone altered	-		-		-		5/10	
Tremor/trembling					-		4/10	
Lame	-		-		-		4/10	
Discharge at eye	-		-		-		4/10	
Mouth and nostril								
Swollen at muzzle	-		-		-		2/10	
Vomitus	-		-		1/10			
Clinical Observation at the end of recovery period								
Opacity eye	-		-		-		1 Male	
Body Temperature (ºC) days relative to start date (mean)	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**	**M (5)**	**F (5)**
Day 13	38.5	38.44	38.64	38.46	38.52	38.64	39.24 ($p \leq 0.01$)	38.98
Day 20	38.46	38.60	38.82	38.62	38.56	38.60	38.78	39.12
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-

ECG	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood pressure	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (during the dosing period) (mean)								
RET ($1*10^9$/L)								
Day 8	114.52	120.98	80.48	43.68	40.34	49.38	24.00 ($p \leq 0.001$)	23.82 ($p \leq 0.001$)
Day 27	76.72	101.28	80.40	65.60	77.44	75.00	19.48 ($p \leq 0.05$)	20.20 ($p \leq 0.001$)

Report No [redacted]007D continued, Hematology (during the dosing period)

Dose Levels (No. evaluated)	**0**		**0.3 mg/kg 0.05 mg/kg**		**0.8 mg/kg 0.2 mg/kg**		**2.4 mg/kg**	
Gender (No. evaluated)	**M5**	**F5**	**M5**	**F5**	**M5**	**F5**	**M5**	**F5**
WBC ($1*10^9$/L) Day 8	10.720 ($p<0.05$)	10.220	9.434	9.960	13.048	7.440	19.628 ($p>0.05$)	10.988
NEUT ($1*10^9$/L) Day 8	6.784	6.494 ($p<0.05$)	5.692	5.894	8.980	4.166	15.706 ($p \leq 0.05$)	7.108
Hematology (during recovery phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (during dosing phase)								
A/G Day 8	1.16	1.26	1.30	1.50	1.02	1.60	0.72	1.26
ALB (g/L) Day 8	31.70 ($p<0.05$)	33.00 ($p<0.05$)	33.66	34.10	30.70	37.08	27.06	34.12
GLOB (g/L) Day 8	27.46	26.06	26.20	22.76	31.24	23.38	40.50	28.24
Na (nmol/L) Day 8	146.8	146.4 ($p<0.05$)	146.8	147.6	143.4	144.8	137.2	145.4
Cl (nmol/L) Day 8	112.96 ($p<0.05$)	112.96	114.02	114.90	111.96	113.20	103.36	112.66
Clinical Chemistry (since day 27	-	-	-	-	-	-	-	-

till the end of recovery phase)								
Coagulation (at the end of recovery phase)	-	-	-	-	-	-	-	-
Dose Levels (No. evaluated)	**0**		**0.3 mg/kg 0.05 mg/kg**		**0.8 mg/kg 0.2 mg/kg**		**2.4 mg/kg**	
Gender (No. evaluated)	**M5**	**F5**	**M5**	**F5**	**Gender (No. evaluated)**	**M5**	**F5**	**M5**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Continuous Glucose monitoring (mmol/L)	4.14	3.80	3.90	3.78	3.92	4.00	4.24	5.26
Day 1 at 2h post-dose								
Day 9 at 2 hr post-dose	4.34	3.72	4.42	3.50	4.08	3.60	4.64	5.20 ($p \leq 0.05$)
Day 9 at 8hr post-dose	4.12	3.10	3.90	3.38	3.98	3.88	7.66	7.44 ($p \leq 0.05$)
Insulin (24h post-dose)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology-Unscheduled Necropsy (No. evaluated)	-		-		-		**M 1**	**F1**
Small thymus	-	-	-	-	-	-	1	1
Ulcers in skin	-	-	-	-	-	-	1	1
Gross Pathology – Scheduled Necropsy	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**

(No. evaluated)								
Thymus small	1	0	1	0	1	2	2	2

Report No. [redacted]007D continued
Gross pathology-scheduled necropsy continued

Dose Levels	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender (No. evaluated)	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Oral cavity	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 2**	**F 0**
Ulcer, 0.5 cm in diameter, multifocal, mucosa	0	0	0	0	0	0	1	0
Ulcer, 1.5 cm in diameter, multifocal, mucosa	0	0	0	0	0	0	1	0
	M 0	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 1**	**F 0**
Skin-rump, ulcer, 0.5 cm in diameter	0	0	0	0	0	0	1	0
Organ Weight	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**
Thymus Weight								
Absolute (g)	7.8130	8.2717	5.0260	6.6487	5.0660	5.1593	2.6130 (p<0.05)	Not applicable
Relative to body (%)	0.1000	0.1279	0.0688	0.0999	0.0645	0.0760	0.0427 (p<0.05)	Not applicable
Relative to brain (%)	0.1113	0.1089	0.0688	0.0986	0.0698	0.0692	0.0352 (p<0.05)	Not applicable

Microscopic Histopathology – scheduled necropsy -main phase

	M 3	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Pancreas Degeneration/atrophy; acinar cell								
+2	0	0	0	0	2	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0	1	0

Report No. [redacted]007D continued
Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-main phase continued

Dose Levels	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender (No. evaluated)	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	F2
Thymus depletion; lymphoid +1	1	0	1	0	1	2	0	1
+2	0	0	0	0	2	0	0	1
+3	0	0	0	0	0	0	2	0
Lymph node, mandibular depletion; lymphoid +1	0	0	0	0	0	0	1	1
+2	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node, mesenteric depletion; lymphoid +1	0	0	0	0	0	0	2	1
+2	0	0	0	0	0	0	1	0
Peyer's Patch depletion; lymphoid +2	0	0	0	0	0	0	3	1
Bone Marrow, sternum increased myeloid cells +2	0	0	0	0	0	0	2	0
Stomach Inflammation; chronic, mucos+2	0	0	0	0	0	0	1	0

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

Report No. [redacted]007D continued
Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-main phase continued

Dose Levels	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender (No. evaluated)	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Stomach Dilation, glandular, mucosa +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Intestine, cecum dilation; glandular +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Intestine, colon dilation; glandular +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Intestine, rectum dilation; glandular +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Testes degeneration /atrophy; seminiferous tubule +2	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
+3	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hypoplasia; focal, seminiferous tubule +1	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
Epididymides oligospermia +3	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

Report No. [redacted]007D continued
Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-main phase continued

Dose Levels	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender (No. evaluated)	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 2**	**F 0**
Oral Opacity Ulceration +3	0	0	0	0	0	0	2	0
Inflammation; chronic-active +3	0	0	0	0	0	0	2	0
Skin-rump	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 0**	**F 0**	**M 1**	**F 0**
Ulceration +3	0	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation; chronic active+3	0	0	0	0	0	0	1	0
Gender and No. evaluated	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Kidneys Cast; tubular +1	0	0	0	0	1	0	0	0
Vacuolation; tubular, medullary ray +1	0	0	0	0	0	2	1	1
+2	0	0	0	0	0	1	0	0
Basophilia; tubular, cortex+1	0	0	0	0	1	0	0	0
+2	0	0	0	0	0	0	1	0
Pigment; tubular epithelium, cortex +1	0	0	0	0	0	0	0	1

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

Report No. [redacted]007D continued
Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-main phase continued

Dose levels (mg/kg)	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender and No. evaluated	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Liver glycogen accumulation; periportal +2	0	0	0	0	1	0	0	0
+3	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung inflammation; neutrophilic, focal +1	0	0	0	0	0	0	1	0
Mammary gland immature	NA	0	NA	1	NA	2	NA	1
Ovaries cyst, corpus luteum +3	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Pituitary gland cyst present	1	2	1	1	0	0	2	1
Parathyroid gland cyst present	1	0	0	0	1	0	0	0
Salivary gland-right mandibular inflammation; mononuclear cells +1	0	1	0	0	0	0	0	0
Degeneration, focal, acinar cell +3	0	0	0	0	1	0	0	0

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

Report No. [redacted]007D continued

Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-main phase continued

Dose levels	**0**		**0.3 mg/kg 0.05 mg/kg**		**0.8 mg/kg 0.2 mg/kg**		**2.4 mg/kg**	
Gender and No evaluated	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 3**	**M 3**	**F 2**
Skin at mammary site inflammation; chronic, focal, subepidermal	0	1	0	0	0	0	0	0

Microscopic Histopathology-scheduled necropsy-recovery phase

Gender and No. evaluated	**M 2**	**F 2**	**M 2**	**F 2**	**M 2**	**F 2**	**M 1**	**F 2**
Pancreas degeneration /atrophy; acinar cell +2	0	0	0	0	0	1	0	0
Thymus depletion; lymphoid +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Intestine cecum congestion +2	0	0	1	0	0	0	0	0
Inflammation; chronic +2	0	0	1	0	0	0	0	0
Intussusception +4	0	0	1	0	0	0	0	0
Testes, degeneration /atrophy; seminiferous tubule +2	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

Report No. [redacted]007D continued
Microscopic Histopathology-scheduled necropsy -recovery phase continued

Dose Levels	0		0.3 mg/kg 0.05 mg/kg		0.8 mg/kg 0.2 mg/kg		2.4 mg/kg	
Gender and No. evaluated	**M 2**	**F 2**	**M 2**	**F 2**	**M 2**	**F 2**	**M 1**	**F 2**
Epididymides, oligospermia +4	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Eyes, hyperplasia, focal, cornea +2	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart, inflammation, chronic, epicardium +1	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidneys vacuolation; tubular, medullar ray +1	0	0	0	0	0	0	0	2
Lungs, alveolar macrophage aggregation +3	0	0	0	0	1	0	0	0
Mammary glands immature	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
Ovaries cyst, corpus luteum +2	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
Pituitary gland, cyst present	1	0	1	0	0	0	0	1

Minimal +1, mild +2, moderate +3, severe +4

2.6.7.5.3 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 28-Day Assessment of Recovery in Sprague-Dawley Rats
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]101R
Location in eCTD: M4.2.3.2-3
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley
Duration of Dosing: once daily 13-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose:
15/sex/group for the main study
3/sex/group for the TK study
Initial Age: 6-8 weeks
Duration of Postdose: 28 days
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

HNSTD: 8 mg/kg for male rats, 3 mg/kg for female rats

Gender	**M**						**F**					
Dose Level (mg/kg)	**3**		**8**		**24**		**0.3**		**1**		**3**	
Day	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**
Pharmacokinetic parameters												
CYH33												
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	8.0±0.0	6.8±2.5	8.0±0.0	3.0±0.0	5.5±2.9	4.3±2.5
C_{max} (ng/mL)	3.26±0.694	38.4±19.8	95.2±21.2	169±38	202±106	967±1050	36.3±3.61	55.3±12.9	156±54.8	240±30.9	58.1±4.69	529±75.5
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	7.01±1.91	183±79.7	572±121	915±227	1950±1140	15600±18700	558±57.7	915±209	2360±787	3050±345	862±138	8250±1730
I27												
T_{max} (h)	-	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	5.5±3.5	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0	0.680±0.375	1.34±0.746	2.84±2.02	2.69±2.28	76.8±106	0.975±0.284	1.75±0.411	8.79±5.31	11.6±6.94	2.67±1.84	25.4±15.3
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	0	0.981±0.523	6.88±4.02	14.2±10.7	23.6±28.8	1340±1890	14.4±4.7	28.8±6.10	132±80.3	188±111	40.0±26.6	407±231

Dose Level (mg/kg/day) **(Gender)**	**0**		**3 mg/kg (M)** **0.3 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M)** **1 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M)** **3 mg/kg (F)**	
Noteworthy Findings								
Mortality	0		0		0		3/15 M	
Gender (Number evaluated)	**M: 15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**
Body Weight (mean, g)								
Day 4	287. 7	206.2	/	/	/	/	/	-9.4%
Day 8	305.9	215.4	/	/	/	-5.4%	-5.8%	-12.2%
Day 11	315.5	219	/	/	/	-6.9%	-7.2%	-13.6%
Day 15	332.9	230.3	/	/	/	-9.6%	-8.4%	-16.8%
Day 18	341	231.5	/	/	/	-9.3%	-9.4%	-17.1%
Day 22	355.9	237.4	/	/	-5.2%	-10.7%	-11.4%	-19.1%
Day 25	365.7	239.8	/	/	-5.2%	-10.4%	-12.8%	-19.9%
Day 28	378.5	242.7	/	/	-6.4%	-9.8%	-14.5%	-20.5%
Day 35	400	250.2	/	/	-7.7%	-10.0%	-16.0%	-21.8%
Day 42	423.2	255.9	/	/	-8.5%	-11.0%	-19.8%	-21.8%
Day 49	438.4	261	/	/	-9.7%	-11.5%	-22.8%	-23.2%
Day 56	454.5	268.5	/	/	-10.2%	-13.0%	-22.7%	-24.3%
Day 63	466.5	273	/	/	-10.4%	-13.4%	-23.2%	-24.7%
Day 70	477	275	/	/	-10.8%	-13.3%	-24.6%	-25.1%
Day 77	488.7	277.7	/	/	-11.2%	-13.9%	-21.4%	-25.0%
Day 84	496.2	278.6	/	/	-10.8%	-13.1%	-21.7%	-24.7%
Day 91	505. 7	279.8	/	/	-11.0%	-12.6%	-22.9%	-25.0%
Day 98	490.2	273.8	/	/	/	-7.7%	-22.9%	-17.4%
Day 105	505.2	281.2	/	/	/	-6.9%	-22.6%	-15.4%
Day 112	514	290.6	/	/	/	-7.6%	-19.6%	-15.1%
Day 119	519.4	289	/	/	/	-6.8%	-16.7%	-12.7%
Note: /, No significant change. Percent= (Data of dose group-data of control group)/data of control group*100%.								
Food Consumption								
(g/animal/day) (mean)								
Days relative to start date								
1 → 4	23.5	15. 9			-8.5%	-9.9%	-10.1%	-29.8%
4 → 8	23.7	16.1			-2.7%	-4.2%	-5.8%	-8.4%
8 → 11	23.6	16.4			-5. 6%	-4.5%	-7.0%	-5.97%
11 → 15	23.8	17.8			-4.4%	-12.9%	-6.5%	-16.7%
15 → 18	23.3	16.5			-3.0%	-7.7%	-7.6%	-17.0%
18 → 22	24	17.1			-4.4%	-8.4%	-10.8%	-19.3%

22 → 25	23.9	17.3		-4.0%	-9.0%	-11.6%	-22.0%
25 → 28	24. 9	16.9		-8.9%	-8.4%	-14.7%	-18.1%
28 → 35	25.0	17.2		-8.9%	-7.2%	-13.1%	-20.8%
35 → 42	25.0	16.8		-9.3%	-9.6%	-20.5%	-22.0%
42 → 49	25.3	17.2		-11.2%	-10.4%	-23.3%	-20.9%
49 → 56	25.7	17.9		-12.3%	-15.0%	-26.3%	-24.6%
56 → 63	25.7	17.5		-10.4%	-13.9%	-24.1%	-21.3%
63 → 70	25. 6	17.4		-11.7%	-11.7%	-24.6%	-22.8%
70 → 77	25.5	17.1		-10.2%	-13.8%	-25.9%	-21.6%
77 → 84	25.6	16.4		-10.6%	-9.9%	-20.4%	-20.1%
84 → 91	24.9	16.0		-10.9%	-8.5%	-20.9%	-20.2%
91 → 98	24.5	17.1		/	/	-20.2%	-11.2%
98 → 105	25.5	17.5		/	/	-34.2%	-11.1%
105 → 112	25.4	17.8		/	/	-33.4%	-7.1%
112 → 119	23.9	16.0		/	/	-32.5%	/

Note: /, No significant change. Percent= (Data of dose group-data of control group)/data of control group*100%.

Organ Weight- End of Dosing period

Dose Levels (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**3 mg/kg (M) 0.3 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals	10	10	10	10	10	10	7	10
Terminal body weight								
Absolute weight[a]	491.13 g	269.61 g	-8**	-7**	-15***	-14***	-21***	-26***
Spleen								
Absolute weight[a]	0.9384 g	0.5715 g	-18**	-15***	-30***	-25***	-31***	-41***
Relative to body (%[a])	0.1914 g	0.2124 g	-11*	-9*	-17*	-13***	-13*	-21***
Relative to brain (%[a])	43.2915 g	29.1263 g	-17**	-14***	-28***	-25***	-30***	-40***
Adrenal gland								
Absolute weight[a]	/	0.0769 g	/	-23***	/	-29***	/	-41***
Relative to body (%[a])	/	0.0285 g	/	-17***	/	-17***	/	-20***
Relative to brain (%[a])	/	3.9145 g	/	-22***	/	-28***	/	-40***
Thymus								
Absolute weight[a]	/	0.3127 g	/	/	/	/	/	-40***
Relative to body (%[a])	/	0.1164 g	/	/	/	/	/	-19*

Relative to brain (%[a])	/	15.9209 g	/	/	/	/	/	-39***
Uterus								
Absolute weight[a]	NA	0.7505 g	NA	-37***	NA	-40***	NA	-55***
Relative to body (%[a])	NA	0.2792 g	NA	-32***	NA	-31***	NA	-39***
Relative to brain (%[a])	NA	38.1809 g	NA	-36***	NA	-40***	NA	-54***

*, $p< 0.05$; **: $p<0.01$; *** $p<0.001$.

a- Group means are presented for the control group. Percent differences from the control group were presented for the dose groups. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). "/": No significant difference noted. NA, Not applicable. No noteworthy findings were noted at the end of the recovery period.

Histopathology- End of Dosing period

Dose Levels (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**3 mg/kg (M) 0.3 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals	10	10	10	10	10	10	7	10
Bone, femur								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Dysplasia; physis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Marked	0	0	0	0	0	0	0	7
Number affected	0	0	0	0	0	0	1	10
Spleen								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Cellularity, decreased; Lymphocytes, white pulp								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	5
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Number affected	0	0	0	0	0	0	4	6
Decreased; extramedullary hemopoiesis								
Minimal	0	0	3	7	1	3	1	1
Mild	0	0	0	0	1	4	4	9
Number affected	0	0	3	7	2	7	5	10
Pigmentation; red pulp								

Minimal	0	0	0	7	0	5	0	0
Mild	0	0	0	0	0	5	1	6
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	4
Number affected	0	0	0	7	0	10	1	10
Bone marrow, sternum								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Cellularity, decreased; Hematopoietic cell								
Minimal	0	0	0	5	1	5	2	1
Mild	0	0	0	2	0	2	0	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2
Number affected	0	0	0	7	1	7	2	10
Thymus								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Cellularity, decreased; Lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	4	1	8
Number affected	0	0	0	0	0	4	1	8
Lymph node, submandibular								
Number examined	10	10	10	10	9	10	7	10
Cellularity, decreased; Lymphocytes								
Minimal	0	0	0	2	0	6	0	6
Mild	0	0	0	0	0	0	0	3
Number affected	0	0	0	2	0	6	0	9
Lymph node, mesenteric								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Cellularity, decreased; Lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	3	1	3
Mild	0	0	0	0	0	0	0	5
Number affected	0	0	0	0	0	3	1	8

Gut-associated lymphoid tissue								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Cellularity, decreased								
Minimal	0	0	0	5	0	1	0	1
Mild	0	0	0	5	0	8	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	4
Number affected	0	0	0	10	0	10	0	8
Pancreas								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Hyperplasia; islet cell								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Number affected	0	0	0	0	0	0	2	1
Edema; interstitium								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	3
Number affected	0	0	0	0	0	0	0	3
Ovary								
Number examined	NA	10	NA	10	NA	10	NA	10
Atrophy; bilateral	NA		NA		NA		NA	
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	9
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	9
Hemorrhage; corpus luteum								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6
Pigmentation; bilateral								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	7
Uterus								
Number examined	NA	10	NA	10	NA	10	NA	10
Atrophy								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	5
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	7
Vagina								

Number examined	NA	10	NA	10	NA	10	NA	10
Atrophy, mucosa								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6
Pituitary gland								
Number examined	10	10	0	10	0	10	7	10
Atrophy								
Minimal	0	0	/	1	/	4	0	7
Mild	0	0	/	0	/	0	0	2
Number affected	0	0	/	1	/	4	0	9
Thyroid gland								
Number examined	10	10	0	10	0	10	7	10
Atrophy; bilateral								
Minimal	0	0	/	0	/	0	0	6
Number affected	0	0	/	0	/	0	0	6
Adrenal gland								
Number examined	10	10	0	10	0	10	7	10
Atrophy; bilateral								
Minimal	0	0	/	3	/	8	0	9
Number affected	0	0	/	3	/	8	0	9
Esophagus								
Number examined	10	10	10	10	10	10	7	10
Atrophy; squamous cell								
Minimal	0	0	0	0	0	6	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	9
Number affected	0	0	0	0	0	6	1	10

Histopathology- End of Recovery period

Dose Level (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**3 mg/kg (M) 0.3 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**24 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Bone marrow, sternum								
Number examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Cellularity, decreased; hematopoietic cell								

Minimal	0	0	0	0	0	3	0	3
Mild	0	0	0	0	0	1	0	2
Number affected	0	0	0	0	0	4	0	5
Ovary								
Number examined	NA	5	NA	5	NA	5	NA	5
Pigmentation; bilateral								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
No significant test article-related changes in ophthalmology, hematology, coagulation, plasma chemistry, urinalysis or gross pathology were noted in any rat during the whole study.								

2.6.7.5.4 イヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 27-Day Assessment of Recovery in Beagle Dogs
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]102D
Location in eCTD: M4.2.3.2-4
Species/Strain: Dog/Beagle
Duration of Dosing: once daily 13-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose: 5/sex/group
Initial Age: 6.8-7.6 months
Duration of Postdose: 27 days
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 0.05, 0.2, 0.5 mg/kg
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

HNSTD: 0.5 mg/kg

Gender	**M**						**F**					
Dose Level (mg/kg)	**0.05**		**0.2**		**0.5**		**0.05**		**0.2**		**0.5**	
Day	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**
Pharmacokinetic parameters												
CYH33												
T_{max} (h)	2.2±1.1	2.6±0.89	2.2±1.1	2.6±0.89	1.8±1.1	3.0±0.0	3.0±0.0	2.6±0.89	1.4±0.89	2.6±0.89	1.8±1.1	2.2±1.1
C_{max} (ng/mL)	4.38±1.49	7.52±1.56	22.4±1.72	25.2±6.19	48.5±15.9	51.2±15.5	4.86±1.82	8.02±2.64	22.3±2.40	26.2±6.32	41.9±15.0	57.7±22.7
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	31.1±17.1	49.3±20.9	191±25.5	206±40.1	396±127	471±153	43.5±11.0	69.0±20.3	189±20.3	230±59.6	379±89.1	509±210
I27												
T_{max} (h)	7.2±9.4	3.0±0.0	6.0±2.7	7.2±9.4	6.0±2.7	7.2±9.4	10±8.0	3.0±0.0	5.0±2.7	3.0±0.0	10±8.0	6.0±2.7
C_{max} (ng/mL)	1.90±0.547	4.11±0.811	10.4±1.59	16.3±3.73	20.7±9.27	35.4±18.5	2.31±0.616	5.52±1.57	9.80±1.30	15.9±5.42	18.4±4.07	40.8±19.6
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	33.3±9.99	69.6±20.2	196±39.7	293±96.2	392±189	624±360	45.8±13.7	99.7±34.5	177±21.6	277±120	371±88.8	813±480

Dose Level (mg/kg/day)	**0**		**0.05 mg/kg**		**0.2 mg/kg**		**0.5 mg/kg**	
Noteworthy Findings								
Mortality	0		0		0		0	
Clinical signs								
transient soft feces, vomit	-		-		-		√	
Gender (Number evaluated)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Plasma Chemistry-D91								
A/G	1.22	-	-	-	-	-	-11.4%	-
GLOB	26.80	-	-	-	-	-	+10.4%	-

Note: -, No significant change. Percent= (Data of dose group-data of control group)/data of control group*100%.

Histopathology- End of dosing period

Lymph node, mesenteric								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Cellularity, decreased; lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Number affected	0	0	0	0	0	0	1	0
Gut-associated lymphoid tissue								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Cellularity, decreased; lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Number affected	0	0	0	0	0	0	1	2

No test article-related changes in histopathology were observed at the end of recovery phase.

No significant test article-related changes in body weight, food consumption, ophthalmology, body (rectal) temperature, ECG, hematology, coagulation, urinalysis, gross pathology or organ weights were noted in any animal during the whole study.

2.6.7.5.5 ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験

	Report Title: CYH33: A 26-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 6-Week Assessment of Recovery in Sprague-Dawley Rats	**Test Article: CYH33** **Report No.:** [redacted]104R **Location in eCTD:** M4.2.3.2-5
Species/Strain: Rat / Sprague Dawley **Number of animals/Gender/Dose:** 20/sex/group for the main study 4/sex/group for the TK study	**Duration of Dosing:** once daily 26-week	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 6-8 weeks **Date of First Dose**: [redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Duration of Postdose:** 6 weeks **Method of Administration:** Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** 1% HPMC solution
Special Features:	- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for males; and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females - Batch No.: [redacted] - TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose. - Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation	
The Severely Toxic Dose in 10% of the animals (STD 10) was greater than 8 mg/kg for males, and the highest non-severely toxic dose (HNSTD) was 3 mg/kg for females.		

Gender					**M**				
Dose Level (mg/kg)		**1**			**3**			**8**	
Day	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**
CYH33									
T_{max} (h)	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	16.8±3.86	18.4±7.28	23.6±8.33	67.4±12.6	94.7±40.1	70.1±22.1	145±36.3	202±67.6	163±31.6
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	84.0±20.8	93.7±36.9	112±37.8	344±71.8	605±328	345±104	797±195	1170±432	1080±199
I27									
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.5±1.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.158±0.197	0.340±0.175	0.408±0.158	0.926±0.379	1.49±0.465	1.09±0.332	2.46±1.45	3.14±1.91	2.71±1.43
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	0.158±0.197	0.490±0.473	0.474±0.283	4.22±2.59	6.70±3.25	5.22±2.48	13.8±8.65	20.2±15.8	14.9±7.31
Gender					**F**				
Dose Level (mg/kg)		**0.3**			**1**			**3**	
Day	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**	**1**	**91**	**180**
CYH33									
T_{max} (h)	4.3±2.5	3.0±0.0	3.0±0.0	4.3±2.5	3.0±0.0	4.3±2.5	5.5±2.9	3.0±0.0	3.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	51.5±12.4	77.5±14.8	83.4±23.5	154±48.3	222±56.8	214±69.1	434±74.2	732±102	736±85.5
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	696±147	959±168	999±275	2120±502	3000±921	2700±830	6450±929	9590±1410	8950±1170
I27									
T_{max} (h)	8.0±0.0	4.3±2.5	4.3±2.5	8.0±0.0	6.8±2.5	6.8±2.5	8.0±0.0	6.8±2.5	6.8±2.5
C_{max} (ng/mL)	1.89±1.21	3.24±2.66	3.32±2.25	9.95±5.84	13.5±4.97	13.8±7.02	55.3±26.4	51.8±24.5	45.6±19.9
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	27.2±21.2	53.0±41.9	58.7±36.8	143±77.9	219±71.8	224±98.7	770±356	830±329	729±304

Dose Level (mg/kg/day) **(Gender)**	**0**		**1 mg/kg (M)** **0.3 mg/kg (F)**		**3 mg/kg (M)** **1 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M)** **3 mg/kg (F)**	
Noteworthy Findings								
Mortality	0		0		1/20 M (spontaneous tumor)		1/20 M	
Clinical signs	-		-		Pale ears (F); distended abdomen (individual male)		Pale ears (F); oral mucous membrane lesion (F); distended abdomen (individual male); swollen ears (individual male)	
Gender (Number evaluated)	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**
Body Weight (mean, g)								
Day 8	246.95	182.50	-1%	-3%	-3%	-9%	-8%	-18%
Day 15	294.00	201.20	-2%	-5%	-5%	-12%	-11%	-22%
Day 22	331.95	216.40	-1%	-6%	-5%	-15%	-12%	-25%
Day 29	366.40	229.20	-2%	-7%	-6%	-17%	-13%	-28%
Day 36	392.50	237.40	-2%	-7%	-6%	-17%	-14%	-29%
Day 43	417.70	245.25	-2%	-8%	-6%	-18%	-16%	-30%
Day 50	436.35	251.65	-2%	-8%	-8%	-18%	-16%	-31%
Day 57	456.70	257.60	-2%	-8%	-8%	-19%	-17%	-32%
Day 64	471.45	261.60	-2%	-9%	-7%	-19%	-18%	-32%
Day 71	486.50	268.35	-2%	-9%	-6%	-19%	-18%	-33%
Day 78	497.65	272.15	-2%	-10%	-6%	-20%	-18%	-34%
Day 85	510.35	276.50	-2%	-9%	-6%	-20%	-18%	-34%
Day 92	517.30	277.95	-1%	-9%	-6%	-19%	-18%	-34%
Day 99	527.15	280.35	-2%	-9%	-6%	-19%	-18%	-34%
Day 106	535.95	284.45	-2%	-10%	-6%	-20%	-19%	-34%
Day 113	543.10	284.90	-2%	-10%	-6%	-20%	-18%	-34%
Day 120	549.50	288.30	-2%	-10%	-6%	-19%	-19%	-34%
Day 127	553.75	289.70	-2%	-10%	-6%	-20%	-18%	-35%
Day 134	560.10	292.50	-2%	-10%	-6%	-20%	-19%	-35%
Day 141	567.20	294.10	-2%	-9%	-6%	-20%	-19%	-35%
Day 148	569.85	295.65	-1%	-10%	-6%	-20%	-19%	-35%
Day 155	573.45	296.60	-1%	-10%	-5%	-20%	-18%	-35%
Day 162	578.90	296.50	-1%	-9%	-6%	-20%	-18%	-35%
Day 169	587.70	298.40	-2%	-9%	-6%	-20%	-15%	-37%
Day 176	590.10	299.95	-1%	-9%	-6%	-20%	-15%	-36%
Day 180	588.05	297.15	-1%	-9%	-5%	-20%	-15%	-36%
Day 186	609.20	301.80	-9%	-12%	-11%	-18%	-17%	-31%
Day 193	618.40	306.80	-10%	-10%	-10%	-16%	-16%	-27%

Day 200	630.80	308.20	-10%	-9%	-10%	-14%	-15%	-25%
Day 207	635.80	313.80	-10%	-10%	-10%	-14%	-15%	-23%
Day 214	640.60	313.60	-9%	-8%	-8%	-11%	-14%	-21%
Day 223	642.00	311.80	-8%	-7%	-8%	-10%	-14%	-19%

Note: /, No significant change. Percent= (Data of dose group-data of control group)/data of control group*100%.

Food Consumption (g/animal/day) (mean) Days relative to start date	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**	**M: 20**	**F:20**
1→8	22.54	15.87	0%	-3%	0%	-11%	-6%	-18%
8→15	24.96	16.71	1%	-4%	-2%	-13%	-8%	-15%
15→22	25.24	16.96	2%	-5%	-1%	-17%	-9%	-26%
22→29	25.80	17.07	0%	-5%	-3%	-15%	-9%	-27%
29→36	25.26	16.74	2%	-5%	-3%	-15%	-8%	-28%
36→43	25.71	16.70	0%	-6%	-3%	-15%	-11%	-27%
43→50	25.29	16.41	1%	-6%	-6%	-15%	-10%	-27%
50→57	25.56	16.34	1%	-5%	-5%	-14%	-12%	-25%
57→64	25.14	15.96	2%	-7%	-2%	-13%	-12%	-24%
64→71	25.22	16.40	1%	-6%	-2%	-15%	-12%	-26%
71→78	25.55	16.44	1%	-8%	-2%	-14%	-12%	-27%
78→85	25.55	15.96	1%	-4%	-3%	-14%	-12%	-26%
85→92	25.19	15.81	2%	-4%	-2%	-12%	-12%	-25%
92→99	25.46	15.84	0%	-5%	-4%	-13%	-12%	-25%
99→106	25.64	15.99	1%	-6%	-3%	-14%	-13%	-25%
106→113	25.58	15.76	0%	-4%	-3%	-13%	-11%	-24%
113→120	25.57	16.03	-1%	-7%	-3%	-14%	-11%	-25%
120→127	25.18	15.94	1%	-6%	-1%	-15%	-11%	-25%
127→134	25.41	15.66	0%	-4%	-3%	-15%	-11%	-25%
134→141	25.49	15.69	0%	-5%	-2%	-14%	-14%	-25%
141→148	25.11	15.59	2%	-4%	-1%	-14%	-11%	-25%
148→155	25.09	15.41	1%	-4%	-1%	-15%	-16%	-26%
155→162	24.98	15.27	2%	-5%	-3%	-13%	-15%	-24%
162→169	25.45	15.45	1%	-6%	-5%	-15%	-9%	-30%
169→176	25.80	15.48	1%	-4%	-2%	-14%	-9%	-21%
176→180	25.53	15.58	3%	-5%	0%	-16%	-8%	-25%
180→186	26.80	16.37	-4%	-8%	-5%	-9%	-6%	-19%

186→193	27.77	16.97	-7%	-2%	-4%	-9%	-9%	-11%
193→200	28.40	16.74	-7%	-1%	-7%	-4%	-10%	-6%
200→207	27.91	16.91	-7%	-5%	-3%	-5%	-10%	-5%
207→214	27.69	16.51	-5%	-2%	-2%	1%	-7%	-4%
214→223	26.80	15.22	-5%	1%	-1%	4%	-6%	-3%

Note: /, No significant change. Percent= (Data of dose group-data of control group)/data of control group*100%.

Dose Level (mg/kg/day)	**0**		**1 mg/kg (M)**		**3 mg/kg (M)**		**8 mg/kg (M)**	
(Gender)			**0.3 mg/kg (F)**		**1 mg/kg (F)**		**3 mg/kg (F)**	
Hematology- End of Dosing period	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
RBC (10^12/L)	9.037	8.193	/	/	/	/	/	-7%***
HGB (g/L)	152.3	151.1	/	/	/	-6%***	/	-14%***
HCT (%)	47.99	45.82	/	/	/	-6%***	/	-13%***
MCV (fL)	53.23	55.94	/	/	/	-5%***	/	-7%***
MCH (pg)	16.89	18.45	/	/	/	-6%***	/	-8%***
RDW (%)	12.91	11.28	/	/	/	/	/	16%***
WBC (10^9/L)	6.151	4.973	/	/	/	/	/	-41%***
LYMP (10^9/L)	4.557	4.051	/	/	/	/	/	-51%***

No noteworthy findings in hematology were noted at the end of the recovery period.

Plasma chemistry- End of Dosing period	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
UREA (mmol/L)	5.29	5.84	/	/	/	/	/	16%**
CHOL (mmol/L)	1.565	1.961	/	/	/	19%**	/	56%***

No noteworthy findings in plasma chemistry were noted at the end of the recovery period.

Organ Weight- End of Dosing period

Dose Levels (mg/kg/day)	**0**		**1 mg/kg (M)**		**3 mg/kg (M)**		**8 mg/kg (M)**	
(Gender)			**0.3 mg/kg (F)**		**1 mg/kg (F)**		**3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals	15	15	15	15	14	15	15	15
Terminal body weight								
Absolute weight[a]	556.88 g	280.95 g	/	-8***	/	-20***	-13**	-36***
Spleen								
Absolute weight[a]	0.9641 g	0.5467 g	/	-15***	-14**	-31***	-21***	-45***

Relative to body (%[a])	0.1726	0.1953	/	-8*	-12*	-14***	-8*	-15***
Relative to brain (%[a])	43.8172	27.9375	/	-14***	-13**	-29***	-20***	-43***
Adrenal gland								
Absolute weight[a]	0.0593 g	0.0755 g	/	-25***	/	-28***	/	-44***
Relative to body (%[a])	0.0107	0.0269	/	-18**	/	-11**	/	-13**
Relative to brain (%[a])	2.7037	3.8335	/	-23***	/	-26***	/	-42***
Uterus								
Absolute weight[a]	NA	0.6398 g	NA	-19**	NA	-32***	NA	-49***
Relative to body (%[a])	NA	0.2279	NA	-13*	NA	-15*	NA	-21**
Relative to brain (%[a])	NA	32.6552	NA	-18**	NA	-30***	NA	-47***

*, $p< 0.05$; **: $p<0.01$; *** $p<0.001$.

a- Group means are presented for the control group. Percent differences from the control group were presented for the dose groups. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). "/": No significant difference noted. NA, Not applicable. No noteworthy findings were noted at the end of the recovery period.

Histopathology- End of Dosing period

Dose Levels (mg/kg/day) (Gender)	**0**		**1 mg/kg (M) 0.3 mg/kg (F)**		**3 mg/kg (M) 1 mg/kg (F)**		**8 mg/kg (M) 3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals	15	15	15	15	14	15	15	15
Pancreas								
Number examined	15	15	15	15	14	15	15	15
Hyperplasia; islet cell								
Minimal	0	0	0	1	3	0	2	6
Mild	0	0	1	0	2	1	3	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	2
Number affected	0	0	1	1	5	1	8	11
Fibrosis; islet								
Minimal	0	0	1	0	3	0	2	0
Mild	0	0	0	0	0	0	3	0
Number affected	0	0	1	0	3	0	5	0
Secretory depletion; acinar cell								
Minimal	0	0	0	1	0	2	0	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	4

Number affected	0	0	0	1	0	2	0	6
Bone, femur								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Dysplasia; physis								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	2
Mild	0	0	-	0	-	0	0	5
Moderate	0	0	-	0	-	0	0	4
Marked	0	0	-	0	-	0	0	2
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	13
Bone marrow, sternum								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Cellularity, decreased; hematopoietic cell								
Minimal	0	0	-	2	-	4	1	0
Mild	0	0	-	1	-	4	0	3
Moderate	0	0	-	0	-	0	0	7
Marked	0	0	-	0	-	0	0	5
Number affected	0	0	-	3	-	8	1	15
Spleen								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Cellularity, decreased; lymphocytes, white pulp								
Minimal	0	0	-	0	-	2	0	5
Mild	0	0	-	0	-	5	0	4
Moderate	0	0	-	0	-	0	0	1
Number affected	0	0	-	0	-	7	0	10
Pigmentation; increased								
Minimal	0	0	-	3	-	6	0	7
Mild	0	0	-	0	-	2	0	5
Moderate	0	0	-	0	-	1	0	1
Number affected	0	0	-	3	-	9	0	13
Thymus								
Number examined	15	15	0	15	0	14	15	15
Cellularity, decreased;								

lymphocytes								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	3
Mild	0	0	-	0	-	0	0	2
Moderate	0	0	-	0	-	0	0	5
Marked	0	0	-	0	-	0	0	2
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	12
Lymph node, mesenteric								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Cellularity, decreased; lymphocytes								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	2
Mild	0	0	-	0	-	0	1	4
Moderate	0	0	-	0	-	0	0	2
Marked	0	0	-	0	-	0	0	3
Number affected	0	0	-	0	-	0	1	11
Pigmentation								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	2
Mild	0	0	-	0	-	0	0	2
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	4
Ovary								
Number examined	NA	15	NA	15	NA	15	NA	15
Atrophy; bilateral								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	6	NA	1
Mild	NA	0	NA	1	NA	5	NA	5
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	5
Number affected	NA	0	NA	1	NA	11	NA	11
Follicular cyst								
Minimal	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1
Mild	NA	0	NA	0	NA	1	NA	5
Moderate	NA	0	NA	0	NA	1	NA	2
Marked	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
Number affected	NA	0	NA	1	NA	2	NA	10
Hemorrhage; corpus luteum								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	2	NA	4

Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Number affected	NA	0	NA	0	NA	2	NA	9
Uterus								
Number examined	NA	15	NA	15	NA	15	NA	15
Atrophy; bilateral								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA	2
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	4
Number affected	NA	0	NA	0	NA	1	NA	6
Cervix								
Number examined	NA	15	NA	15	NA	15	NA	15
Atrophy								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	1	NA	1
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	6
Number affected	NA	0	NA	0	NA	1	NA	7
Salivary gland, submandibular								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Secretory depletion; bilateral								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	6
Mild	0	0	-	0	-	0	0	3
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	9
Esophagus								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Atrophy; mucosa								
Minimal	0	0	-	1	-	6	0	10
Mild	0	0	-	1	-	1	0	2
Number affected	0	0	-	2	-	7	0	12
Skin, site of mammary gland								
Number examined	15	15	0	15	0	15	15	15
Atrophy; epidermis								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	3
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	3
Vagina								

Number examined	NA	15	NA	15	NA	15	NA	15
Atrophy; mucosa								
Minimal	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2

Histopathology- End of Recovery period

Dose Levels (mg/kg/day)	**0**		**1 mg/kg (M)**		**3 mg/kg (M)**		**8 mg/kg (M)**	
(Gender)			**0.3 mg/kg (F)**		**1 mg/kg (F)**		**3 mg/kg (F)**	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals	5	5	5	5	5	5	4	5
Bone, femur								
Number examined	5	5	0	5	0	5	4	5
Dysplasia; physis								
Minimal	0	0	-	0	-	0	0	4
Number affected	0	0	-	0	-	0	0	4
Bone marrow, sternum								
Number examined	5	5	0	5	0	5	4	5
Cellularity, decreased; hematopoietic cell								
Minimal	0	0	-	0	-	2	0	0
Mild	0	0	-	0	-	0	0	1
Number affected	0	0	-	0	-	2	0	1
Pancreas								
Number examined	5	5	5	5	5	5	4	5
Hyperplasia; islet cell								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Number affected	0	0	0	0	0	0	0	2
Ovary								
Number examined	NA	5	NA	5	NA	5	NA	5
Atrophy; bilateral								
Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Follicular cyst								

Mild	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
Number affected	NA	0	NA	0	NA	0	NA	3

No significant test article-related changes in ophthalmology, coagulation, urinalysis or gross pathology were noted in any rat during the whole study.

2.6.7.5.6 イヌを用いた 39 週間反復投与毒性試験

Report Title: CYH33: A 39-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with 6-Week Assessment of Recovery in Beagle Dogs
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]105D
Location in eCTD: M4.2.3.2-6
Species/Strain: Dog/Beagle
Duration of Dosing: once daily 39-week
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose:7/sex/group
Initial Age: 6-12 months
Duration of Postdose: 6 weeks
Vehicle/Formulation: 1% HPMC solution
Date of First Dose: [redacted]-[redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Oral gavage

Special Features:
- CYH33 Doses (PO): 0 (vehicle), 0.05, 0.2, 0.5 mg/kg
- Batch No.: [redacted]
- TK Sample Collection time points: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24hr post-dose.
- Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using Phoenix WinNonlin Version 6.3 for toxicokinetic calculation

The highest non-severely toxic dose (HNSTD) was 0.5 mg/kg.

Gender						**M**			
Dose Level (mg/kg)		**0.05**			**0.2**			**0.5**	
Day	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**
CYH33									
T_{max} (h)	1.6±0.98	1.0±0.0	1.9±1.1	1.3±0.76	1.9±1.1	1.9±1.1	2.1±1.1	1.9±1.1	1.9±1.1
C_{max} (ng/mL)	7.37±1.48	8.64±2.30	8.30±1.75	27.1±7.24	28.9±7.23	25.0±6.64	61.3±23.2	61.2±18.2	59.2±24.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	45.5±20.7	72.1±12.6	55.1±20.1	208±39.0	276±79.6	199±46.8	479±145	564±143	470±197
I27									
T_{max} (h)	4.4±2.4	3.1±2.3	3.0±0.0	3.0±0.0	5.5±3.2	2.7±0.76	6.0±7.9	4.0±2.9	2.7±0.76
C_{max} (ng/mL)	3.40±0.610	4.88±1.64	4.57±1.72	13.2±2.87	21.0±4.24	15.2±3.70	25.3±8.23	36.5±8.77	27.8±9.32
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	57.6±13.7	96.5±38.8	76.1±36.6	220±28.1	401±66.5	237±53.5	426±126	713±220	429±182
Gender						**F**			
Dose Level (mg/kg)		**0.05**			**0.2**			**0.5**	
Day	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**	**1**	**91**	**273**
CYH33									
T_{max} (h)	1.9±1.1	1.6±0.98	1.6±0.98	1.5±1.0	1.6±0.98	1.9±1.1	1.0±0.0	1.6±0.98	1.6±0.98
C_{max} (ng/mL)	6.42±1.48	7.73±1.74	8.56±2.05	29.6±8.54	35.2±3.17	29.5±10.8	57.2±27.3	62.7±26.3	65.8±20.9

$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	41.4±18.6	63.8±26.5	54.0±13.7	216±50.7	286±54.2	223±73.0	428±182	557±267	455±154
I27									
T_{max} (h)	3.0±0.0	3.4±2.1	3.0±0.0	3.7±1.9	3.7±1.9	2.4±0.98	4.4±2.4	4.8±3.1	2.7±0.76
C_{max} (ng/mL)	2.56±0.451	3.51±1.14	3.56±1.68	12.9±3.36	18.4±3.62	15.7±4.82	27.7±11.6	44.6±23.8	42.6±14.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	37.2±13.9	65.2±25.1	50.9±29.0	216±67.8	353±94.1	238±85.2	516±222	895±534	648±252

Dose Level (mg/kg/day)	**0**		**0.05 mg/kg**		**0.2 mg/kg**		**0.5 mg/kg**	
Noteworthy Findings								
Mortality	0		0		0		0	
Clinical signs	-		intermittent fluid feces/soft feces (4/14), oral mucosa membrane lesion (1/14), and transient vomiting (3/14)		intermittent fluid feces/soft feces (9/14); pale oral mucosa (1/14), oral mucosa membrane lesion (1/14), raised areas on head/forelimb/hindlimb (2/14), and transient vomiting (2/14)		intermittent fluid feces/soft feces (10/14), pale oral mucosa (5/14), oral mucosa membrane lesion (4/14), transient vomiting (3/14) or feces containing red traces (1/14) or mucus feces (1/14)	
Gender (Number evaluated)	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**
Body Weight (kg) (mean)								
Days (relative to start date)								
Day -1	7.884	7.57	-3%	-2%	1%	-3%	-1%	-3%
Day 27	8.499	8.146	-2%	-4%	0%	-7%	-4%	-10%
Day 55	9.083	8.653	-3%	-5%	0%	-8%	-6%	-12%*
Day 111	9.696	9.213	-3%	-6%	0%	-8%*	-10%	-16%**
Day 167	9.95	9.747	-5%	-8%	0%	-11%*	-12%*	-21%***
Day 223	10.067	10.1	-3%	-12%*	0%	-15%**	-13%*	-24%***
Day 272	10.203	10.057	-5%	-11%*	0%	-11%*	-14%*	-24%***

The group mean of measured values in kg was used for vehicle control. Percent change was used for 0.05 mg/kg, 0.2 mg/kg, and 0.5 mg/kg.
% = (Group mean body $weight_{dose}$ - Group mean body $weight_{control}$) / Group mean body $weight_{control}$×100%
*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001.

Coagulation								
Summary of FIB Changes (%)								
Gender (Number evaluated)	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**	**M: 7**	**F: 7**
Days (relative to start date)								
Day 87	2.176	1.991	/	/	/	/	39%**	50%**
Day 178	1.977	1.896	/	/	/	/	57%**	86%***
Day 269	2.016	2.173	/	/	/	/	43%*	52%*

/: Minimal change. The group mean of measured values in g/L was used for vehicle control, and percent change for 0.5 mg/kg.
%= (Group mean of parameter$_{dose}$ - Group mean of parameter$_{control}$) / Group mean of parameter$_{control}$ ×100%
*: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001.

Organ weight changes- End of dosing period								
Number of animals	4	4	4	4	4	4	4	4
TBW								
Absolute weight [a]	10.238 kg	10.420 kg	/	/	/	/	-15*	-27**
Spleen								
Absolute weight [a]	32.1565 g	32.1565 g	/	/	/	/	-23**	-36*
Relative to body (%[a])	0.315	0.3079	/	/	/	/	-9	-13
Relative to brain (%[a])	42.2738	44.0045	/	/	/	/	-20	-30
Histopathology- End of dosing period								
GALT								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Cellularity, decreased; lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	1	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Number affected	0	0	0	0	0	1	3	4
Mesenteric lymph node								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Cellularity, decreased; lymphocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	1	1	1
Mild	0	0	0	0	1	0	2	1
Number affected	0	0	0	0	1	1	3	2
Spleen								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Cellularity, decreased; lymphocytes, white pulp								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Number affected	0	0	0	0	0	0	1	2
No test article-related changes in histopathology were observed at the end of recovery phase.								
No obvious test article-related change in ophthalmology, body temperature (rectal), blood pressure, ECG, hematology, urinalysis, and gross pathology was noted in either females or males of any group.								

2.6.7.6 遺伝毒性試験：

2.6.7.6.1 *In Vitro* 細菌復帰突然変異試験

Report Title: CYH33: Bacterial Reverse Mutation Test

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]013B
Location in eCTD: M4.2.3.3.1-1
GLP Compliance: Yes
Date of Experiment: Oct-25-2016

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Strains: *S. typhimurium*
Metabolising System: Aroclor 1254-induced Sprague Dawley rat liver S9
Vehicles for: Test Article: Dimethylsulfoxide (DMSO)
Positive Controls: 9-Aminoacridine, 2-nitrofluorene, Methyl methanesulfonate, Mitomycin C, Sodium azide, 2-Aminofluorene, 2-Aminoanthracene, (detailed positive control dose levels please refer to Table 2 in the study report)
Treatment: Pre-incubation at 37ºC for 20 minutes
Batch No. [redacted]
Cytotoxic Effect: None
Genotoxic Effect: None
Summary of Colony Revertants (-S9)

	Test 1					Test 2				
Dose level (µg/plate) (mean±SD)	**TA97**	**TA98**	**TA100**	**TA102**	**TA1535**	**TA97**	**TA98**	**TA100**	**TA102**	**TA1535**
negative control	130±9	25±3	74±12	235±23	8±4	130±3	24±1	62±6	227±24	10±1
125	133±8	21±5	65±3	247±28	11±3	136±16	25±2	70±17	225±32	9±2
250	122±6	27±4	64±3	238±23	8±4	132±4	25±6	65±9	248±9	8±3
500	147±1	23±7	73±15	225±3	9±2	128±9	26±1	67±12	219±8	8±2
1000	137±13	30±3	63±1	243±32	10±3	140±15	27±2	75±7	235±25	9±2
2000	137±7	28±13	62±3	221±26	10±1	124±1	24±1	65±6	219±18	10±3
positive control	948±207	620±22	520±52	1245±30	868±122	775±129	698±108	584±64	1277±128	909±40

Summary of Colony Revertants (+S9)	Test 1					Test 2				
Dose level (μg/plate) (mean±SD)	**TA97**	**TA98**	**TA100**	**TA102**	**TA1535**	**TA97**	**TA98**	**TA100**	**TA102**	**TA1535**
negative control	153±6	40±2	74±4	296±19	14±4	149±11	31±3	85±9	321±17	12±4
125	156±18	35±1	78±5	281±18	9±4	164±22	30±1	76±13	320±20	10±3
250	161±15	36±9	77±16	288±16	12±1	168±18	31±3	87±9	333±8	12±3
500	157±2	35±5	72±3	276±6	9±2	166±3	28±3	75±9	324±39	9±2
1000	165±8	38±2	59±6	305±15	8±3	158±4	32±7	88±17	341±15	12±4
2000	143±6	32±4	74±11	297±9	11±3	164±14	41±6	72±2	299±27	10±3
positive control	1241±120	2280±97	1085±53	645±43	432±8	978±47	1884±264	1186±161	769±69	359±29

2.6.7.6.2 *In Vitro* 染色体異常試験

Report Title: CYH33: Chromosome Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cells

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]015C
Location in eCTD: M4.2.3.3.1-2
GLP Compliance: Yes
Date of Experiment: (first treatment date) May-12-2016

Test for Induction of: Micronuclei
Strains: Chinese Hamster Lung Cells
Metabolising System: Aroclor 1254-induced Sprague Dawley rat liver S9
Vehicles for Test Article: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

No. of Independent Assays: duplicate tests for each condition
Treatment: treatment for 4hr without S9, treatment for 24hr without S9, treatment for 4hr with S9
Batch No.: [redacted]
Positive Controls: Mitomycin (MMC), Cyclophosphamide monohydrate (CP)

Genotoxicity: None

Cytotoxicity and Precipitation in CHL Cells

Test condition	Dose level (μg/mL)	Cytotoxicity (%)			Precipitation		
		Test 1	Test 2	Mean	Formulation preparation	Treatment initiation	Treatment completion
-S9 4hr	negative control	0	0	0	-	-	-
	10	14	14	14	N	N	N
	20	27	23	25	N	N	N
	50	51	47	49	N	N	N
	75	58	50	54	N	N	P1
	positive control	40	42	41	-	-	-
-S9 24hr	negative control	0	0	0	-	-	-
	2	16	10	13	N	N	N
	4	31	29	30	N	N	N
	9	47	50	49	N	N	N
	12	58	57	58	N	N	N
	positive control	49	42	46	-	-	-
+S9 4hr	negative control	0	0	0	-	-	-
	20	14	12	13	N	N	N
	50	32	27	30	N	N	N
	100	62	51	57	N	N	P1
	120	70	65	68	N	N	P1
	positive control	80	62	71	-	-	-

"-" not application, N no precipitation was observed by naked eyes or microscopes, P1 precipitation was observed under microscopes

2.6.7.6.3 *In Vivo* 小核試験

Report Title: CYH33: Bone Marrow Erythrocyte Micronucleus Test Following Oral (Gavage) in ICR Mice

Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]017M
Location in eCTD: M4.2.3.3.2-1
GLP Compliance: Yes
Date of Experiment: first dosing date: May-27-2016

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/Strain: ICR Mouse
Age: about 7 Weeks
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes

Treatment Schedule: Daily for 2 days
Sampling Time: 18-24 hours post last dose

Method of Administration: Oral gavage
Vehicle/Formulation: 1% HPMC for oral formulation
Positive Control: Cyclophosphamide monohydrate (CP) single dose

Special Features: - Batch No.: [redacted]

Genotoxic Effects: CYH33 is negative in this mouse bone marrow micronucleus assay

Summary of the Incidence of Micronucleated PCE and the Ratios of PCE to Total Erythrocytes

Test	Dose level	Number of animals	MNPCE/PCE (‰)	PCE/(PCE+NCE)
First phase	vehicle control	6	0.7±0.3	0.5±0.00
	positive control (CP 15 mg/kg)	6	45.9±11.8	0.37±0.06
	5 mg/lg	6	0.6±0.3	0.50±0.01
	15 mg/kg	6	0.8±0.4	0.50±0.01
	50 mg/kg	6	0.8±0.5	0.43±0.04
Second phase	vehicle control	6	0.7±0.3	0.50±0.02
	100 mg/kg	6	0.4±0.3	0.25±0.06
	200 mg/kg	6	0.5±0.2	0.18±0.04
distribution of historical background data in our laboratory*	negative	72	0-2.12	-
	positive	72	7.00~58.00	-

PCE. Polychromatic erythrocyte, MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes, NCE: normochromatic erythrocyte, data expressed as mean±SD, "-" not applicable, * historical background data accumulated from year 2011 to 2015.

2.6.7.7 生殖発生毒性試験

2.6.7.7.1 ラットを用いた胚・胎児毒性試験

Report Title: CYH33: Oral (Gavage) Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Sprague Dawley Rats
Test Article: CYH33
Report No.: [redacted]009R
Location in eCTD: M4.2.3.5.2-1
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley
Duration of Dosing: 10 days (GD6-GD15)
GLP Compliance: Yes
Number of animals/Gender/Dose: 5 pregnant rats/TK group
Feeding Condition: not applicable
Dosing Date:
Method of Administration: Oral gavage
Vehicle/Formulation: 1% HPMC
Sample: Plasma
Analytes: CYH33 and I27
Assay: LC-MS/MS

Special Features:
CYH33 Dose (PO): 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg
Batch No.: [redacted]
PK Sample Collection time points: on GD6 and GD15, CYH33-treated groups: pre-dose (0h), 0.5, 1, 3, 8, and 24 hours post-dose, control group: pre-dose (0h) and 3h post-dose
Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using the WinNonlin 6.3

Pharmacokinetic parameters

CYH33 Dose Level (n=5)	0.03 mg/kg*		0.1 mg/kg		0.3 mg/kg	
	GD6	GD15	GD6	GD15	GD6	GD15
CYH33 TK Parameters						
T_{max} (h)	4.3±2.5	6.8±2.5	5.0±2.7	5.0±2.7	3.0±0.0	4.2±2.2
C_{max} (ng/mL)	5.42±1.6	5.76±0.9	17.9±2.7	23.1±4.7	64.6±8.2	76.1±17.2
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	67.7±17.4	79.9±14.5	273.7±65.2	365.1±88.0	949.7±152.9	1090.3±281.7
I27 TK Parameters						
T_{max} (h)	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0
C_{max} (ng/mL)	0.310±0.1	0.280±0.1	1.12±0.7	1.33±0.6	5.60±3.4	4.42±2.1
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	4.1±2.1	3.5±1.1	17.4±9.5	21.4±9.2	78.6±41.5	69.1±30.1

*n=4 for CYH33, n=3 for I27, GD: gestation day

Study No. [redacted]009R continued				
Dose Levels (mg/kg)	**0**	**0.03**	**0.1**	**0.3**
Noteworthy Findings				
Mortality	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight (gram)	N (16)	N (19)	N (17)	N (17)
weight of gravid uterus	62.114±12.146	59.310±14.513	58.640±15.304	53.903±13.952
net body weight (a)	316±12	308±14	308±13	307±21
weigh gain of pregnant rats (b)	28±5	27±4	23*±6	19**±10
Food Consumption	-	-	-	-
Embryo Fetal Development Examination (mean)	N (16)	N (19)	N (17)	N (17)
Corpora lutea counts (CL)	15	14	15	16
Implantations (IM)	12	12	12	13
Live fetuses (L)	12	12	12	11
Dead fetuses (D)	0	0	0	0
Absorption (A)	1	1	0	1
Early absorption (EA)	1	1	0	1
Late absorption (LA)	0	0	0	0
Final absorption (FA)	0	0	0	0
L %	94.2	95.6	96.5	86.6
Litter counts with A	7	6	6	12
Litter counts with A (100%)	0	0	0	0
Pre-IM% [(corpora lutea counts - implantations)/corpora luteal counts *100%]	19	13.8	21.7	19.4
Post-IM% [(implantations-live fetuses)/implantations*100%]	5.8	4.4	3.5	13.4
Litter counts with more than 1 L	16	19	17	17

a: bodyweight on GD20 - weight of gravid uterus; b: bodyweight on GD20 - weight of gravid uterus- bodyweight on GD6.
*: $p<0.05$ vs control group; **: $p<0.01$ vs control group.

Study No. [redacted]009R continued **Dose Levels (mg/kg)** **Noteworthy Findings**	**0**	**0.03**	**0.1**	**0.3**
Fetal Development Examination (mean) (*P<0.001 vs control)**	N (16)	N (19)	N (17)	N (17)
number of live male fetuses	6	6	5	5
individual placenta weight	0.566	0.555	0.541	0.493***
body weight of live fetuses (g)	3.351	3.263	3.241	2.853***
crown-rump length (mm)	34.35	34.17	33.92	32.04***
tail length (mm)	12.53	12.35	12.28	9.03***
sum of number of live male fetuses	91	120	92	88
a% [number of live male fetuses/number of live females*100%]	48.7	54.5	46.7	47.3
Fetal External Examination				
number of examined fetuses	187	220	197	186
litter of examination	16	19	17	17
number of variations examined	2	2	3	12**
limbs hematoma (including left and right hind limbs)	1[a] (0.5) [b], 1[c]	0 (0), 0	2 (1.0), 2	4 (2.2), 4
head hematoma	1 (0.5), 1	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (0.5), 1
back hematoma	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (0.5), 1	0 (0), 0
tail hematoma	0 (0), 0	1 (0.5), 1	0 (0), 0	0 (0), 0
brachyury/anury	0 (0), 0	1 (0.5), 1	0 (0), 0	45 (24.2), 12
limbs short	0 (0), 0	1 (0.5), 1	0 (0), 0	0 (0), 0
gastroschisis	0 (0), 0	1 (0.5), 1	0 (0), 0	0 (0), 0

Note: a: number of foetuses; b: incidence of variation examined (%); c: litter of variation examined;
**: $p<0.01$ vs control group.

Study No. [redacted]009R continued				
Dose Levels (mg/kg)	**0**	**0.03**	**0.1**	**0.3**
Noteworthy Findings				
Summary of Feal Visceral Examination				
No. of examined fetuses	95	112	97	92
litter of examination	16	19	17	17
No. of variation examined	1	1	1	2
Ventricular enlargement/slightly enlargement	1[a] (1.1) [b]，1[c]	1 (0.9), 1	1 (1.0), 1	2 (2.2), 2

Note: a: number of foetuses; b: incidence of variation examined (%); c: litter of variation examined.

胎児骨格検査の要約（骨化遅延及び骨格奇形）

Dose Level	0 mg/kg	0.03 mg/kg	0.10 mg/kg	0.30 mg/kg
Number of examined fetuses	92	108	100	94
Litter of examination	16	19	17	17
Delayed ossification	16	19	17	17
Sternum				
I	0[a](0)[b], 0[c]	0 (0), 0	2 (2.0), 2	2 (2.1), 2
II	24 (26.1), 14	15 (13.9), 7	26 (26.0), 13	21 (22.3), 10
III	1 (1.1), 1	2 (1.9), 2	5 (5.0), 4	9 (9.6), 8
IV	4 (4.3), 3	2 (1.9), 2	10 (10.0), 7	6 (6.4), 6
V	29 (31.5), 14	23 (21.3), 16	26 (26.0), 15	17 (18.1), 9
VI	59 (64.1), 16	51 (47.2), 18	38 (38.0), 15	14 (14.9), 7
Parietal bone	9 (9.8), 5	29 (26.9), 15	9 (9.0), 7	4 (4.3), 4
Interparietal bone	14 (15.2), 10	24 (22.2), 13	12 (12.0), 9	29 (30.9), 11
Frontal bone	0 (0), 0	1 (0.9), 1	1 (1.0), 1	0 (0), 0
Fibula	0 (0), 0	1 (0.9), 1	0 (0), 0	0 (0), 0
Tibia	0 (0), 0	1 (0.9), 1	0 (0), 0	0 (0), 0
Supraoccipital bone	5 (5.4), 3	6 (5.6), 4	8 (8.0), 7	60 (63.8), 15
Hyoid	26 (28.3), 11	37 (34.3), 12	25 (25.0), 12	12 (12.8), 6
Femur	0 (0), 0	1 (0.9), 1	0 (0), 0	0 (0), 0
Pubis	4 (4.3), 4	15 (13.9), 9	9 (9.0), 7	11 (11.7), 8
Ribs	3 (3.3), 3	4 (3.7), 4	7 (7.0), 4	13 (13.8), 6
Ischium	3 (3.3), 3	1 (0.9), 1	0 (0), 0	1 (1.1), 1
Malformation or variation	9	12	11	17**
Cervical vertebrae cleaved	0 (0), 0	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (1.1), 1
Rib waving undular	2 (2.2), 2	1 (0.9), 1	1 (1.0), 1	0 (0), 0
Thoracic vertebra dumbbell-	9 (9.8), 7	11 (10.2), 8	14 (14.0), 8	23 (24.5), 13

shaped				
Thoracic vertebra cleaved	1 (1.1), 1	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (1.1), 1
Sternum dumbbell-shaped	3 (3.3), 2	8 (7.4), 6	9 (9.0), 6	19 (20.2), 11
Sternum cleaved	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (1.0), 1	0 (0), 0
Lumbar vertebrae dumbbell-shaped	0 (0), 0	0 (0), 0	0 (0), 0	1 (1.1), 1
Note: a: number of foetuses; b: incidence of variation examined (%); c: litter of variation examined; **: $p<0.01$ vs control group.				

Study No. [redacted]009R continued				
Dose Levels (mg/kg)	**0**	**0.03**	**0.1**	**0.3**
Noteworthy Findings				
Summary of Fetal Skeletal Examination (Ossification points) (mean)	N (16)	N (19)	N (17)	N (17)
CV	7	7	7	7
TV	13	13	13	13
LV	6	6	6	6
S/CV	8	8	8	6***
St	5	5	5	4***
C1	2	2	2	2
Sc	2	2	2	2
Rib	26	26	26	26
Me	8	8	8	8
PP (f)	8	8	7	7
DP (f)	10	10	10	10
Me'	10	10	10	10
PP (h)	7	7	7	7
DP (h)	10	10	10	9

Note: ***: $p<0.001$ vs control group. CV: cervical vertebrae; TV: Thoracic vertebrae; LV: Lumbar vertebrae; S/CV: Sacral or Coccygeal vertebrae; St: Sternum; Cl: Clavicle; Sc: Scapula; Me: Metacarpals; PP (f): Proximal phalanx (forelimb); DP (f): Distal phalanx (forelimb); Me': Metatarsals; PP (h): Proximal phalanx (hind limb); DP (h): Distal phalanx (hind limb).

2.6.7.8 光毒性試験

Study Title	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses/ Concentration	Key Finding	Report No.	Location in eCTD
3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test	Balb/c 3T3 Cell	*In vitro*	-	CYH33: 0.094, 0.202, 0.435, 0.936, 2.01, 4.33, 9.3 and 20 μg/mL, negative control (DMSO), positive control (CPZ)	Under +UV and –UV conditions, the IC_{50} (+UV) of CYH33 was 1.020 μg/mL and the IC_{50} (-UV) was 16.488 μg/mL; its MPE was 0.328, greater than 0.15; its PIF was 16.190, greater than 5.0, which met the criteria of phototoxicity.	20213[redacted]03	M4.2.3.7.7-1
SD rats phototoxicity	Rat/Sprague Dawley	PO	Single dose	Female: 3, 10, 30 mg/kg Male: 100, 300, 600 mg/kg	No cutaneous reaction or phototoxicity was noted in the non-irradiated or irradiated sites of the test article treated animals.	20213[redacted]04	M4.2.3.7.7-2
BN rats phototoxicity	Rat/Brown Norway	PO	3 days QD	Female: 3, 10, 30 mg/kg Male: 100, 300, 600 mg/kg	No phototoxicity was observed, and the result of the phototoxicity study of CYH33 was negative.	[redacted]23066[redacted]0 1	M4.2.3.7.7-3